ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ "ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ"
Биологически факултет
Катедра „Биохимия и микробиология"

Айше Сейхан Салим

„Оптимизиране ензимния синтез на олигозахариди сгликозилтрансферази отLeuconostoc mesenteroides"

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

за присъждане на образователна и научна степен ***„Доктор"***
Професионално направление 4.3.Биологични науки ***(Микробиология)***

Научен ръководител: проф. д-р Илия Илиев

Пловдив,2017

Дисертационният труд съдържа 144 страници на формат А4, 20 таблици и 60 фигури. В библиографската справка са включени 168 заглавия на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Биохимия и микробиология” на ПУ „Паисий Хилендарски” и в лабораториите на Технологичен център на ПУ „Паисий Хилендарски”, ул.”Костаки Пеев” №21.

Научно жури:

1. проф. дбн Искра Иванова
2. проф. дбн Мария Ангелова
3. проф.д-р Вяра Иванова
4. доц. д-р Соня Костадинова
5. проф.д-р Илия Илиев

Защитата на дисертационния труд ще се състои

На 05.10.2017г. от 11^{00}часа в зала «Компас» на ПУ «Паисий Хилендарски», ул. «Цар Асен» № 24, Пловдив

Дисертационният труд е обсъден на разширено заседание на катедра „Биохимия и микробиология”към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски”, проведено на 07.07.2017г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед Р 33-3750/21.-7.2017г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски”.

Материалите по защитата се намират на разположение в деканата на Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски”, гр.Пловдив, ул.”ТодорСамодумов”№2.

Въведение

Получаването на нови биоактивни олигозахариди привлича голям интерес както от страна на научната общност така и на индустрията, поради тяхното потенциално приложение като функционални компоненти в хранително-вкусовата, фармацевтичната и козметичната промишленост (Rastall, 2010). Фруктоолигозахаридите са пребиотични съединения срещащи се в различни природни източници като аспержи, лук, чесън, домати , синя жлъчка, банани и други (Hogarth, Hunter, Jacobs, Garleb, & Wolf, 2000).Към фруктоолигозахаридите (ФОЗ) се проявява особен интерес, поради техните отлични биологични и функционални свойства като пребиотични съединения. Те са нискокалорични, нехраносмилаеми въглехидрати, които подпомагат нормалния растеж и активността на полезната чревна микрофлора (бифидобактерии и лактобацили) и допринасят за намаляване на серумните нива на холестерола, фосфолипидите и триглицеридите. Използват се като компоненти на функционалните храни и са получили GRAS статус (“общопризнати за безопасни”) от FDA (Fernández, Maresma, Juárez, & Martínez, 2004; Katapodis, Kalogeris, Kekos, Macris, & Christakopoulos, 2004; Moore et al., 2003; Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2005) (Food and Drug Administration — U.S. Администрацията по храните и лекарствата-САЩ). Основното промишлено производство на фруктоолигозахариди се осъществява от ензимната трансформация на захарозата от микробиални ензими наречени фруктозилтрансферази. Различни щамове от родовете *Streptococcus, Lactobacillus* и *Leuconostoc* продуцират различни гликозилтрансферази в комплекс-фруктозилтрансферази (ФТФ) и глюкозилтрансферази (ГТФ) (Morales-Arrieta, Rodríguez, Segovia, López-Munguía, & Olvera-Carranza, 2006a).

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се изследват свойствата и капацитета на трансферазната реакция за синтез на олигозахариди от леванзахараза, получена от рекомбинантен щам *E. coli* BL21 LS17 и да се осъществи трансфер на гена за леванзахараза от изходен щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm 17 в реципиентен щам на *Lactobacillus plantarum.*

Целта се постига при решаване на следните задачи:

1. Оптимизиране условията на култивиране на рекомбинантен щам *E. coli* BL21 LS17 за секреция на леванзахаразата от трансферирания ген за ензима от щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm 17;

2. Изолиране и пречистване на леванзахаразата от рекомбинантен щам *E. coli* BL21LS17;

3. Изследване на основните кинетични характеристики на получената леванзахаразата от рекомбинантен щам *E. coli* BL21LS17;

4. Изследване капацитета на изследваната леванзахараза за синтез на олигозахариди в присъствие на различни акцептори;

5. Изследване кинетиката на ензимната реакция на леванзахаразата от рекомбинантен щам *E. coli* BL21LS17 за синтез на полизахарид и олигозахариди в присъствие на различни акцептори;

6. Трансфер на гена за леванзахараза от щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm 17 в реципиентен щам на *Lactobacillus plantarum* и конструиране на рекомбинантен щам;

7. Оптимизиране условията на култивиране на рекомбинантен щам на *Lactobacillus plantarum* за секреция на трансферираната леванзахараза в колби.

8. Оптимизиране условията на култивиране на рекомбинантен щам на *Lactobacillus plantarum* за секреция на леванзахаразата в биореактор.

Материали и методи

1.Микроорганизми.

1.1.Изследванията в настоящата дисертация са проведени с рекомбинантен щам *Escherichia coli* BL21LS17– от катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“. Рекомбинантният щам е получен след клонирането на леванзахаразен ген от щам *Leuconostoc mesenteroides Lm17* в експресионен вектор pETiteN-HisSUMOKanVector, който е внесен в щам *E. coli* BL21;

1.2.*E. coli TOP10* (One Shot TOP10 Chemically Competent *E.coli*), Invitrogen,Cat.No.C4040-10;

1.3.*Lactobacillus plantarum NC8*– от колекцията на Department of Clinical Bacteriology, Goteborg University ,Goteborg;

1.4. *Lactobacillus plantarum WCFS1*- любезно предоставен от NIZO Food Research,The Netherlands.

2.Хранителни среди

2.1. За култивиране на рекомбинантен щам *E. coli* BL21 LS17 се използва ТВ-среда (Terrific broth), съдържаща 30 μg/ml канамицин.

2.2. За култивиране на рекомбинантен щам *E. coli* TOP10 FTF, използван като субклониращa система се използва LB-среда (Luria-Bertani), съдържаща 200 μg/ml еритромицин.

2.3. За култивиране на рекомбинантни щамове *Lactobacillus plantarum* NC8 FTF и *Lactobacillus plantarum* WCFS1 FTF се използва среда на Man, Rogosa и Sharpe (MRS), съдържаща 10 μg/ml еритромицин за *Lb.plantarum* NC8 FTF и 5 μg/ml еритромицин за *Lb.plantarum* WCFS1 FTF.

2.4. За култивиране на рекомбинантни щамове *Lactobacillus plantarum* NC8 FTF и *Lb.plantarum* WCFS1 FTF за синтез на полимер се използва mMRS-агар с 20 % и 10 % захароза и 10 μg/ml и 5 μg/ml еритромицин, съответно.

3.Експресия на леванзахараза от рекомбинантен щам *E. coli BL21 LS17*

Рекомбинантният щам *E. coli* BL21LS17 се култивира на ТВ-течна хранителна среда, съдържащи 30 μg/ml канамицин при 37°C в 500 $см^3$ колби, съдържащи 100 $см^3$ среда при разбъркване (250 об/мин). След достигане на оптична плътност(OD_{600}) от 0,5 до 1,0 при λ=600 nm, към културалната среда се добавя индуктор IPTG, до крайна концентрация 1 mM.

Изследва се експресията на леванзахаразата, при култивиране на рекомбинантния щам при температура 18°C за 16 часа. Оптимизирането на процеса се осъществи и в биореактор тип INFORS

HT- Minifors, с 2 по 6 броя импелери с площ 2 $cm^{2,}$ съдържащ 2 литра ТВ-среда, температура на култивиране 37°C, температура на експресия 18°C и разбъркване 250 об/мин.

4. Клониране на гена, кодиращ леванзахараза в *Lb. planatrum NC8* и *Lb.plantarumWCFS1*.

За клониране на гена кодиращ леванзахараза се използва вектор pLp_3050Nuc, който беше любезно предоставен от MATFORSK, Norwegian Food Research Institute, Osloveien , As, Norway; Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, As, Norway. Като субклониращa система се използваха химически компетентни клетки *E.coli* TOP10. След детекция на рекомбинантни клонове посредством colony PCR-анализ, от получените трансформанти се изолира плазмидна ДНК, която се използва за трансформация на *Lb.plantarum NC8* и *Lb.plantarum WCFS. Lb.plantarum NC8* и *Lb.plantarum WCFS1* се обработиха по методика описана отAukrust и Blom, 1992 за получаване на електрокомпетентни клетки. Електропорацията на електрокомпетентните клетки се осъществи при условията описани от Spath et al, 2012.

5.Експресия на леванзахараза от рекомбинантни щамове *Lb.plantarum NC8 FTF* и *Lb.plantarum WCFS1 FTF*.

Оптимизираха се условията за експресия в колба и в биореактор тип INFORS HT- Minifors с поддържане на pH~5.3.

6.Пречистване на леванзахараза от рекомбинантен щам *E. coli BL21LS17*

За пречистване на леванзахаразата се използва хроматографска колона: His-TrapFFNi-sepharose, 5 ml (GEHealthcare).

7.Ензимен синтез на олигозахариди и HPLC анализ.

Реакцията за ензимен синтез на олигозахариди се проведе при следните условия: 0,02 M Na-ацетатен буфер, pH 5.3, съдържащ като донор на фруктозни остатъци захароза и като акцептор на фруктозни остатъци: малтоза (Merck, чистота 99%), фруктоза (Merck, чистота 99%), арабиноза(Sigma), лактоза (Sigma), лактулоза (Merck, чистота 97%), рафиноза (Merck, чистота 97%), галактоолигозахариди (TOS–P; Yakult,Tokyo,Japan), и фруктоолигизахариди (Raftilose P95**;** Orafti, Belgium). Реакцията стартира при прибавяне на 0,5 U/ml, 1 U/ml или 2 U/ml леванзахараза, в присъствие на 0,1% NaN3 за предотвратяване на микробиален растеж. Тоталното количество олигозахариди и разпределението им

по степен на полимеризация се определиха чрез хроматографски анализ на HPLC, при използване на анионобменна колона CarboPac PA1 (250 mm64 mm; Dionex) свързана към колона CarboPac1 Guard (Dionex), модел на апарата Konik HPLC 560, Konik-Tech.Олигозахаридите се детектираха чрез рефрактометър модел Shodex RID-560. Всички резултати се обработиха при използване на софтуер Konikrom Plus Soft-ware Version 3.0.2.244.

Резултати и обсъждане

I. Изолиране и пречистване на леванзахараза, продуцирана от щам *E. coli BL21LS17*

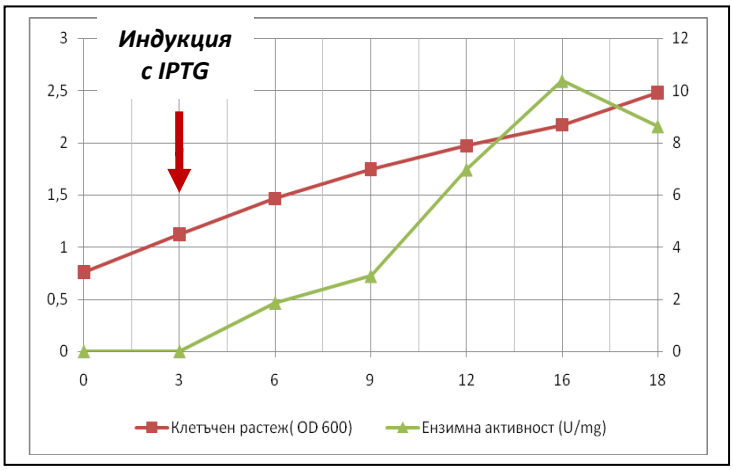
В предишни изследвания на колектива от секция „Биохимия" към катедра „Биохимия и микробиология" е установено, че щам *Leuconostoc mesenteroides Lm17* синтезира комплекс от гликозилтрансферази - декстранзахараза с молекулна маса 180 kDa, фруктозилтрансфераза с молекулна маса 120kDa и гликозилтрансфераза с молекулна маса 86 kDa (Vasileva et al., 2012). Интерес представлява да се определи типа на фруктозилтрансферазата и нейната трансферазна активност за синтезиране на фруктан и фруктоолигозахариди. За целта генът, кодиращ фруктозилтрансфераза с молекулна маса 120 kDa от щам *L. mesenteroides Lm17* е изолиран и клониран в *E. coli BL21 (Iliev et al., In press).* Данните от секвенционния анализ доказват, че клонираният ген кодира леванзахараза с 96% сходство в нуклеотидните последователности на гена, кодиращ леванзахараза LevS от референтен щам *L. mesenteroides* NRRL B-512F. Оптимизирани са условията за продукцията на леванзахаразата от рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17,* като щамът е култивиран наТВ и LB хранителни среди и експресията е проведена при различни температури. Най-висока ензимна активност е отчетена при 18°C на 16 час от началото на експресията на ТВ хранителна среда.

На база на установените оптимални условия за *E.coli BL21LS17* проведохме култивиране в биореактор при следните условия:

рекомбинантният щам *E.coli BL21LS17* се култивира на ТВ-среда с 30 μg/ml канамицин при 37°C до достигане на OD_{600}=0,5-1,0, след което се осъществи индукция с 1 mM IPTG за продукция на ензим при 18°C, с продължителност 16 часа. На фигура 1 са представени резултатите от ферментационния процес. Най-висока ензимна активност е отчетена на 16 час от началото на процеса - 10,37 U/mg протеин, като при

продължаване на култивирането до 18 час активността пада с 20 %. Клетъчният растеж на щам *E.coli BL21LS17* показва нарастване през целия период на култивирането и достига максимум на OD-2,5. Това е важно условие за постигане на висока ензимна активност в последващите етапи на изолиране и пречистване, тъй като ензимът е вътреклетъчен.

Фигура 1. Профил на леванзахаразна активност и клетъчен растеж (OD600) по време на рекомбинантна експресия в рекомбинантен щам *E. coli BL21LS17* при култивиране в биореактор.



Схемата за изолиране на леванзахаразата от рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17* включва няколко стъпки. Клетките се отделиха чрез центрофугиране, след което се ресуспендираха в охладен дезинтегриращ буфер, който съдържа 20 мМ ацетатен буфер с pH 5.3, 100 мМ NaCl и 20 % глицерол. Тестваха се различни схеми на дезинтегриране чрез ултразвук, с цел оптимизиране на условията и получаване на максимален добив от ензима. Установи се, че максимално количество ензим се освобождава при изплолзване на схема включваща 10 пулса по 5 секунди и 2 минути охлаждане между пулсовете. При използване на повече от 10 пулса или при по-продължително време на обработване на клетките голяма част от ензима се инактивира. След процедурата на дезинтегриране максималният добив е 32 % (3,32 U/mg ензим).

Освободеният чрез центрофугиране от клетъчни остатъци ензимен екстракт се подложи на пречистване чрез афинитетна хроматография, с използване на Ni-Sepharose колона His-Trap FF. Леванзахаразата, продуцирана от използвания рекомбинантен щам съдържа на N-края си последователност от хистидинови остатъци, което й позволява специфично да се свързва към никеловите йони на

колоната, а всички останали клетъчни белтъци се отделят с елуиращия разтвор.

От таблица 1 се вижда, че след хроматографското пречистване на изследваната леванзахараза се получава ензимен препарат със специфична активност 10 U/mg и тотална активност 15 U, степен на пречистване 3,0 и добив от 35%. Тези резултати са съпоставими с получените от други автори, при пречистване на леванзахарази.

Таблица 1. Пречистване на леванзахараза от рекомбинантен щам *E.coliBL21LS17*

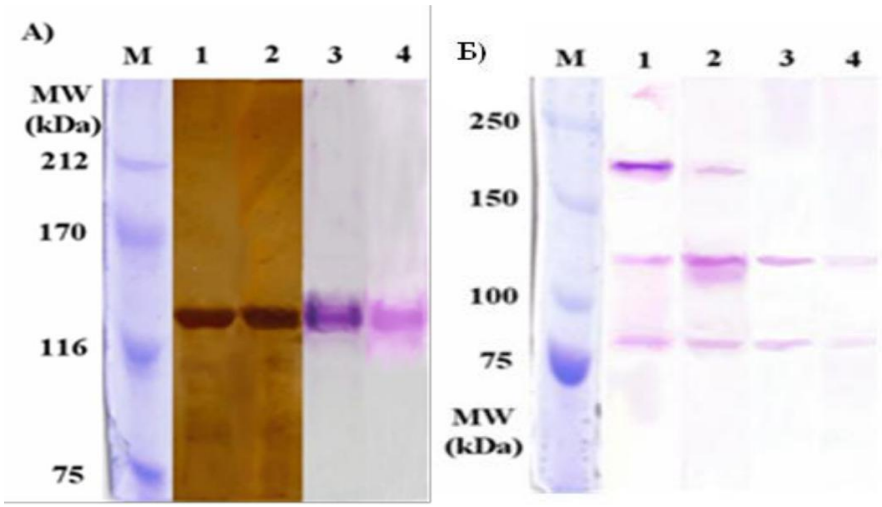
Стъпки	**V**	**Тотална активност, (U)**	**Специфична активност, (U/mg)**	**Степен на пречистване**	**Добив, (%)**
Клетъчен екстракт	5 ml	42,92	3,32	1,00	100
Хроматография с Ni-Sepharose	15 ml	15,00	10,00	3,00	34,9

В литературата се посочва като ефективен метод за пречистване на рекомбинантни хистидин-белязани на N- или C- края белтъци главно Ni-афинитетната хроматография,която в някои случаи е последвана от провеждане на анионобменна хроматография [Van Hijum et al. 2004; Olvera et al.2006]. Van Hijum и съавтори пречистват рекоминантна леванзахараза от *Lb. reuteri 121* в две стъпки: 1) Ni-афинитетна хроматография и 2) анионобменна хроматография. След Ni-афинитетната хроматография, полученият ензимен препарат е със степен на пречистване 2,3 пъти и с добив от 14,3%. След втората стъпка на пречистване, добивът намалява почти два пъти [Van Hijum et al. 2006].

При проведената SDS-PAGE и последващо оцветяване със сребърен нитрат се установи само една белтъчна ивица с молекулна маса 120 kDa(Фигура 2). За да установим, че получената ивица съответства на фруктозилтрансфераза, се проведе in situ анализ при инкубиране на геловете както в 10% захароза, така и в 5% рафиноза (Фигура 2А).И при двата субстрата се детектираха само по една

ивица с молекулна маса 120 kDa, което доказва, че ензимът продуциран от *E.coli BL21LS17* е фруктозилтрансфераза, синтезиращ фруктан.

Фигура 2. In situ анализ на А) пречистена леванзахараза и Б) гликозилтрансферази от изходен щам *L. mesenteroides Lm 17*



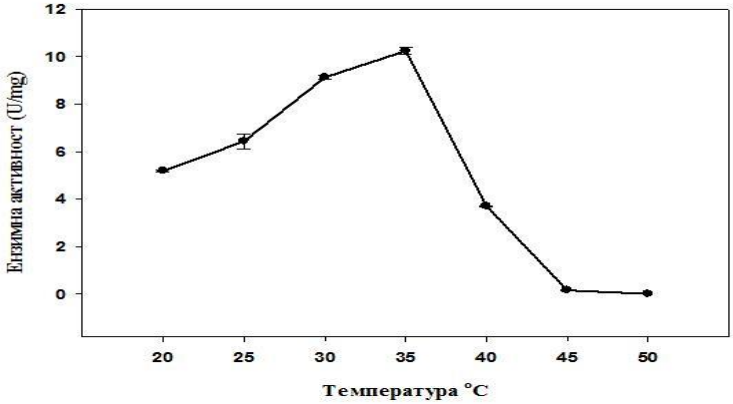
По молекулна маса, пречистеният ензим съответства на леванзахаразата от изходния щам *L. mesenteroides Lm17*, който продуцира (Фигура 2Б) комплекс от ектрацелуларни и клетъчно-свързани гликозилтрансферази (ГТФ и ФТФ).

1. Кинетични изследвания на леванзахараза от рекомбинантен щам *E. coli BL21LS17*

1.1 Изследване влиянието на температурата и pH върху активността на леванзахараза

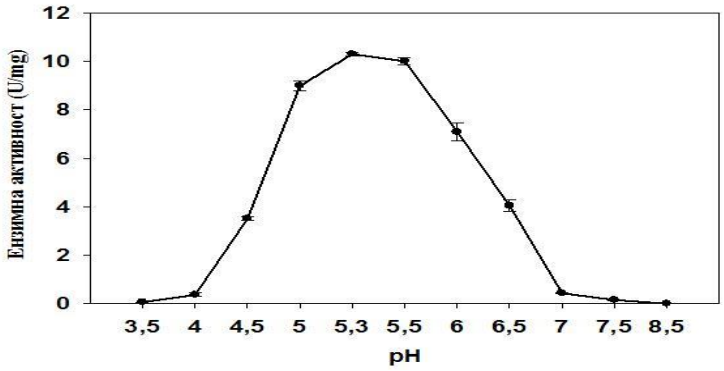
С цел да се определят оптималните условия на реакция за изследвания ензим, се изследва влиянието на температурата и pH върху ензимната активност. В изследавния диапазон от 20° С до 50°С най- висока активност от 10,34 U/mg се отчете при температура 35°С в 20 mMNa-ацетатен буфер с pH 5,3 (Фигура 3 и Фигура 4). При температури 40°С и 45°С, измерената ензимна активност намалява съответно с 64% и 98 % от максимално отчетената активност при 35°С (Фигура 3), което доказва слабата толерантност на ензима към температури над 35°С.Температурен оптимум при 35°С е докладван в литературата за леванзахарази, продуцирани от щамове *L. mesenteroides* ATCC 8293, *L. mesenteroides*NRRL B-512F , *L. mesenteroides* B-512FMC (Kang et al., 2005a; Morales-Arrieta et al., 2006a; Olvera et al.,2007).

Фигура 3. Влияние на температурата върху активността на леванзахараза от рекомбинантен щам E. coli BL21LS17.



Оптималната стойност на pH за изследваният ензим е 5,3. Намаляване на ензимната активност с повече от 50%, спрямо отчетената при pH 5,3 и 35°C се определи при провеждане на ензимната реакция при pH стойности под 5,0 и над 6,0 (Фигура 4).

Фигура 4. Влияние на pH върху активността на леванзахараза от рекомбинантен щам E. coli BL21LS17.



Установеният pH оптимум на изследвания ензим е съпоставим с тези на леванзахарази от други щамове на *Lactobacillus* spp. Например, най-висока активност на леванзахараза от щам *Lb.reuteri* 121 е установена в границите от pH 4,5-5,5 (S. Van Hijum et al., 2004). Tieking и съавтори докладват pH оптимум при 5,4 за леванзахараза от щам *Lb. sanfranciscensis* TMW 1.392 (Tieking & Gänzle, 2005).

1.2. Кинетика на леванзахараза от рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17* в присъствие на акцептори - рафиноза, малтоза и лактоза.

Интерес представлява да се сравнят кинетичните параметри на леванзахарази от различни продуценти, включително и от рекомбинантни щамове. За целта се изследва влиянието на захарозната

концентрация върху скоростта на реакцията, катализирана от леванзахаразата. За определяне стойностите на K_m и V_{max}, се изследва влиянието на концентрацията на захарозата (от 20 до 1000 mM), при постоянни други условия (pH 5,3; 35°C).

Стойностите на K_m и V_{max} се изчислиха по уравненията на Михаелис-Ментен и Лайнуевър-Бърк за реципрочните стойности на скорост и концентрация на субстрата. Стойността на K_m за изследваната леванзахараза е 63 mM захароза, а V_{max} е равна на 6,34 mmol/min освободена глюкоза. Леванзахаразата от рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17* показа по-висока стойност на Km от стойности, установени за други леванзахарази: *L. mesenteroides* B-512FMC, Km=26,6 mM; *L. mesenteroides* ATCC 8293, Km= 27.3 mM; *L. mesenteroides* MIFT, Km=26.6 mM; ; *Lb. sanfranciscensis* TMW 1.392, Km=13.1 mM [Kang et al., 2005; Tieking et al., 2005; Olveraetal. 2007].

Таблица 2. Стойности на Km и Vmax на леванзахараза от рекомбинантен щам E. coli BL21LS17 в присъствие на акцептори-рафиноза,малтоза и лактоза.

	Vmax	Km
Захароза	6,34 ± 0,1454	63 ± 6,2697
Захароза- Рафиноза (2 : 1)	7,13 ± 0,6167	756,8 ± 120,60
Захароза- Малтоза (1 : 1)	2,1 ± 7,712	44 ± 7,0113
Захароза- Лактоза (2,5 : 1)	1,55 ± 9,333	42,41 ± 11,2446

При изчисляване на K_m на изследваната от нас леванзахараза от рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17*, в присъствие на два субстрата-захароза и малтоза, както и при захароза и лактоза се наблюдава около 30 % по-ниски стойности на K_m, независимо от съотношението между двата субстрата. Това вероятно се дължи в промяна на сродството между активния център на ензима и субстратите.

1.3. Съотношение между трансферазна и хидролазна реакция на леванзахаразаот рекомбинантен щам*E.coli BL21LS17*

Кинетичните изследвания относно трансфруктозидазната активност се проведоха при 35°C, pH 5,4 и концентрация на ензима 0.5 U/ml. Съотношението между освободеното количество глюкоза и фруктоза се използва, за да се определи количеството фруктоза използвано за трансфруктозилиране на различни захарни акцептори, т.е. трансферазната активност на ензима. Въз основа на концентрацията на освободената глюкоза и фруктоза по време на реакцията катализирана от леванзахараза се определи съотношението между трансферазната и хидролазната активност на изследваният ензим. Както се вижда на Фигура 6, по време на ензимната реакция трансферазната активност на

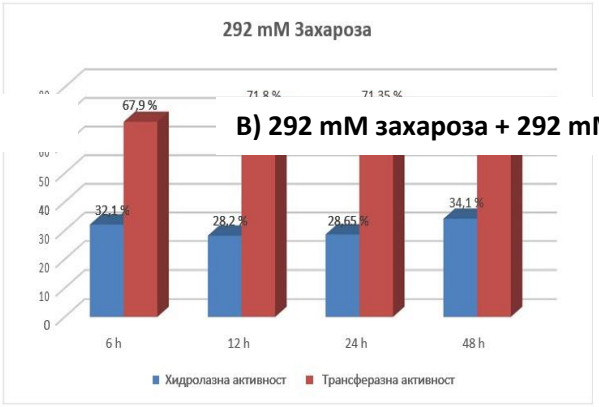
ензима е преобладаваща, както в присъствие само на захароза (292 mM), така и в присъсвие на акцепторите малтоза (292 mM) и лактоза (117 mM). В присъствие на 292 mM захароза се наблюдава най-висока трансферазна активност на 12-ти час, след което се понижава до 48-ия час с 8 %.

В присъствие на акцепторите малтоза и лактоза в реакционната смес трансферазната активност на ензима се повишава средно с 4 %. В хода на реакцията най-висока трансферазна активност в присъствието на 292 mM захароза и 292 mM малтоза се наблюдава на 24 час от реакцията-74,12 % (Фигура 5 В), а в присъствие на 117 mMлактоза на 48 час от реакцията-79,8 % (Фигура 5 Г). Различни фактори оказват влияние върху съотношението между трансферазната и хидролазната активност на леванзахаразите - концентрацията на захарозата, pH и температурата (Velazquez-Hernandez et al., 2009; van Hijum et al., 2001). Известно е, че образуването на фруктани с ниска молекулна маса в ранните етапи на реакцията, влияе върху съотношението между трансферазна и хидролазна активност на леванзахарза, чрез насочване на фруктознитеостатъци предимно към удължаване на фруктановата верига вместо към водата (van Hi-jum et al., 2006).

В първите 6 часа на реакцията в присъствие на акцепторите малтоза и лактоза се наблюдава инхибиране на трансферазната реакция, като при акцептор малтоза инхибирането е най-високо - 70,2 %. При продължителност на реакцията от 12 и 24 часа не се наблюдават сериозни разлики на нивото на трансферазната реакция, което е предпоставка за преодоляване на инхибиращия ефект на акцепторите. При продължителност на реакциите до 48 час се наблюдава по-висока трансферазна активност в присъствие на акцепторите малтоза и лактоза, спрямо захароза, което може да се обясни със синтеза на полизахарид или синтеза на олигозахариди с по-висока степен на полимеризация.При използването на акцептор рафиноза се наблюдава значително по-висока хидролазна активност от 69,8 % на 6 час от реакцията.Въпреки това нивата на трансферазна активност се увеличават след 12-ят час и достига максимум от 71,3 % на 24-ти час. Като цяло трансферазната активност в присъствие на рафиноза като субстрат е най-ниска.Най-висока трансферазна активност се отчита при използването на акцептор лактоза на 48-я час
(79,8 %). При използването само на субстрат захароза трансферазната активност постепенно започва да намалява до 48-ят час (65,9 %).

Фигура 5. Профил на хидролазна и трансферазна активност на леванзахараза (0.5 U/ml) , в присъствие на:

А) 292 mM захароза **Б) 292 mM захароза + 100 mM рафиноза**



актоза

В) 292 mM захароза + 292 mM малтоза

Общата тенденция и при четирите представени реакции е, че преобладаващата активност на леванзахаразата, изолирана от *E.coli*

BL21LS17 е трансферазната активност, в сравнение с хидролазната. Това е от съществено значение за евентуалното приложение на този ензим за синтез на фруктоолигозахариди с различна структура и биологични активности.

Общият механизъм на трансфруктозилирането на захарозата във фруктоолигозахариди при действието на леванзахарази се осъществява от комплекс от мулти-етапни реакции,използвайки нетрадиционните кинетики с различни ефекти на инхибиране. Скоростта на трансфруктозилирането в присъствие на по-висока концентрация на ензима се инхибира поради ефект върху ензимното насищане със субстрат. Вероятно настъпва конкурентно взаимодействие при наличието на два субстрата, особено след намаляване концентрацията на захарозата след 6-я час на реакцията.

II.Изследване акцепторната специфичност на леванзахараза, изолирана от *E.coli BL21LS17* за синтез на фруктоолигозахариди

Фруктоолигозахаридите представляват олигозахариди със степен на полимеризация от 3 до 9, съставени от молекула захароза към която са прикачени различен брой фруктозни единици. Общата им структура представлява GFn – където с G се означава глюкозата, а с Fn броят на фруктозните единици. Могат да бъдат класифицирани в три различни типа взависимост от начинът им на свързване:

1) Инолинов тип- съдържат линейна нередуцираща верига с β-(2-1) връзка като например:
   - 1-кестоза (1^F- β-D- фруктофуранозилзахароза) (GF2)
   - 1-нистоза (1^F- (1 -β-D- фруктофуранозил)$_2$ захароза) (GF3)
   - 1^F-β-фруктофуранозилнистоза– (GF4)
2) Леванов тип – които съдържат β- (2 - 6) образувана между фруктозни единици като например:
   - 6-кестоза (6^F- β-D- фруктофуранозилзахароза)
3) Нео-фруктоолигозахариди, при които D- глюкозният остатък от захарозата е свързан директно към фруктозен осатък посредством β- (2-6) връзка -нео-кестозата (6^G-β-D-фруктофуранозилзахароза) (Eggleston & Cote, 2003).

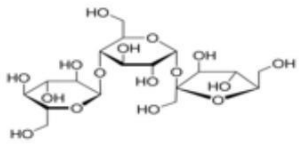
С цел да се изследва влиянието на различни захари като акцептори за синтез на олигозахариди, при използването на леванзахараза изолирана от рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17,* се проведоха синтезни реакции в присъствие на 0.5 U/mlензим в 0,02M Na-ацетатен буфер, pH 5.3, съдържащ като донор на фруктозни остатъци 292 mM захароза, при температура 35° C и различни акцептори. Най-висок добив от олигозахариди се детектираха при използването на акцепторите малтоза (20,4 %) и лактоза (16,93 %). При използване на тризахарида рафиноза като акцептор се установи пик между пиковете на захарозата и рафинозата, което вероятно е резултат от получаване на друг тип тризахарид на базата на молекулата на захарозата. Необходимо е допълнително изолиране, пречистване и определяне структурата на този тризахарид чрез ЯМР-анализ. При използване на олигозахариди като акцептори, ние очаквахме получаване на олигозахариди с по-висока степен на полимеризация. Резултатите при сравнителен анализ на хроматограмите в началото и края на ензимната реакция в присъствие на фруктоолигозахариди показват синтез на олигозахариди със СП4, СП5 и СП6 (Фигура 6).

Таблица 3. Изследване акцепторната специфичност на леванзахараза от рекомбинантен щам *E. coli BL21LS17.*

	Синтез на ФОЗ	292 mM Захароза + акцептор	Общо количество синтезирани ФОЗ
Монозахириди			
Арабиноза	–		
Фруктоза	–		
Дизахариди			
Малтоза	+	**584 mM Малтоза**	**20,4 %**
Лактоза	+	**117 mM Лактоза**	**16,93 %**
Лактулоза	–		
Тризахариди			
Рафиноза	+	**100mM Рафиноза**	
Фруктоолигозахариди	+	**145 mM ФОЗ**	**18,15 %**
Галактоолигозахариди	+	**145 mM ГалОЗ**	**3,7 %**

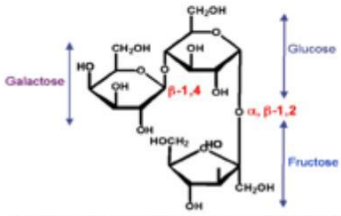
Акцептор Малтоза

Ерлоза



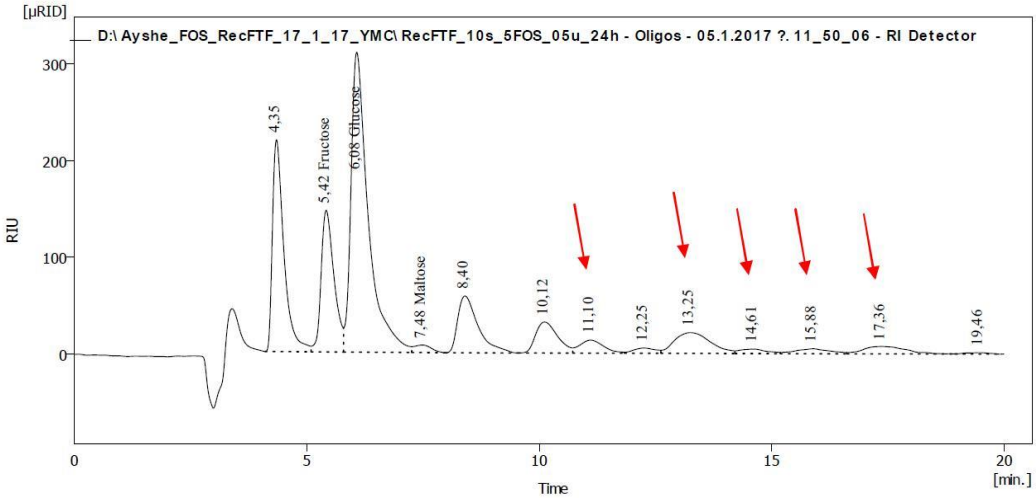
Акцептор Лактоза

Лактозахароза



β-D-Fructofuranosyl 4-O-β-D-galactopyranosyl-α-D-glucopyranoside

Фигура 6. Хроматограма на синтезирани фруктоолигозахариди с различна степен на полимеризация, при използването на 0.5 U/ml ензим и 292 mM захароза + 145 mM фруктоолигозахариди като акцептор.



1. Изследване динамиката на синтеза на олигозахариди, в присъствие на различни акцептори.

1.1Динамика на синтез на олигозахариди при акцептор малтоза.

Резултатите от предходните изследвания потвърдиха, че най-ефективна трансфруктозилна реакция се наблюдава в присъствие на малтоза като акцептор. Следващата стъпка от нашите изследвания е продиктувана от възможността да се оптимизира процеса на ензимен синтез на ФОЗ (фруктоолигозахариди), както по отношение на

концентрацията на акцептора и съотношението на донор и акцептор, така и по отношение на концентрацията на ензима. В следващия експеримент се проследи синтеза на ФОЗ при концентрация на ензима 0.5 U/ml и съотношение на захароза:малтоза= 2:1 (Таблица 4).

Таблица 4. Динамика на синтез на ФОЗ в присъствие на акцептор малтоза и 0.5 U/ml леванзахараза от рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17.*

Време на реакцията h	292 mM Захароза + 146 mM Малтоза		
	Тризахарид	Тетразахарид	Тотално количество ОЗ
6	5,38 %	1,1 %	6,48 %
12	6,07 %	1,92 %	7,99 %
24	5,08 %	2,43 %	7,51 %
48	5,0 %	2,8 %	7,8 %

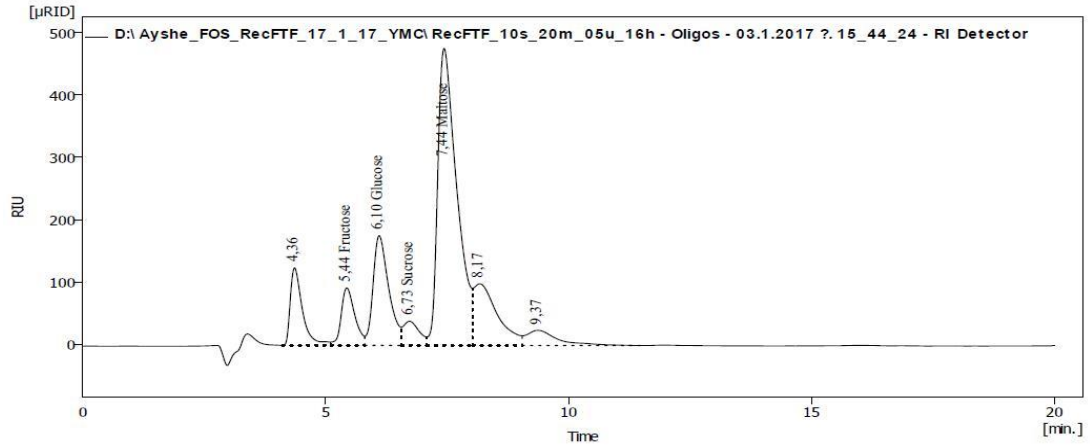
При проследяване в динамика на синтеза на ФОЗ се установи, че се синтезират основно тризахариди и тетразахариди. Максималното отчетено тотално количество олигозахариди е 7,99 % на 12-я час от началото на процеса, разпределени съответно 6,07 % - тризахриди и 1,92 % - тетразахариди. До края на синтезната реакция (48 час) се наблюдава увеличаване количеството на тетразахаридите, което се обяснява сизползването на тризахаридите като донорна молекула за присъединяване на четвърти фруктозилен остатък.

В следващия експеримент се проучи влиянието на различно количество малтоза като акцептор върху синтеза на ФОЗ. Установи се, че с увеличаване количеството на акцептора в реакционната смес се увеличава и количеството на синтезираните фруктоолигозахриди (Таблица 5). При използването на 292 mM захароза + 584 mM малтоза, 0.5 U/ml ензим, 35°C, синтезираното количество олигозахариди със степен на полимеризация 3 (СП 3) е 15,4 % със СП 4- 5 % на 12-я час от началото на реакцията. За сравнение при използването на четири пъти по-малко акцептор (292 mM захароза + 146 mM малтоза) синтезираното количество е само 6,07 % (СП 3) и 1,92 % (СП 4) или 2,5 пъти по-малко.

Таблица 5. Количество синтезирани фруктоолигозахариди в присъствие на акцептор малтоза и 0.5 U/ml леванзахараза.

Време на реакция	292 mM Захароза +						146 mM Захароза +	
h	146 mM Малтоза		292 mM Малтоза		584 mM Малтоза		292 mM Малтоза	
	СП 3	СП 4	СП 3	СП 4	СП 3	СП 4	СП 3	СП 4
12	6,07 %	1,92 %	6,5 %	2,9 %	15,4 %	5 %	4,8 %	2,74 %
24	6,08 %	1,43 %	6,2 %	2,8 %	10,4 %	5,1 %	4,3	2,71 %

Фигура 7. Хроматограма на синтезирани фруктоолигозахариди на 12 час, при използването на 0.5 U/ml ензим и 292 mM захароза + 584 mM малтоза.



При получени резултати от други автори за инулозахараза от *Lactobacillus gasseri DSM20604* е докладвана синтезата на малтозилфруктозиди в присъствие на захароза-малтоза в съотношение10:50(13%малтофруктоолигозахариди)и30:30(52%малто фруктоолигозахариди) (Marina Dnez-Municio et al., 2013)(Diez-Municio et al., 2013).

F.Tian et al., 2012 установяват, че леванзахаразата от *B.amyloliquefaciens* също използва ефективно малтозата като акцептор, като е регистриран максимален добив на олигозахариди от 15 %, от които преобладаващ е тризахарида ерлоза (68 %).

1.2 Динамика на синтез на олигозахариди при акцептор лактоза.

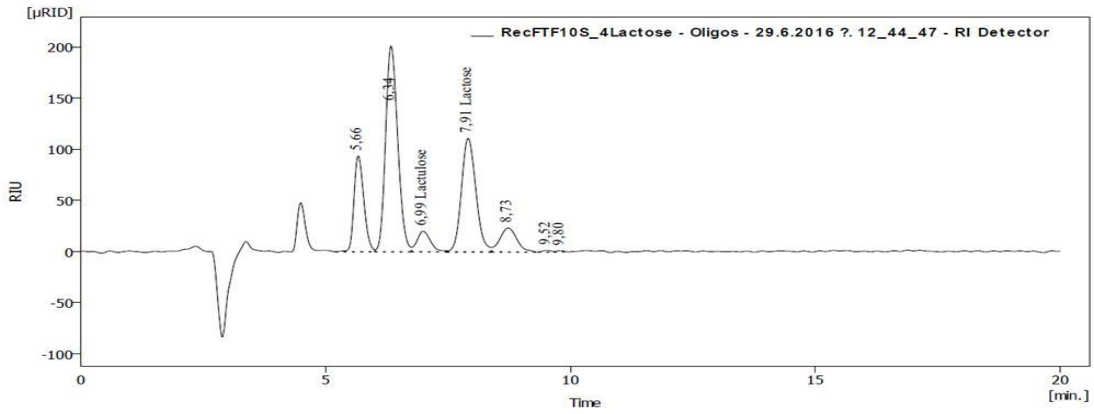
При използването на лактоза като акцептор се синтезират най-голямо количество олигозахариди на 24 час при съотношение на захароза:лактоза 2,5:1 (292 mM захароза + 117 mM лактоза), като се използва 13,5 % от лактозата като фруктозилен акцептор и се синтезират 16,93 % фруктоолигозахриди (Фигура 8) . Детектира се

синтеза само на тризахарид. Максимално количество тризахарид се постига на 24-я час от началото на процеса (16,93 %), като през следващите 48 часа количеството му се редуцира почти 50 %. Вероятно полученият тризахарид е нестабилен като структура и се хидролизира от самата леванзахараза.

Таблица 6. Динамика на синтез на ФОЗ в присъствие на акцептор лактоза и 0.5 U/ml леванзахараза.

Време на реакция	**292 mM Захароза + 117 mM Лактоза**
h	**Тризахарид**
6	**8,04 %**
12	**9,63 %**
24	**16,93 %**
48	**8,6 %**

Фигура8.Хроматограма на синтезирани ФОЗ на 24 час, при използването на 0.5 U/ml ензим,292 mM захароза +117 mM лактоза.



По литературни данни при използването на акцептор лактоза се синтезира тризахаридът лактозахароза, в резултат на трансферазната активност на леванзахараза. Лактозахарозата е тризахарид образуван от захароза и лактоза, чрез ензимнотрансгликозилиране.Той представлява нискокалоричен несмилаем въглехидрат с пребиотични свойства , който селективно се метаболизира от *Bifidobacterium*, като селективно стимулира растежа и развитието им в интестиналният тракт. Ензимен синтез на лактозахароза е докладвана за леванзахараза от *Leuconostoc mesenteroides B-512 FMC* (Wenjing Li et al., 2015; W. Li et al., 2015).

Таблица7.Количество синтезирани фруктоолигозахариди в присъствие на акцептор лактоза и 0.5 U/ml леванзахараза.

Време на реакция	292 mM Захароза +		
h	117 mM Лактоза	234 mM Лактоза	292 mM Лактоза
	Тризахарид	Тризахарид	Тризахарид
12	9,63 %	9,1 %	15,9 %
24	16,93 %	8,95 %	13,5 %

При изходна концентрация на захароза от 292 mM и концентрация на лактоза от 117 mM количеството на тризахарида се увеличава двойно на 24-я час от реакцията (Таблица 7). При еднаква концентрация от 292 mM захароза и лактоза количеството тризахарид от 15,9 % се запазва след 12-я час на процеса. Когато съотношението между захароза и лактоза (1:1 и 1:2) е в полза на акцептора лактоза, се отчита синтез на олигозахариди, изградени от 4 мономерни единици в минимални концентрации (Таблица 8).

Таблица 8. Количество синтезирани фруктоолигозахариди в присъствие на акцептор лактоза и 0.5 U/ml леванзахараза.

Време на реакция	146 mM Захароза +			
h	117 mM Лактоза		292 mM Лактоза	
	Тризахарид	Тетразахарид	Тризахарид	Тетразахарид
12	6,3 %	0	9,71 %	0,39 %
24	4,16 %	0,23 %	8,05 %	0

Акцепторната специфичност на леванзахарази от *B. subtilisNCIMB 11871*(Seibel et al.2006), *M. laevaniformans ATCC 15953* (Kim et al. 2005;Park etal. 2003), и *B. licheniformis 83701* е изучена в детайли. Всички тези ензими могат да продуцират лактозахароза използвайки лактоза като фруктозилен акцептор, а също показват и висока трансферазна ефективност към акцептор малтоза, при което се синтезира ерлоза.

Фруктоолигозахаридите намират широко приложение в хранителновкусовата промишленост като нискокалорични подсладители ине само ,порадитехният пребиотичен ефект (Sivieri et al., 2014), некариогенни свойства (Yun et al., 1996), усилване усвояването на калций (Morohashi et al., 1998) и уминнитета (Le

Bourgot et al., 2014). За рекомбинантна леванзахараза от *Leuconostoc mesenteroides*B-512FMC е докладвана синтезата на фруктоолиго-захариди - 1-кестоза (17 % от общото количество олигозахариди), нистоза (11 %) и 1,1,1-кестопентаоза (7 %) при използването само на субстрат захароза (150 mM) (Hee Kyoung Kang et al., 2004). В присъствие на различни акцептори (моно, ди- и тризахариди) леванзахаразата може да синтезира фруктоолигозахариди с различна структура и дължина на веригата.

1.4 Оптимизиране синтезата на фруктоолигозахариди при използването на различна активност на леванзахараза от рекомбинантен щам *E. coli BL21 LS17.*

За да се установи влиянието на количеството ензим в реакционната среда върху хода на реакцията и количеството на синтезираните олигозахариди се проведоха синтезни реакции с активност 0.5 U/ml , 1 U/ml и 2 U/ml рекомбинантна леванзахараза и акцептор малтоза. Тенденцията при използването на по-голямо количество ензим, е че реакцията протича по-бързо, като това не води до получаването на по-голямо количество синтезирани олигозахариди. Детектират се основно тризахариди и тетразахариди. Най-голямо количество олигозахариди се получават при използването на 1 U/ml ензим на 12-я час от процеса, като на 24 и 48 час тяхната концентрация намалява, за сметка на синтезирания полимер. При използване на ензима в концентрация от 2 U/ml през първите 12 часа от реакцията се синтезира тетразахарид (2,9 %), който в следващите 12 часа вероятно се използва като прекурсор за синтез на полизахарида леван (Таблица 9).

Най-голямо количество олигозахариди се синтезират на 12 час от началото на реакцията. Това се дължи на факта, че в първите 12 часа от реакцията е доминираща трансферазната реакция (80 %), а след 24 час е преобладаваща хидролазната активност (57 %).

При изследване влиянието концентрацията на рекомбинантната леванзахараза върху синтезирането на олигозахариди в присъствие на лактоза като акцептор установихме, че при концентрация от 1 U/ml и 2 U/ml се детектират много малки количества тризахарид (1,4 %), в сравнение с 0.5 U/ml леванзахараза- 16,93 % тризахарид. Вероятно това се дължи на преобладаваща хидролазна активност за сметка на трансферазна, при посоченото съотношение захароза и лактоза (Таблица 10) или поради синтезата на полимер.

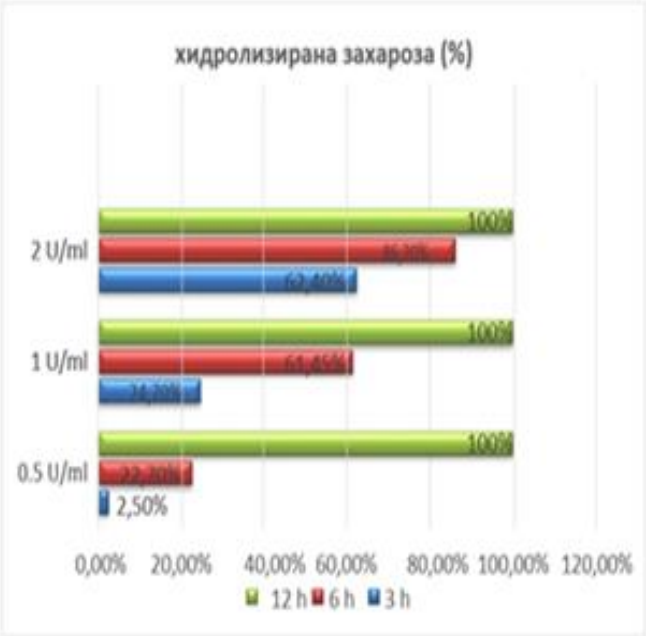
Таблица 9. Оптимизиране условията за синтез на фруктоолигозахариди в присъствиие на 292 mM Захароза + 292 mM малтоза, при използването 0.5 U/ml , 1 U/ml и 2 U/ml леванзахараза.

Време на реакция	292 mM Захароза + 292 mM Малтоза					
h	0.5 U/ml Леванзахараза		1 U/ml Леванзахараза		2 U/ml Леванзахараза	
	СП3	СП4	СП3	СП4	СП3	СП4
12	6,5 %	2,9	10,77%	4,34 %	6,5 %	2,9 %
24	6,2 %	1,8 %	9,6 %	4,9 %	4,65 %	0

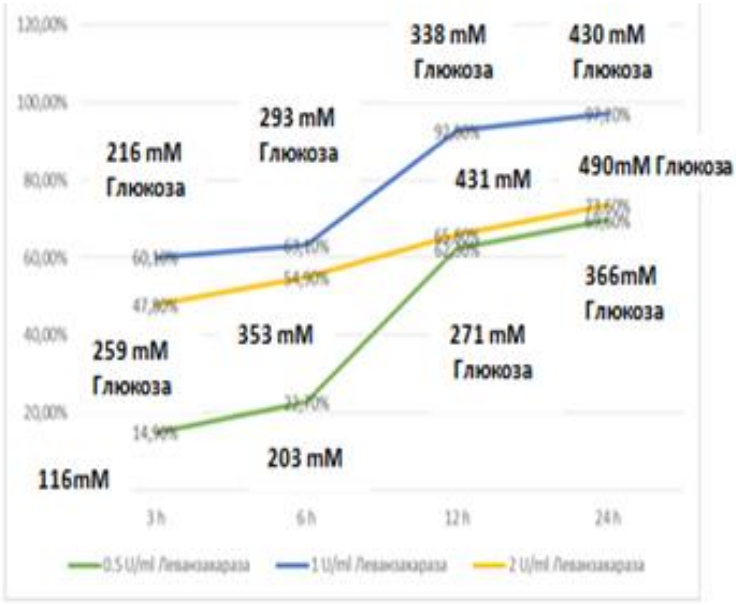
Таблица 10. Оптимизиране условията за синтез на фруктоолигозахариди в присъствиие на 292 mM Захароза + 117 mM лактоза, при използването 0.5 U/ml , 1 U/ml и 2 U/ml леванзахараза.

Време на реакция	292 mM Захароза + 117 mM Лактоза		
h	0.5 U/ml Леванзахараза	1 U/ml Леванзахараза	2 U/ml Леванзахараза
	Тризахарид	Тризахарид	Тризахарид
24	16,93 %	1,4 %	1,35 %

Фиг.9 Количество хидролизирана захароза (%), на различни часове от реакцията при използването на 0.5 U/ml , 1 U/ml, 2 U/ml ензим.



Фиг.10 Динамика на синтез на полимер при използването на 0.5 U/ml , 1 U/ml, 2 U/ml леванзахараза, в присъствие на 292 mM Захароза



2. Динамика на синтез на полимер от леванзахараза изолирана от рекомбинантен щам *E. coli BL21LS17.*

В следващите експерименти проследихме динамиката на синтез на полизахарид като ко-продукт и краен продукт от реакцията на рекомбинантната леванзахараза. Проведоха се синтезни реакции в присъствие на 292 mM захароза и ензимна активност съответно 0.5 U/ml , 1 U/ml и 2 U/ml в реакционен обем от 20 мл . Проби по 10 мл се анализираха съответно на 3, 6 , 12 и 24 час. Полимерът се утаи чрез добавянето на порции на еквивалентно количество 96 % етанол, като се разтвори в същият обем на пробата в дестилирана вода. Количеството на леван се определи по Фенол-серен метод.

Вложеното количество захароза напълно се хидролизира до 12 час на реакцията, като интензитета на хидролизната реакция се увеличава с увеличаване концентрацията на ензима. Максимално количество полизахарид се синтезира при влагане на леванзахараза от 1 U/ml, което се постига още на 12-я час от началото на процеса. Количеството синтезиран леван при използване на ензим с активност 0.5 U/ml и 2 U/ml е с 30 % по-ниско от това при 1 U/ml.

Логично процесът най-бавно стартира при влагане на ензим от 0.5 U/ml активност, като в първите 3 часа от реакцията се синтезира само 15 % от полимера. Данните от Таблица 12 показват, че при концентрация на леванзахараза 1 U/ml в първите три часа от реакцията активно се осъществява трансферазна реакция, която води до синтез на олигозахариди. Тяхното количество намалява постепенно до 24-ти час на реакцията, което може да се обясни с използването им като прекурсори за синтеза на леван.

Данните за синтезираните ФОЗ при концентрация на ензима от 2 U/ml показват неритмично синтезиране и използването като акцептори на ФОЗ. Вероятната причина е настъпващото частично продуктно инхибиране на ензимната реакция, в резултат на получаваната висока концентрация на глюкоза и фруктоза.Синтезирането на минимално количество олигозахариди се наблюдава още на 3 час от началото на реакцията, при използването на 1 U/ml и 2 U/ml ензим. Въпреки това трансферазната активност на ензима при използването на 292 mM захароза е за сметка на синтез на полимера леван.

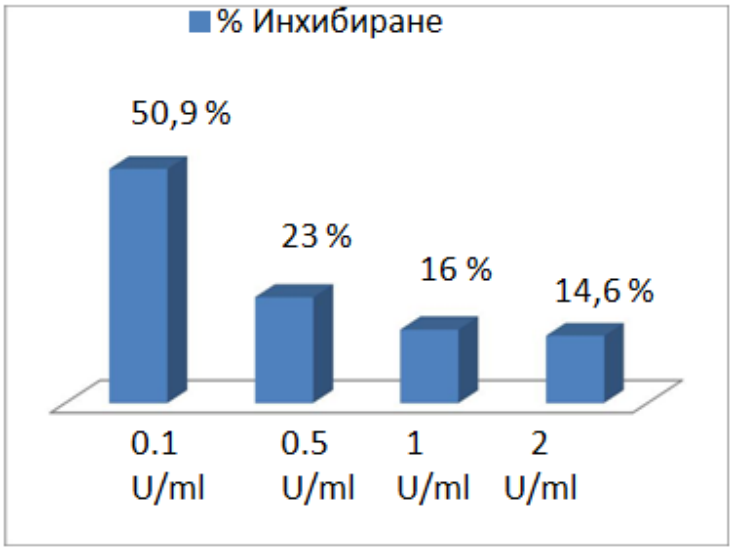
Таблица 11. Синтезирано количество полимер и фруктоолигозахариди от леванзахараза при използването на 292 mM Захароза

Време на реакция	**0.5 U/ml Леванзахараза**		**1 U/ml Леванзахараза**		**2 U/ml Леванзахараза**	
h	Полимер %	ФОЗ %	Полимер %	ФОЗ %	Полимер %	ФОЗ %
3	14,9	0	60,1	6,2	47,8	1,4
6	22,7	0	63,1	4,2	54,9	3
12	62,3	3,2	92,8	2,3	65,8	1,7
24	69,6	3,3	97,2	2,8	73,6	2,5

Известно е, че образуването на нискомолекулни фруктани в ранните етапи от реакцията повлиява съотношението между трансфераза и хидролаза активност на леванзахаразата, чрез насочването на фруктозните единици предимно за удължаване на фруктановата верига вместо към молкула вода [van Hijum SAFT et al., 2006]. На по-късен етап от реакцията, когато концентрацията на захарозата намалява, скоростта на хидролазната активност се увеличава, което е в корелация с данните,отчетени от Korakli за синтез фруктан от фруктозилтрансфераза от *Lactobacillus sanfranciscensis* [Korakli et al., 2003].

Steinberg et al., 2002 тестват ефекта на различни въглехидрати върху активността на фруктозилтрансферази, като доказват че глюкозата има инхибиторен ефект върху ензимната активност и синтезата на високо-молекулен фруктан. Глюкозата е вторичен продукт на ензимната реакция на синтезата на фруктан, каталазирана от фруктозилтрансферази в присъствие на субстрат захароза като фруктозилен донор.

Фигура 11. Продуктно инхибиране на леванзахараза, в присъствие на 292mM Захароза + 278 mM Глюкоза при използването на 0.1 U/ml, 0.5 U/ml, 1 U/ml и 2 U/ml ензим.



Това корелира с получените от нас резултати за синтез на полимер и фруктоолигизахариди в присъствие на различни концентрации от леванзахараза от рекомбинантен щам *E. coli BL21LS17.*

III. Клониране на гена кодиращ леванзахараза в *Lactobacillus plantarum NC8* и *Lactobacillus plantarum WCFS1.*

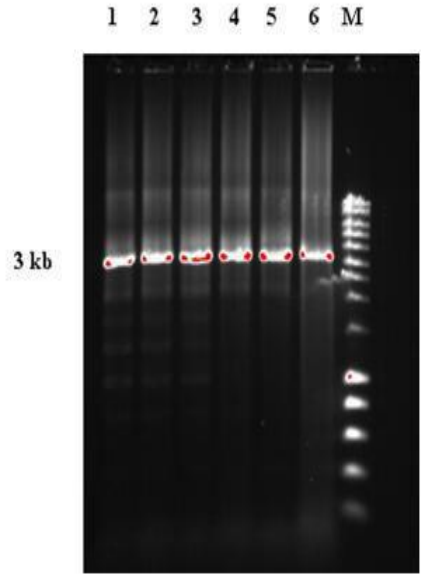
Млечнокиселите бактерии са широко използвани в хранително-вкусовата промишленост, като пробиотици и продуценти на различни метаболити и ензими. Интересът към тях расте и поради техният GRAS-статус (общоприети за безопасни),според FDA (администрацията по храните и лекарствата) (Axelsson et al., 2004). През последните две десетилетия бяха конструирани няколко експресионни системи за продукция на хетероложни протеини от МКБ (de Ruyter et al.,1996; Mathiesen et al.,2004) включително и такива със значителен секреторен потенциал (Dieye Y et al., 2001; Krüger et al., 2002; Sørvig et al.,2003). Една от тези системи е pSIP-системата, която успешно е използвана за вътреклетъчна експресия (Bohmer et al.,2012; Kolandaswamy et al.,2008), секреция (Anbazhagan et al., 2013; Morais et al.,2013) и получаване на клетъчно-свързани протеини (Fredriksen et al., 2012; Fredriksen et al.,2010) в *Lactobacillus plantarum*и *Lactobacillus sakei*.Докладвани са високи нива на експресия на хетероложни проетеини като β-глюкуронидаза, аминопептидаза (Karlskås et al.,2014), амилаза (Nguyenet al., 2011) и β-

галактозидаза (Nguyenet al., 2015) при използването на pSIP-системата.pSIP- системата е еднoплазмидна система за регулируема експресия, базирана на промотори и регулаторни гени включени в продукцията на клас II бактериоцини – сакацин А (sap генен клъстер) и сакацин Р (spp генен клъстер) (Axelsson et al., 2003; Sorvig et al., 2003).

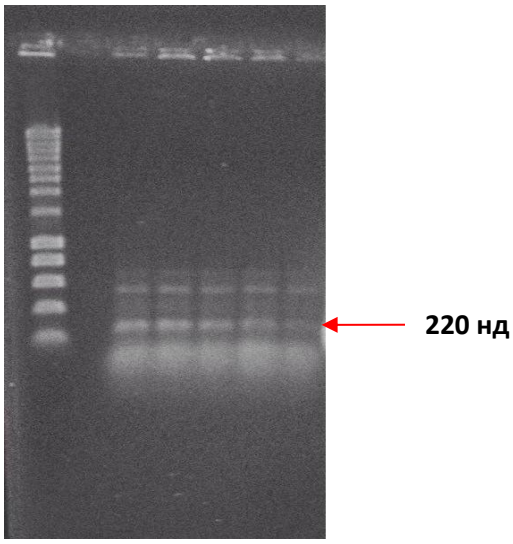
1. PCR-амплификация на гена кодиращ леванзахараза

Дизайнът на праймерите за гена кодиращ леванзахарза от *Leuconostoc mesenteroidesLm17* беше направена на базата на нуклеотидни секвенции за леванзахаразни гениналични в базата данни за гликозидхидролазно семейство GH68 (www.cazy.org/GH68_bacteria.html)- Lev S от *Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F*, Lev L и Lev C от *Leuconostoc mesenteroides subsp.mesenteroides ATCC 8293*.

Използва се програмата за биоинформатичен анализ Clustal Omega (www.ebi.ac.uk).Геномна ДНК от *Leuconostoc mesenteroides Lm 17*се използва като матрица при PCR-амплификацията на гена кодиращ леванзахараза. След провеждане на агарозна гел-електрофореза се установиха бендове с дължина (≈ 3083 нд), отговарящи на размера натърсеният ген.



Фигура 12. Градиентен PCR при използването на праймерна двойкаFTF3_F_17/FTF3_Rev_17 и геномна ДНК от *L.mesenteroiedes* Lm17. M – маркер (Smart Ladder Eurogentec).



Фигура 13. Електрофоретичен анализ на Colony PCR,при използването на праймера двойка FTF2-F и FTF2-Rev за вътрешен фрагмент от гена кодиращ леванзахароза (220 нд).

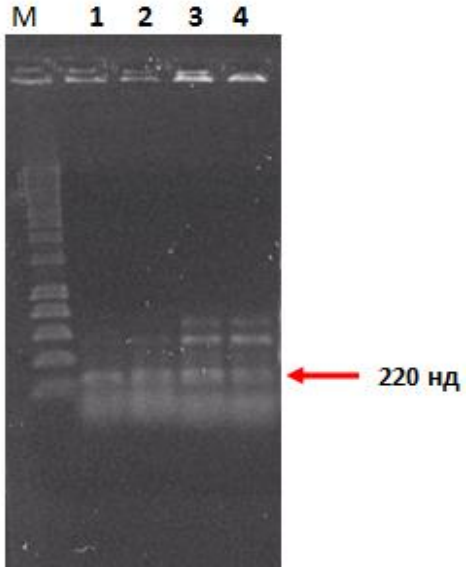
3. Субклониране в химически компетентни клетки *E.coli TOP10*

За процедурата на лигиране се използва Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Scientific). Концентрацията на линеализираният вектор беше 100 ng, а съотношението вектор:инсърт 1 : 3. За трансфромация на химически компетентни клетки *E.coli* TOP10 се използва 5 µl от реакцията на лигиране на вектора и инсърта,като тоталното количество ДНК (вектор + инсърт), използвано за трансформация е около 50 ng. Ефективността на трансформация беше 9,6 x 10^6 cfu/ µg. Проведе се colony PCR за детекция на рекомбинантни клонове. Colony PCR анализа представлява вариация на рутинният PCR метод, при който се използва бактериална колония носеща рекомбинантни вектори за амплификация на специфични фрагменти в контекста на бактериални плазмиди. Резултатите от PCR анализа бяха визуализирани на 1% агарозна гел- електрофореза.

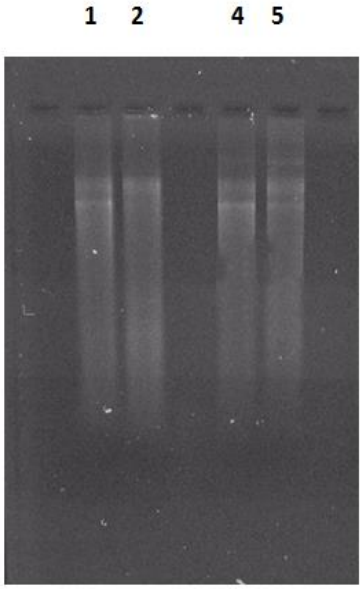
Използва се праймерна двойка FTF2-F и FTF2-Rev., специфични за вътрешен фрагмент от гена кодиращ леванзахараза. Този вътрешен фрагмент представлява участък от каталитичният сайт на ензима. Колониите показали позитивен сигнал (получаване на ДНК фрагментс дължина 220 нд, след colony PCR-a), бяха използвани за инокулиране на 5 ml течна LB среда, съдържаща селективен антибиотик (еритромицин, 200 µg/ml) и изолиране на рекомбинтни плазмиди.От получените трансформанти *E. coli* TOP10 се изолира плазмидна ДНК посредством QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

4. Прехвърляне на вектора pLp_3050FTF в *Lactobacillus plantarum NC8* и *Lactobacillus plantarum WCFS*

Lb.plantarum NC8 и *Lb.plantarum WCFS1*се обработиха по методика описана отAukrust и Blom, 1992 за получаване на електрокомпетентни клетки. Електропорацията на електрокомпетентните клетки се осъществи при условията описани от Spath et al., 2012. Colony PCR се проведе с праймерна двойкаFTF2-F и FTF2-Rev специфични за вътрешен участък от гена кодиращ леванзахараза, представляващ част от каталитичният домен на ензима. От колониите показали позитивен сигнал (наличие на ДНК фрагментс дължина 220 нд, след colony PCR-a) се изолира плазмидна ДНК (Фигура 14 и 15).



Фигура 14. Електрофоретичен анализ на Colony PCR,при използването на праймерна двойка FTF2-F и FTF2-Rev. 1,2-*Lb.plantarum*NC8FTF; 3,4- *Lb.plantarum* WCFS1FTF

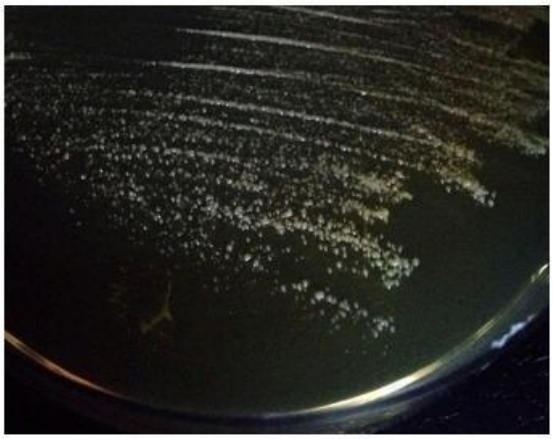


Фигура 15. Електрофоретичен анализ на плазмидна ДНК изолирана от трансформанти 1, 2- *Lb.plantarum* NC8FTF и *Lb.plantarum* WCFS1FTF

5.Синтез на полимер от рекомбинантни щамове *Lb.plantarumNC8 FTF* и *Lb.plantarum WCFS1 FTF* при култивиране намMRS-агар с 20 % и 10 % захароза, в присъствие на 100 ng/ml индуктор (сакацин P).

Леванзахараза продуциращите бактерии формират мукоидни колинии, когато се култивират на среда съдържаща захароза, като мукоидността се дължи на синтезираният полимер леван. Този признак може да се използва за откриване и идентифициране на бактерии продуциращи леванзахараза, но също така за селекцията на мутанти продуциращи хетероложно експресирана леванзахараза в *E.coli* (Yanaseet al., 2002; Alamäe et al., 2012; Li et al., 2011).

Присъствието на сакацин P индуцира експресията на гена кодиращ леванзахараза в рекомбинантни щамове *Lb.plantarum NC8 FTF* и *Lb.plantarum WCFS1 FTF*, а вложенатазахароза служи като донор на фруктозни остатъци за ензима в резултат на което се осъществява синтезата на фруктозен полимер (леван).



Фигура 16. Синтез на полимер отрекомбинантен щам Lb.plantarum NC8FTF при култивиране на mMRS-агар с 20 % захароза, в присъствие на 100ng/ml индуктор (сакацин P).

Фигура 17.Синтез на полиме р от рекомбинантен щам Lb.plantarum WCFSIF при култивиране на mMRS-агар с 10 % захароза, в присъствие на 100 ng/ml индуктор (сакацин P).

6.Оптимизиране условията за експресия на леванзахараза от рекомбинантни щамове *Lb.plantarum NC8FTF* и *Lb.plantarum WCFS1FTF*

Lb.plantarum NC8 и Lb.plantarum WCFS1 не притежават геномно кодираналеванзахараза (www.cazy.org).

- Оптимизираха се условията за експресия на леванзахараза от рекомбинантни щамове *Lb.planatrum NC8FTF* и *Lb.plantarum WCFS1FTF* в колба, без поддържане нарН.

Karlskas et al.,2014 използват pSIP-експресионната система за експресия на бета-глюкуронидаза и нуклеаза А в 14 различни щама лактобацили, като докладват наличие на експресия при 25°C, 30° C и 37°C.Затова рекомбинантните щамове *Lb.planatrum NC8FTF* и *Lb.plantarum WCFS1FTF* се култивираха при три различнитемпературни (25°C, 30° C и 37°C) след индукция с индуктор SppIP. И при двата щама не се установи експресия и наличие на леванзахаразна активност при температура 25°C. Най-високи нива на експресия се отчете при култивирането на рекомбинантните щамове след индукция при 30°C. Sak-Ubol et al., 2016 провеждат експресията на гени кодиращи хитозаназа и β-мананаза в *Lb.planatrum*, при използването на pSIP-системата също при 30°C, като докладват най-високи нива на експресия за хитозаназа на 20 час, а за β-мананаза на 12 час.

След установяване на оптималната температура за експресия, култивирането на двата рекомбинантни щама се проведе по следната схема.MRS среда с 10 μg/ml еритромицин за *Lb.plantarum NC8FTF* и 5

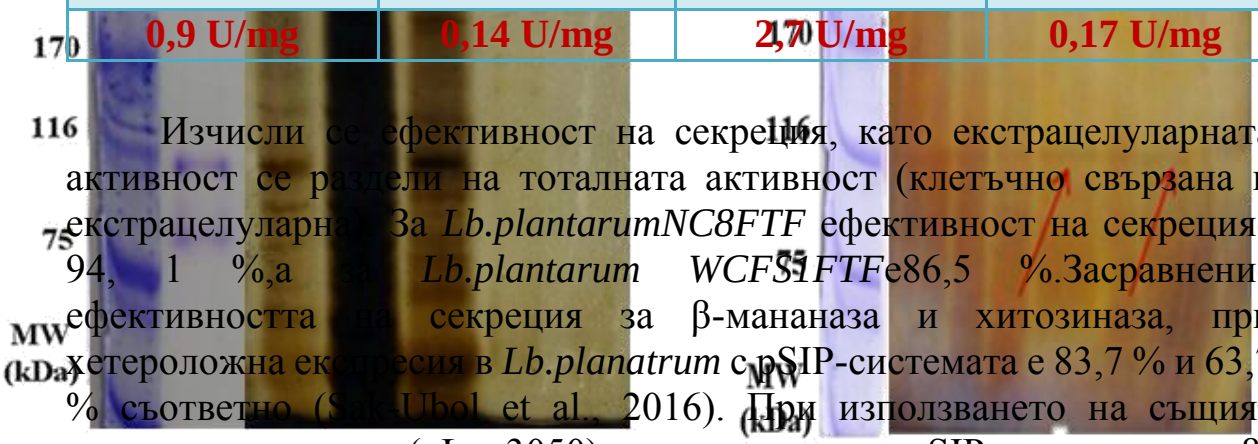
µg/ml за *Lb.plantarum WCFS1FTF* се инокулира със съответният рекомбинантен щам до оптична плътност ~0.1, след което култивирането се осъществи при 37˚ С до достигане на OD600nm~0.3. След достигане на OD600nm~0.3 се добави индуктор (сакацин P/SppIP) до крайна концетрация 100 ng/ml и щамовете се култивираха при 30˚ С. За наличие на ензимна активност се изследваха както надутаечна течност (извънклетъчен ензим) така и клетки (клетъчно-свързан ензим) в динамика на 12, 16, 20 и 24 час.И при двата щама максимални нива на експресия се наблюдава на 20 час– 0,42 U/mg извънклетъчен и 0,03 U/mg клетъчно-свързан ензим за *Lb.plantarum NC8FTF;* 0,16 U/mg извънклетъчен ензим и 0,03 U/mgклетъчно-свързан ензим за *Lb.plantarum WCFS1*FTF (Таблица 12). Значително ниските нива наензимна активност най-вероятно се дължат на инактивирането на ензимна поради ниското pH на средата след 12 час, когато се наблюдава и продукция и секреция на ензим.

Таблица12. Профил на леванзахаразна активност, клетъчен растеж и pH при култивиранена щамове *Lb.plantarum NC8* FTF и *Lb.plantarum WCFS1* FTF на MRS- среда с 100 ng/ml индуктор.

Lb.plantarum WCFS1FTF					***Lb.plantarum NC8FTF***			
Време (h)	Екстрацелулар на активност U/mg	Клетъчно свързана активност U/mg	pH	OD 600nm	Екстрацелулар на активност U/mg	Клетъчно свързана активност U/mg	pH	OD 600nm
12 h	-	-	4.6	1.76	-	0.004	4.2	1.8
16 h	-	-	4.2	1.84	0.16	0.018	4.0	1.97
20 h	0.16	0.03	4.0	1.96	0.42	0.03	3.98	2.03
24 h	0.06	0.01	3.97	2.01	0.1	-	3.96	2.09

Таблица 13. Леванзахаразна активност при култивиране на щамове *Lb. plantarum NC8* FTF и *Lb.plantarum WCFS1* FTF на MRS-среда с 100 ng/ml индуктор в биореактор с поддържане на pH.

	Lb.plantarum WCFS1 FTF		*Lb. plantarum NC8* FTF	
	Екстрацелуларна активност	*Клетъчно свързана активност*	*Екстрацелуларна активност*	*Клетъчно свързана активност*
	0,9 U/mg	**0,14 U/mg**	**2,7 U/mg**	**0,17 U/mg**



Изчисли се ефективност на секреция, като екстрацелуларната активност се раздели на тоталната активност (клетъчно свързана и екстрацелуларна). За *Lb.plantarumNC8FTF* ефективност на секрецияе 94, 1 %,а за *Lb.plantarum WCFS1FTF*е86,5 %.Засравнение ефективността на секреция за β-мананаза и хитозиназа, при хетероложна експресия в *Lb.planatrum* с pSIP-системата е 83,7 % и 63,7 % съответно (Sak-Ubol et al., 2016). При използването на същият сигнален пептид (pLp_3050) и вектор от pSIP-серията, за β-глюкуронидаза експресирана в *Lb.plantarum WCFS1*е докладвана ефективност на секрецията близка до 100 % (Karlskås et al, 2014).

Извънклетъчният ензим се концентрира чрез ултрафилтрация. Наблюдава се инактивиране на ензима с около 68 %, въпреки че измереното количество белтък след ултрафилтрация е три пъти повече.

7. Електрофоретичен профил на леванзахараза, продуцирана от рекомбинантни щамове *Lb.plantarum NC8 FTF* и *Lb.plantarumWCFS1 FTF*

Проведе се електрофоретичен анализ на клетъчно-свързана фракция от двата рекомбинантни щама, както и на екстрацелуларната фракция преди и след концентриране, чрез ултрафилтрация (Фигура 29). Оцветяването на геловете се проведе със сребърен нитрат, поради по-високата чувствителност на този метод. Освен протеинов стандарт се използва и леванзахараза, продуцирана от рекомбинантен щам *E. coli BL21LS1*, за да се съпоставят по молекулна маса с ензима продуциран отрекомбинантнтните щамове при *Lb.plantarum NC8FTF* и *Lb.plantarum WCFS1 FTF*.

Фигура 18. Електрофоретичен профил на леванзахараза продуцирана от рекомбинантни щамове *Lb.plantarum NC8*FTF и *Lb.plantarum WCFS1*FTF

А) 1*-леванзахараза от E. coli BL21LS17;* ***2****-клетъчно-свързана фракция отLb.plantarumWCFS1 FTF;* ***3****- клетъчно-свързана фракция от E. coli BL21LS17;* ***4****- клетъчно-свързана фракция от Lb.plantarum NC8 FTF;* ***5****- екстрацелуларна фракция от Lb.plantarum NC8 FTF;* ***6****- екстрацелуларна фракция отLb.plantarum WCFS1 FTF;M-протеинов стандарт(Amersham; BIO-RAD Precision Plus);*

Б) 1 и 2 *-екстрацелуларна фракция отLb.plantarum WCFS1FTFслед ултрафилтрация;****3 и 4*** *- екстрацелуларна фракция от Lb.plantarum NC8FTF след ултрафилтрация.*

При проведения електрофоретичен анализ се установи ивица с очаквана молекулна маса от 120 kDa, както при клетъчно-свързаната, така и при екстрацелуларната фракция след концентриране, която съвпада по молекулна маса и с леванзахараза от рекомбинантен щам E. coli BL21LS17. По литературни данни, леванзахаразите продуцирани от референтни щамове *L. mesenteroides NRRL B-512F* и *L. mesenteroides ATCC 8293* са с молекулни маси от около 120 kDa [Smith & Zahnley, 1999; Morales-Arrieta et al. 2006; Olvera et al. 2007].Следователно, по молекулна маса ивицата при 120 kDa е съпоставима с тези на леванзахаразате, продуцирани от референтни щамове *L. mesenteroides NRRL B-512F* и *L. mesenteroides ATCC 8293.*

Обобщение

В настоящия дисертационен труд изследвахме реакцията на трансфруктозилиране катализирана от леванзахараза от *L. mesenteroides* Lm 17. Тъй като щамът продуцира едновременно няколко гликозилтрансферази, за да изучим конкретната леванзахараза

използвахме рекомбинантен щам *E. coli* BL21LS17 с включен ген за леван захараза от щам*L. mesenteroides* Lm 17. Ензимната трансформация на захарозата от леванзахаразата води до освобождаване на глюкоза и фруктоза, която може да бъде прехвърлена към фруктозилният остатък на 6-та позиция на получените продукти (леван, фруктоолигозахариди). Леванзахаразите от различни микробиални щамове показват широка акцепторна специфичност и катализират реакции на трансфер на фруктозилен остатък от захароза до много дизахариди за да се получат различни хетеролигозахариди. Изследваният от нас ензим показа сравнително ограничена акцепторна специфичност, като най-добър акцептор установихме малтозата. Повечето микробиални леванзахарази могат да продуцират леван и ФОЗ, но кой от двата продукта ще преобладава зависи от източника на ензима и от реакционните условия. Например леванзахараза от *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* продуцира 4.6 mg L^{-1} леван и 125 mg L^{-1} ФОЗ, а леванзахараза от *P. syringae pv.* продуцира 7.2 mg L^{-1} леван и 104.1 mg L^{-1} ФОЗ от 1.2M захароза.

Леванзахаразата от *G. stearothermophilus* синтезира главно фруктанови полимери (35.1%, w/w) и малко количество ФОЗ (6.3%, w/w). Леванзахараза от *B. subtilis* продуцира основно дълговерижен леван (Caputi et al., 2013), докато ензимите от *Erwinia amylovora* (Caputi et al., 2013), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Trujillo et al., 2001), M. laevaniformans (Park Et al. 2003) и *B. amyloliquefaciens* (Tian and Karboune 2012) синтезират ФОЗ като основни продукти. Концентрацията на захарозата значително повлиява съотношението между синтезирания леван и фруктоолигозахаридите. По принцип увеличаването на концентрацията на захарозата води до синтезирането на по-голямо количество ФОЗ и намаляване образуването на дълговерижен леван. Леванзахараза от *Lactobacillus sanfranciscensis* продуцира приблизително равни количества кестоза и леван от 50 mM захароза, но в присъствие на 500 mM захароза в реакционната смес, продуцира много по-голямо количество кестоза, отколкото леван, (Tieking Et al. 2005). Леванзахараза от *Lactobacillus panis* продуцира също по-голямо количество кестоза, когато захарозната концентрация се увеличава, като pH и температурата не показват значителен ефект върху съотношението между синтезираните продукти (Waldherr et al., 2008).

При трансфруктозилазна реакция, катализирана от леванзахараза от *B. subtilis* ниската захарозна концентрация благоприятства формирането на дълговерижен леван и степента на полимеризация на левана намалява с увеличаване концентрацията на захарозата, като се получават високи нива на ФОЗ от 40% (w/v) захароза.При използване на рафиноза като акцептор изследваният от нас ензим синтезира

тризахарид със структура, различна от тази на рафинозата, но не се синтезира тетразахарид. Леванзахаразата очевидно прехвърля фруктозилната единица на захарозата сравнително ефективно върху вода, отколкото на рафинозата. Тези резултати могат да се дължат на високия афинитет на захарозата, когато е в излишък да се свързва към -1 и +1 позиция от активния център на изследваната леванзахараза, инхибирайки главно трансфруктозилиращата активност, както предполага Oseguera et al., 1996. Обикновенно продуктите, получени от ензимното действие върху рафинозата, са мелибиоза и фруктоза, които могат да бъдат включени в молекулата на акцепторните продукти леван и фруктоолигозахариди.Тъй като свободната фруктоза не може да действа нито като донор или акцептор, нейната концентрация може да се използва за определяне на степента на хидролиза на захарозата и рафинозата – трансфруктозилиране на вода. По този начин, разликата от концентрацията на глюкоза или мелибиоза с концентрацията на свободната фруктоза, дава информация за степента на трансфруктозилиране на реакцията, катализирана от леванзахаразата. Леванзахаразата от *B. amyloliquefaciens* в присъствие само на рафиноза като субстрат синтезира в минимални количества нистоза и неокестоза (0.08 mM to 5.5 mM), но концентрацията на мелибиозата постоянно се увеличава във времето. Акумулирането на мелибиоза в реакционната смес, може да е заради α-(1-6) връзката между D-галактозата и D-глюкозата, което може да повлиява на неговото позициониране в активния център на ензима, в резултат на което бива използван като акцептор. Подобни резултати са докладвани за леванзахараза от *Z. mobilis*, която показва висока субстратна специфичност към рафинозата, водеща до синтез на фруктанов полимер и натрупването на не-катаболизираната мелибиоза по време на реакцията.Мелибиозата обаче представлява добър акцептор за леванзахарази от *M. laevaniformans* (Park, et al.,2003, Kim, et al., 2005), *B. subtilis* (Seibel, et al.,2006) и *Rahnella aquatilis* (Ohtsuku et al.,1992). Реакцията на трансфруктозилиране е важен метод за получаване на лактозахароза, в която захарозата и лактозата служат като фруктозилен донор и фруктозилен акцептор съответно. Ние доказахме, че леванзахаразата от рекомбинантен щам *E. coli* BL21LS17 успешно използва лактозата, като акцептор, като синтезира тризахариди и тетразахариди. Park et al, 2005 тестват 11 вида микроорганизми, секретиращи вътреклетъчна леванзахараза и всичките тествани щамове са показали способност да произвеждат лактозахароза от захароза и лактоза, като най-висока продуктивност е показал *B. subtilis KCCM 32835*. В допълнение интактни клетки от *Paenibacillus polymyxa IFO 3020* (Choi et al., 2004) и *Sterigmatomyces elviae ATCC 18894* (Lee et al., 2007a, b), секретиращи вътреклетъчна леванзахараза се използват

за производство на лактозахароза от цели клетки. Наскоро беше изследвано производството на лактозахароза при използване на леванзахараза от *Bacillus methylotrophicus SK21.002* (Wu et al., 2015) и леванзахараза от рекомбинантни щамове *B. subtilis NCIMB 11871* (Seibel et al., 2006), *Z. mobilis* (Han et al., 2009) и *B. licheniformis* 8-37-0-1 (Lu et al., 2014), което доказва че производителността е щамово специфична. Най-голямо количество лактозахароза от 285 g L^{-1}, се постига при използване на леванзахараза от *Pseudomonas aurantiaca* от 205 g L^{-1} захароза и 410 g $^{L-1}$ лактоза (Han et al., 2007). Използван е химичен мутагенез, за да се увеличи продукцията на лактозахароза от *S. elviae ATCC 18894*, който щам показва 54,3% по-висока производителност в сравнение с дивият щам (Lee et al., 2007a).

След определяне на началните скорости на реакцията, се проследи в динамика влиянието на концентрациите на захарозата и акцепторите върху синтезиарните продукти по време на реакцията. Образуването на фруктоза е пренебрежимо малко при съответните реакционни условия, което показва преобладаваща трансферазна реакция за сметка на хидролазната. Ето защо ние не включихме тези стойности в модела при проведените кинетични изследвания. Вероятно образуването на фруктоза в големи количества в резултат на хидролизната реакция би довело до прекратяване на ензимната реакция. Представените в дисертацията кинетични изследвания описват хиперболичните кинетични профили, когато хидролизната реакция се пренебрегва. Подобни кинетични профили са докладвани за други фруктозилтрансферази, които използват захароза и 1-кестоза като субстрати (M.Alvarado-Huallanco et al.,2011; Duan et al., 1994). Тези ензими показват висока трансферазна ефективност и незначителна хидролазна активност. Освен това първоначалната скорост на реакцията намалява при високи концентрации на захароза (M.Alvarado-Huallanco et al.,2011; Duan et al., 1994; Antosova et al.,2008).Antosova et al.,2008 обяснява това поведение като ефект на термодинамична нееднородност, което до голяма степен се дължи на междумолекулни водородни връзки възникващи при високи концентрации на захарозата, водещи до асоциация на захарозните молекули (R2 = 0.979).

Подробни изследвания на триизмерната структура на фруктозилтрансферазите дават доказателства за наличие на един активенцентър (Alvaro-Benito et al.,2012; Meng et al., 2008).Нашите резултати не съответстват напълно на наличните резултати от предишни изследвания при използване на два субстрата в различни концетрации и в различни съотношения.

Необходимо е в бъдещи изследвания подробно да се анализират всички резултати от кинетичните изследвания в светлината на

уравнението на Хил, което се използва за коригиране на сигмоидните кинетични профили на първоначалните скорости на реакция (Van Hijum et al.,2003; Ghazi et al.,2007). Теоритично това уравнение за скоростта на ензимната реакция допуска, че има повече от едно свързващо място в структурата на ензима.

Успешното експресиране от нас на гена на изследваната леванзахараза в щамове *L. plantarum*з а първи път предоставя данни за включването на сравнително голяма молекула протеин в рекомбинантни лактобацили. Перспективата на подобни изследвания е от една страна да се получава леванзахараза от GRAS микроорганизми, които да се използват за синтез на фруктоолигозахариди с приложение в диетичните храни при човека. От друга страна ще даде възможност за изследване на трансферазните реакции на два ензима, секретирани от рекомбинантния щам – леванзахараза и бета-галактозидаза, във връзка със синтезата на хетероолигозахариди.

Фруктоолигозахаридите, към които има нарастващ интетрес са широко използвани в хранително-вкусовата промишленост като нискокалорични функционални подсладители, поради техните пребиотични (Sivieri et al. 2014) и некариогенни свойства (Yun 1996), и способността им да подобряват усвояването на калций (Morohashi et al. 1998) и имунният отговор (Le Bourgot et al. 2014). Понастоящем търговско предлаганите ФОЗ, предназначени за консумация от човека са предимно от инулинов тип с β- (2,1) - връзки. Въпреки това in vitro експерименталните резултати показват, че ФОЗ съдържащи β- (2,6) гликозидни връзки проявяват по-голям пребиотичен ефект в сравнение с инулиновият тип ФОЗ (Kilian et al., 2002).

Получените от нас резултати успешно могат да се използват при разработване на технология за контролиран ензимен синтез на късоверижни фруктоолигозахариди със степен на полимеризация до 4. В зависимост от използваните акцептори могат да се получават олигозахариди с различни структури (кестоза, ерлоза, нистоза, лактозахароза). Всеки един от тях има специфични пребиотични свойства, различна степен на усвояемост от страна на полезната микрофлора в човешкия интестинален тракт и възможност да стимулира секрецията на нискомолекулни бактериоцини или да повлиява протеолитичната им система, водеща до получаването на биоактивни пептиди. Различната структура на потенциалните пребиотични фруктоолигозахариди предполага индивидуално повлияване на интестиналната микробиота, което е предпоставка за прилагането им в съвременната концепция за персонализирана медицина за превенция и лечение на различни заболявания.

И З В О Д И

1. Установени са оптималните условия за индуциране на експресията на гена, коди-ращ леванзахараза от щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm17 в рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17*–температура на култивиране за индукция на ензима18°C и опти-мална концентрация на индуктор 1 mM IPTG .

2. Оптимизирана е схема за пречистване на леванзахаразата от рекомбинантен щам *E.coli BL21LS17* при използване на афинитетна хроматография с колонаNi-Sepharoseколона His-Trap FF.

3. Доказана е преобладаваща трансферазна реакция (над 70%) от тоталната леванзахаразна активност при наличие в реакционната смес на акцепторите малтоза, лак-тоза и рафиноза, като максимална трансферазна активност е регистрирана от 79,8% при акцептор лактоза и съотношение захароза/лактоза 2,5:1.

4. Установено е, че Km на изследваната леванзахараза при начална концентрация на субстрат 292 mM захароза е 63 mM захароза, а Vmax е 6,34 mmol/min освободена глюкоза . При провеждане на ензимна реакция в присъствие на два субстрата заха-роза 292 mM и малтоза 146 mM Km е 44 mM захароза , а Vmax е 2,1 mmol/min ос-вободена глюкоза.

5. Установена е възможността за синтез на олигозахариди в присъствие на акцептори малтоза, лактоза, рафиноза, фруктоолигозахариди и галактоолигозахариди, като най-подхоящ акцептор е малтоза в концентрация 584 mM и съотношение захаро-за/малтоза – 1:2. Синтезират се основно тризахариди – 15,4% с предполагаема структура на ерлоза и тетразахариди - 5%.

6. Установено е, че при използване на 117 mM лактоза като акцептор 292 mM захароза като донор на фруктозни единици се синтезират основно тризахариди (16,3%) с предполагаема структура на лактозахароза.

7. Успешно е трансфериран гена за фруктозилтрансфераза от изходен щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm 17 в щам на *Lactobacillus plantarum.* Установени са оптималнитеусловия за култивиране на рекомбинантен щам *Lactobacillus plantarum* NC8 за секреция на леванзахараза – оптимална температура за индукция на секрецията

на ен-зима 30°C и оптимална концентрация на индуктор – 100 ng/ml, при което се получи активност 0,42 U/mg протеин.

8. Установени са оптималните условия за култивиране на рекомбинантен щам*Lactobacillus plantarum* NC8за секреция на леванзахараза–оптимална температураза индукция на секрецията на ензима 30°C и оптимална концентрация на индуктор – 100 ng/ml в биореактор, при което се получи активност 2,7 U/mg протеин.

П Р И Н О С И

Приноси с оригинален характер:

1.За първи път е получен рекомбинантен щам *Lactobacillus plantarumNC8FTF* , секретиращ леванзахараза с молекулна маса 120 kDa.

2.За първи път е доказана възможността за ензимен синтез на тризахариди в концентрация над 15% от леванзахараза в присъствие на лактоза като акцептор.

3.За първи път са охарактеризирани кинетичните параметри на леванзахаразната реакция в присъствие на акцептори и са установени до 30% по-ниски стойности на Km независимо от съотношението между донор и акцептор.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдено е, че най-подходящ акцептор при леванзахарази от *Leuconostocmesenteroides* е малтозата.

2. Потвърдена е преобладаващата трансферазна реакция на леванзахарази в при-съствие на различни захарни акцептори.

Публикации във връзка с дисертацията

1) A.S. Salim, V. P. Bivolarski, T. A. Vasileva, Ilia N. Iliev, (2017) Enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides by recombinant levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* Lm17, Bulgarian Chemical Communication, 49, SED, accepted;

2) Tonka Vasileva, Veselin Bivolarski, Galya Michailova, Ayshe Salim, Yavor Rabadjiev,Iskra Ivanova and Ilia Iliev (2016), Glucansucrases produced by fructophilic lactic acid bacteria *Lactobacillus kunkeei* H3 and H25 isolated from honeybees. J. Basic Microbiol. 56, 1–10;

Участия в национални и международни научни форуми

Международни научни форуми:

1. **Salim A.,** Vasileva T., Bivolarski V., Iliev I., Optimization of transfructosylationreaction for production of fructooligosaccharides catalyzed by recombinant levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* Lm 17 **(постер),5thInternational Conference on Novel Enzymes - 11 – 14 October 2016, Groningen, The Netherlands**

2. Vasileva T., Bivolarski V., **Salim A.,** Bozov P., Iliev I., Inhibitory effect of substances isolated from Bulgarian herbs on glycosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* strains **(постер), 4th International Conference on Novel Enzymes - 14 – 17 October 2014, Gent, Belgium.**

3. Bozov P, Mladenov R, Dimitrova I, Bivolarski V, Mihaylova G, **Salim A**, Vasileva T., Influence of extracts from *Mentha aquatica* L. and *Menthalongifolia* L. on the activity of glycosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* strains (постер); Vasileva T., Iliev I., Bivolarski V., Mihaylova G.,**Salim A**., Bozov P., Study of the Inhibitory effect of propolis extracts on theactivity of glycostltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* Lm28 and *Leuconosctoc mesenteroides* Lm17 strains**(постер), 3rd Balkan Scientific Conference on Biology - May 30th – June 1st, 2014, Plovdiv, Bulgaria.**

Национални научни форуми:

1. **Salim A.,** Bivolarski V., Vasileva T., Iliev I., Optimization of enzymaticsynthesis of fructooligosaccharides by levansucrase

from *Leuconostocmesenteroides* Lm 17**(доклад); Salim A.,**Vasilva T., Bivolarski V., RabadjievY., Ivanova I., Iliev I., Production of glycosyltransferases by fructophilic lactic acid bacteria isolated from honeybees **(постер);Първа национална докто-**
рантска конференция по Биология - 1 ноември 2016, Пловдив, България.

2. **Salim A.,** Vasileva T., Bivolarski V., Iliev I., Expression of levansucrase genefrom *Leuconostoc mesenteroides* Lm17 in *Lactobacillus plantarum***(постер);**
Национална конференция за млади учени „Биологически науки за по-добро бъдеще" – 30-31 октомври 2015, Пловдив, България.

"Optimization of enzymatic synthesis of oligosaccharides with glycosyltransferases from Leuconostoc mesenteroides"

Ayshe Seyhan Salim
(PhD thesis-SUMMARY)

The production of new bioactive oligosaccharides is currently attracting high interest for their potential use as functional components in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries(Rastall et al., 2010). Although FOS are found in trace amounts as natural components in many common foods, including onions, garlic, asparagus, tomatoes, bananas, wheat, and honey (Hogarth et al, 2000), commercial production can be achieved using fructansucrase or fructosyltransferase (FTF) enzymes from

different fungal and bacterial strains as an effective alternative to chemical synthesis (Sangeetha et al., 2005; 4, Kralj et al., 2008). According to the classification system for carbohydrate-active enzymes, bacterial FTFs belong to family 68 of the glycoside hydrolases (GH68)(http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/) (Coutinho & Henrissat, 1999).The enzyme fructosyltransferase (FS, EC 2.4.1.10) cleaves the glycosidic bond of the fructosyl-donor molecule (substrate, i.e., sucrose, raffinose, stachyose, verbascose) and uses the released energy to couple a fructose moiety to a growing fructan chain but also to sucrose or to another acceptor molecules (Meng and Fütterer, 2003, 2008; van Hijum et al., 2006; Teixeira et al., 2012).According to the type of the glycosidic linkages between fructosyl units in the synthesized fructans these enzymes are divided into levansucrases (EC 2.4.1.10) synthesizing levan with β-(2→6) linkages and inulosucrases (EC 2.4.1.9) synthesizing inulin with β-(2→1) linkages in the main chain (van Hijum et al,2006). Levansucrase catalyzes three distinct reactions depending on the fructosyl acceptor molecule:1) polymerization (using the growing fructan chain as an acceptor), 2) transfructosylation (using monosaccharides, disaccharides, or oligosaccharides as acceptors), and 3) hydrolysis (using water as an acceptor) (Li et al., 2015).

In the case of transfructosyltation reaction levansucrases enzyme can usedifferent sugar acceptor molecules such as maltose, lactose, cellobiose, melibiose, isomaltose, D-galactose, D-fructose, and D-xylose, which leads to the synthesis of fructo-oligosaccharides(Tieking et al.,2005).Currently commercial available FOSs for human consumption are exclusively inulin-type prebiotics with -(2-1)-linkages. However, the levan-type-FOSs, with -(2-6)-linked fructose and some -(2-1)-linked

branching, have demonstrated prebiotic effects, in vitro, that surpass inulin-type FOSs (Kelly et al,2008). The functional health attributes of prebiotic FOSs are dependent on their chemical structures, in particular the type of hexose moieties, the extent of polymerization and the glycosidic linkages.That's why it is important to characterize new enzymes, for production of fructoligosaccharides with diffrenet structure and biological activity.

In the first chapter of the present thesis is described the isolation and purification of recombinant levansucrase from strain E.coliBL21LS17. Kinetic parameters of the enzyme are determined. It was estimated that the main enzyme activity is transfructosylation activity, that was important for following use of this enzyme in acceptor reactions using different sugar acceptors (monosaccharides, di-, tri- and tetra-saccharides).

In the second chapter we studiedthe acceptor specifity of recombinant levansucrase isolated from E.coli BL21LS17 and we optimized the reaction

conditions for fructooligosaccharides synthesis (FOS). The best acceptors for FOS synthesis from the enzyme are maltose and lactose. Different parameters affect the amount of the synthesized FOS - acceptor concentration, enzyme concentration and reaction time.In order to optimize the yield of the synthesized FOS were used different concentrations of sucrose and the acceptors, and different enzyme concentrations. We estimated the optimal reaction conditions in presence of the acceptor molecules- maltose, lactose and raffinose to achieve high FOS yields. The highest amount FOS-synthesized are detected when the enzyme concentration in the reaction mixture is 0.5 U/ml and 1 U/ml. Higher enzyme concentration doesn't lead to increase the amount of FOS synthesis due to the inhibition of the enzyme activity from higher glucose concentrations at the early stages of the reaction.

In the third chapter of the thesis we described the cloning of levansucrase gene from Leuconostoc mesenteroides in Lactobacillus plantarum. Lactobacilli has been received great interest as a host organism for heterologous protein production due to their GRAS (Generally Regarded As Safe) status. Using pSIP system for heterologous protein expression and secretion in Lactobacilli, we achieved extracelullar levansucraseactivity 2,7 U/mg and secretion efficiency 94,1 % for Lb.plantarum NC8FTF, and extracellular levansucrase activity 0,9 U/mg protein and 86,5 % secretion efficiency for Lb.plantarum WCFS1FTF, respectively.