



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ“

Даниела Георгиева Моллова-Дошкова

Изследване влиянието на структурно-функционалните свойства на олигозахариди върху ензимната кинетика на микробиални гликозидхидролази, продуцирани от лактобацили, изолирани от микробиота на кърмачета

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“ по докторска програма „Биохимия, „Професионално направление 4.3, Биологически науки

Научни ръководители:

проф. д-р Илия Илиев

доц. д-р Тонка Василева

Пловдив, 2019

Дисертационният труд съдържа 156 страници на формат А4, 30 таблици и 74 фигури. В библиографската справка са включени 288 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.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедра „Биохимия и микробиология” към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски”, проведено на 09.07.2019г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски”.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

1. проф. дбн Искра Иванова
2. проф. д-р Иван Пищийски
3. доц. д-р Георги Добрев
4. доц. д-р Соня Костадинова
5. проф. д-р Илия Илиев

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 15.10.2019г. от 11 часа в зала „Компас“ на ПУ Паисий Хилендарски, ул. „Цар Асен“ 24, Пловдив

Изказвам най-сърдечни благодарности на научните си ръководители проф. д-р Илия Илиев и доц. д-р Тонка Василева за оказаната ми помощ и доверие при разработването на настоящата дисертация. Благодаря на всички колеги от катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“ за споделения опит, съвети и подкрепа.

Използвани съкращения

2'FL - 2'- фукозиллактоза

Fuc - фукоза

FucT - фукозилтрансфераза

Gal - галактоза

GalNAc - N-ацетил-D-галактозамин

Glc - глюкоза

GlcNAc - N- ацетилглюкозамин

GlcNAc - N-ацетил-D-глюкозамин

HMO - човешки млечни олигозахариди олигозахариди изолирани от кърма

LDFT – дифукозиллактоза

LNDFH - лакто-N-дифукохексаоза

LNFP – лакто -N-фукопентаоза

LNnT - лакто -N-новатетраоза

LNnH - лакто -N-новахексаоза

Neu5Ac - N-ацетилневраминава киселина

NeuAc - N-ацетилневраминава киселина

PBMCs - мононуклеарни клетки

PMNs - полиморфонуклеарни клетки

Sia - сиалова киселина

β 3GalT - D-N-acetylglucosamine β -3-галактозилтрансфераза

β 4GalT - D-N-ацетилглюкозамин β -4-галактозилтрансфераза

Fuc - фукоза

Gal – галактоза

NeuAc - N-ацетилневраминава киселина

Glc – глюкоза

Lf – лактоферин

HMO - човешки млечни олигозахариди

GIT - гастроинтестинален тракт

Man - маноза

Въведение

През последните години съпътстващата микробиота в човешкия организъм се възприема от някои изследователи като самостоятелна система на организма. Нарастващият интерес към изследване значението на баланса на микробиома в т.ч. и на гастро-интестиналния тракт, като специфична екологична ниша за здравословния статус на човека предопределя интензитета на научните изследвания при използване на интегриран интердисциплинарен подход. Тесните взаимоотношения между организма и гастроинтестиналната микрофлора може да са в основата и да бъдат критични по отношение на здравето на новороденото, както и по отношение на риска от развитие на различни други неинфекциозни заболявания.

Човешкото мляко притежава множество механизми за защита на новородените: чрез клетки на имунния отговор, имуноглобулини, вродени защитни протеини, пептиди, свободни мастни киселини, цитокини и хемокини, гликани и олигозахариди. Сред различните биоактивни компоненти на човешкото мляко, олигозахаридите са най-разпространените и включват повече от 100 различни биоактивни въглеводородни структури, изградени от 3 до 32 монозахарида. В човешкото мляко са открити 13 основни структури, изграждащи ядрото на отделните олигозахариди, към които впоследствие биват добавяни различен брой остатъци на L-фукоза и невраминова киселина.

Към настоящия момент се приема, че част от гастроинтестиналната микрофлора взема участие в разграждането на олигозахариди, открити в майчиното мляко до монозахариди, използвайки ги в последствие като въглероден източник или предоставяйки ги за синтетични реакции от страна на гостоприемника. „Ансамбълът“ от чревни микроби в човешкия организъм, усвояващ олигозахариди от кърмата, продуцира широк спектър от гликозидази, включително фукозидази, сиалидази, N-цетил галактозаминидази и галактозидази.

Огромен интерес представляват все още не добре проучените гликозидхидролази, продуцирани от представителите на род *Lactobacillus* и участващи в усвояването на олигозахариди от състава на кърмата. Подобни изследвания имат както чисто научен, така и научно-приложен принос при изследване на взаимовръзката структура-функция на олигозахаридите с пребиотичен потенциал.

Цел и задачи

Целта на настоящата дисертация е да се проучат ензимите, опосредстващи метаболизирането на олигозахаридите от майчина кърма, различни биологично активни захари и пребиотични олигозахариди, секретирани от щамове млечнокисели бактерии, изолирани от майчина кърма и от слюнка на новородени.

Целта се постига при решаване на следните **задачи**:

1. Изолиране и идентифициране на различни видове бактерии от майчина кърма и слюнка на новородени.
2. Скриниране на изолираните щамове бактерии по специфични пробиотични показатели и изследване на пробиотичния потенциал на селектираните щамове млечнокисели бактерии от майчина кърма и слюнка на новородени.
3. Оптимизиране протокола за изолиране и пречистване на олигозахариди от майчина кърма.
4. Изследване индукцията и динамиката на секреция на основните ензимни, отговорни за хидролиза на олигозахариди от майчината кърма при селектираните бактериални щамове от кърма и слюнка на новородени.
5. Изследване способността на изолираните щамове млечнокисели бактерии да усвояват пребиотични олигозахариди с различни структури.
6. Изследване корелацията между секрецията на ензимите, отговорни за хидролиза на олигозахариди от майчината кърма и тяхното метаболизиране при селектираните щамове млечнокисели бактерии от кърма и слюнка на новородени.
7. Сравнителен анализ на възможностите на селектираните щамове млечнокисели бактерии от кърма и слюнка на новородени да метаболизират олигозахариди от медицински растения.

Материали и методи

1. Микроорганизми.

1.1. Изследванията в настоящата дисертация са проведени основно с щамове изолирани от проби на майчина кърма, както и с щамове изолирани от проби от слюнка събрани от новородени на възраст от 24 h до 6 месеца.

2. Хранителни среди

- Среда на Man, Rogosa и Sharpe (MRS-broth, Merck, кат.№ 596470).
- Terrific broth (TB) с рН 7,2 (Terrific broth-Modified, Sigma кат.№ Т 0918).
- Месопептонен бульон, със състав (g/L): местен пептон – 5,0; дрождев екстракт – 3,0; рН на средата е $7.0 \pm 0,2$.
- Среда на Dols в състав (%): захароза – 4; дрождев екстракт – 2,0; K_2HPO_4 – 2,0; $MnSO_4$ – 0,1; рН 6,9.
- Модифициран MRS среда (mMRS) с 2% лактоза в състав (%) : лактоза – 5; Tween 80 – 0,1; амониев цитрат – 0,2; $CH_3COONa \times 3H_2O$ – 5,5; $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,01; $MnSO_4$ - 0,005; K_2HPO_4 – 0,2; месен екстракт – 1, пептон – 1; дрождев екстракт – 0,5. Бяха приготвени и други среди mMRS, в които само въглеродният източник беше заменен с 2% лактулоза, 2% галактоолигозахариди, 2% олигозахариди от кърма, 2% муцин, 2% фукоза и 2% фукозиллактоза.

3. Изолране на геномна ДНК от получените изолати

Екстракцията на тотална геномна ДНК се извърши с комерсиален кит DNeasy Blood & Tissue Kit (Quigen, Cat № 69504), съгласно инструкциите на производителя.

4. PCR-амплификация на гени за 16 S рибозомна РНК

Амплифицирането на гени за 16S рибозомна ДНК се извърши с използване на стандартни PCR праймери, генериращи фрагменти с дължина ~1500 бд: 8F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG), $T_m = 62,0^\circ C$ (Eurogentec); 15R (AAGGAGGTGATCCARCCGCA), $T_m = 66,0^\circ C$ (Eurogentec). Проведе се PCR при използването на SilverStar DNAPolymerase (Euro-gentec, Lot.№ BT-314110) и апарат Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, кат.№6331000017)

5. Секвениране на получените от PCR продукти

Секвенирането на продуктите всички получени от PCR продукти беше осъществено от Макроджен (Macrogen Europe Laboratory), Амстердам, Холандия.

Биоинформатичен анализ на получените резултати и съпоставка на получените секвенции беше осъществен чрез BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

6. *PCR за откриване на afcA гена кодиращ консервативен домейн в структурата на фукозидазните ензими.*

Геномна ДНК беше използвана като матрица при PCR- амплификацията на гена на afcA гена кодиращ консервативен домейн в структурата на фукозидазните ензими. Проведе се PCR при използването на SilverStar DNAPolymerase (Euro-gentec, Lot.№ BT-314110) и апарат Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, кат.№6331000017).

7. *Отчитане на клетъчния растеж.*

Клетъчният растеж се проследи чрез измерване на оптичната плътност (OD) на културалните среди при 600 nm на спектрофотометър Beckman coulter DU 800.

8. *Определяне на рН-стойностите.*

Киселинността се измерва с рН-метър W.T.W Sen. Tix 97T.

9. *Количествено определяне на белтък.*

Количеството на белтък се определи по метода наБрадфорд(Bradford, 1976).

10. *Дезинтегриране на клетки от изследваните щамове при анализ на ензимните активности*

Клетки се ресуспендира в охладен дезинтегриращ буфер и се подлагат на дезинтегриране с ултразвук (Tech-panUltrasonicDisintegratorUD – 20, Warsaw, Poland).

11. *Определяне на ензимна активност на β -галактозидаза (EC 3.2.1.23)*

Ензимната реакция се проведе чрез използване на хромогенен субстрат о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONP-Gal). Една еденица активност на ензима катализира получаването на 1.0 μ mol о-нитрофенол за една минута при рН 4.0 и 37°C. Съдържанието на о- нитрофенол се определя спектрофотометрично при 410nm дължина на вълната на спектрофотометър Beckman Coulter DU 800.

12. *Определяне активността на α -галактозидаза (EC 3.2.1.22)*

Ензимната реакция се проведе чрез използване на хромогенен субстрат р-нитрофенил α -D-галактопиранозид (PNP-Gal). Една еденица активност на ензима катализира получаването на 1.0 μ mol о-нитрофенол за една минута при рН 4.0 и 37°C. Съдържанието на о- нитрофенол се определя спектрофотометрично при 405nm дължина на вълната на спектрофотометър Beckman Coulter DU 800.

13. *Определяне активността на α -L – фукозидаза (EC 3.2.1.51)*

Ензимната реакция се проведе със субстрат - хромогенен р-нитрофенил α -L-фукопиранозид (PNP-FUC) (Sigma кат. № N3628). Една еденица активност на ензима

катализира получаването на 1.0 μmol о-нитрофенол за една минута при рН 4.0 и 37°C. Съдържанието на р- нитрофенол се определя спектрофотометрично при 405nm дължина на вълната на спектрофотометър Beckman Coulter DU 800.

14. Определяне активността на α -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.20)

Ензимната реакция се проведе със субстрат хромогенен р-нитрофенил α -D-глюкопиранозид. Една еденица активност превръща 1.0 μmole от р-нитрофенил α -D-глюкопиранозид в р-нитрофенол и D-глюкопиранозид за една минута при рН 6.0 и 37°C. Съдържанието на р-нитрофенол се определя спектрофотометрично при 405 nm дължина на вълната на спектрофотометър Beckman Coulter DU800.

15. Определяне активността на β -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.28)

Ензимната реакция се проведе със субстрат хромогенен р-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (ONP-Glu). Една еденица активност превръща 1.0 μmole от р-нитрофенил β -D-глюкопиранозид в р-нитрофенол и D-глюкопиранозид за една минута при рН 6.0 и 37°C. Съдържанието на р-нитрофенол се определя спектрофотометрично при 405 nm дължина на вълната на спектрофотометър Beckman Coulter DU 800.

*16. Частично пречистване на β -галактозидаза от щамове *L.fermentum* st 5 и *L.fermentum* st 22.*

Свежа биомаса 50 g от всеки от изследваните щамове се разрушават чрез ултрасонификация и утайката се отделя чрез центрифугиране (9000/ 15 min, 4 ° C) в натриево ацетатен буфер (100 mM, рН 6). Супернатантите са преципитирани с амониев сулфат. Пробите са лиофилизирани на лиофилизатор (Labcombo, USA).

17. SDS-полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE) и активно оцветяване с 4-метилумбелиферил- β -D-галактозид

Бета – галактозидазите се детектираха след SDS-PAGE по метода на Laemmli (Laemmli, U., 1970) при използване на 4 % концентриращ гел и 8 % разделящ гел на апарат miniVE Vertical Electrophoresis System (Amersham, USA). Активното оцветяване беше осъществено с използване на специфичен субстрат 4-метилумбелиферил- β -D-галактозид (Sigma) и детектирана посредством трансилюминатор и отчитане флуоресценцията на 4-метилумбелиферон.

18. Изолиране на олигозахариди от кърма

Процесът на изолиране на олигозахариди от кърма включва няколко стъпки. Първоначално след центрифугиране на пробите от при 5000 x g за 30 min при 4°C бяха отделени мазнините. Протеините бяха преципитирани чрез добавяне на два обема

абсолютен алкохол с които престоява 12h при 4°C и непрекъснато разбъркване. Етанолът се отделя под вакуум.

19. Антимикробна активност

Анализът за антибактериална активност на изпитваните щамове е проведен по метода на дифузия по (Tagg и McGiven, 1971; Bertrand-Harb et.al., 2003).

20. Хидролиза на НМОs, лактулоза и галактоолигозахариди от почиващи клетки

Клетки, след култивиране на mMRS с различни въглеродни източници се отделят чрез центрофугиране при 9000 об./мин. за 15 минути при 4°C и се промиват двукратно със 100 mM натриево ацетатен буфер с рН 6,0. Хидролизата протича при 37°C, като проби се вземат на различни времеви интервали и се анализират различните ензимни активности.

*21. Изследване на адхезивните способности на щамовете *L. fermentum st5* и *L. fermentum st22* изолирани от кърма към HT-29 и LS 180 клетъчни линии*

Бяха изследвани адхезивните свойства на щамовете *L. fermentum st5* и *L. fermentum st22* изолирани от кърма. Бяха използвани клетъчни линии HT-29 (ECACC 91072201; ATCC HTB-38; клетъчна линия изолирана от колоректален тумор) и муцин - продуциращата клетъчна линия LS 180 (ECACC 87021202).

22. HPLC анализ на олигозахариди.

Тоталното количество олигозахариди и разпределението им по степен на полимеризация се определиха чрез хроматографски анализ на HPLC, при използване на анионообменна колона CarboPac PA1 (250 mmx64 mm; Dionex) свързана към колона CarboPac1 Guard (Dionex), модел на апарата Konik HPLC 560, Konik-Tech. Използва се следният градиент: елуент А при 100% (0 min), 70% (10 min), 60% (25 min), 10% (80 min), 0% (83 min), 100% (91 min). Елуент А е 0,1 М натриев хидроксид и елуент В е 0,1М натриев хидроксид в 0,6 М натриев ацетат. Олигозахаридите се детектираха чрез рефрактометър модел Shodex RID-560.

Отделните продукти бяха идентифицирани в хроматограмите по метода, описан от Remaud-Simeon и съавтори (Remaud-Simeon, M. et al., 1994). Използваха се следните стандарти: захароза, малтоза, лактоза, лактулоза, арабиноза, глюкоза, фукозилactoza, галактоолигозахариди.

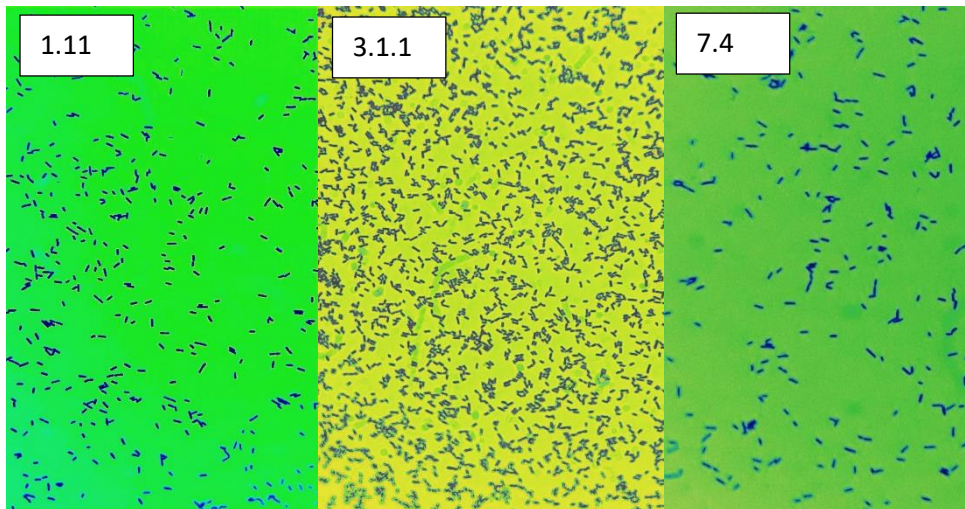
Всички резултати се обработиха при използване на софтуер Konikrom Plus Software Version 3.0.2.244.

Резултати и обсъждане

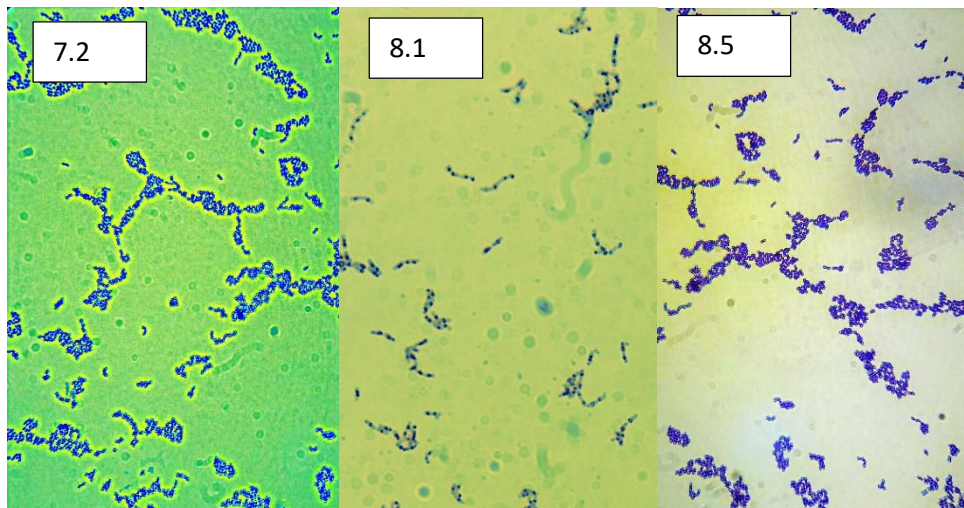
1. Скрининг на щамове млечнокисели бактерии от кърма и слюнка на новородени

1.1 Изолране на млечнокисели бактерии от кърма и слюнка на новородени

След посев на пробите на MRS и температура 37°C, бяха изолирани до чисти култури 124 изолата от кърма и 50 от слюнка на новородено. Част от изолатити бяха с пръчковидна форма а останалите бяха определени като коки (фиг 1,2). Всички изолирани щамове са Грам положителни, неспорообразуващи и дадоха отрицателна реакция за наличие на каталаза.



Фигура 1 *Картина на поле на светлинен микроскоп на изолирани микроорганизми с пръчковидна форма (Olympus CX 23)*



Фигура 2 *Картина на поле на светлинен микроскоп на изолирани микроорганизми с коковидна форма (Olympus CX 23)*

1.2. Биохимична характеристика на получените изолати

Всички изолати са култивирани на модифицирани среди mMRS с различни въглехидратни източници, с цел да се установи способността на всеки един от тях да ги метаболизира. Отделно се проведе скрининг на щамове с мукозен растеж при култивиране на среда на Dols, съдържаща захароза. Установи се, че всички изолати растат добре на MRS среда и имат способност да усвояват глюкоза. Приблизително 75% от изолатите от кърма усвояват лактоза в концентрации от 2 и 5 %. Приблизително 50% от изолатите усвояват захароза в концентрации от 2 и 5 %. Изолатите от слюнка показаха добри растежни характеристики на почти всички среди.

За по-нататъшно идентифициране чрез 16S РНК и секвениране бяха подбрани 28 изолата от кърма и 28 изолата от слюнка, които показаха растеж на MRS среда и на mMRS с 2% и 5% лактоза при OD над 1 на 24 час от култивирането и подкисляват средата до рН по-ниско от 4,5. Интересът ни към всички изолати е да установим потенциални пробиотични щамове млечнокисели бактерии, изолирани от кърма и слюнка на новородено.

1.3 Молекулярно биологична диагностика на получените изолати от майчина кърма и слюнка

За молекулярно биологичната диагностика и идентификация чрез 16S рРНК бяха подбрани 56 щама, от които 28 изолирани от кърма и 28 изолирани от слюнка. Беше проведено изолиране на тотална ДНК от изолатите по описаната методика в раздел „Материали и методи“. Така изолираната ДНК послужи за матрица при провеждане на PCR реакция за 16S рРНК.

С цел секвениране на получените продукти от проведените полимеразни реакции пробите бяха изпратени в Макроджен, Холандия. Получените секвенции анализирахме чрез използването на програмен продукт Geneious R9 и сравнени с базата данни от GenBank.

В таблица 1 и 2 са представени резултатите от BLAST, като са включени всички щамове показали процент на идентичност по-висок от 97. Приблизително 50 % от изолатите от майчина кърма бяха определени като представители на вид *Lactobacillus fermentum*, 30% на *Enterococcus faecalis*, 4% на *Bifidobacterium animalis*, 4% на *Enterococcus durans*, 4% на *Enterococcus faecium*, 4% на *Enterococcus lactis* и 4% на *Lactobacillus gasseri*. При изолатите получени от слюнка приблизително 54% бяха идентифицирани като представители на вид *Lactobacillus fermentum*, 21% като *Enterococcus faecalis* и 4% като *Lactobacillus gastricus*.

Таблица 1 Щамове показали най-високо сходство след BLAST със секвенциите за 16S рРНК на получените изолати от кърма

| Изолат | Секвенции показали значително съвпадение | Дължина на фрагмента | Е стойност | Идентичност |
|---------------|---|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| St 5 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain CBA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 780 | 0.0 | 98 |
| St 6 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain CIP 102980 16S ribosomal RNA, partial sequence | 554 | 0.0 | 98 |
| St 8 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain NBRC 16S ribosomal RNA, partial sequence | 456 | 0.0 | 98 |
| St 9 | <i>Enterococcus faecium</i> Strain DSM 20477 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 890 | 0.0 | 100 |
| St 10 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain CIP 102980 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 789 | 0.0 | 98 |
| St 14 | <i>Enterococcus faecium</i> Strain DSM 20477 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 675 | 0.0 | 97 |
| St 18 | <i>Enterococcus faecalis</i> Strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 458 | 0.0 | 98 |
| St 21 | <i>Enterococcus lactis</i> Strain BT159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 987 | 0.0 | 97 |
| St 22 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain CIP 102980 16S ribosomal RNA, partial sequence | 788 | 0.0 | 98 |
| St 23 | <i>Enterococcus faecalis</i> Strain NBRC 100480 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 856 | 0.0 | 97 |
| St 24 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain CIP 102980 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 990 | 0.0 | 97 |
| St 25 | <i>Lactobacillus gasseri</i> Strain ATCC 33323 16S ribosomal RNA, complete sequence | 987 | 0.0 | 97 |
| St 26 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain CIP 102980 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 687 | 0.0 | 98 |

Таблица 2 Щамове показали най-високо сходство след BLAST със секвенциите за 16S рРНК на получените изолати от слюнка

| Изолат | Секвенции показали значително съвпадение | Дължина на фрагмента | Е стойност | Идентичност |
|---------------|--|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| ss4 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain CAU:216 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 445 | 0.0 | 98 |
| ss5 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain 2-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 347 | 0.0 | 98 |
| ss7 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain K2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 678 | 0.0 | 98 |
| ss8 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain CAU:216 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 559 | 0.0 | 98 |
| ss10 | <i>Lactobacillus fermentum</i> Strain UN01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 779 | 0.0 | 98 |
| ss11 | <i>Lactobacillus gasticus</i> Strain SNUV175, complete genome | 892 | 1e ⁻²⁸ | 98 |
| ss20 | <i>Enterococcus faecalis</i> Strain Unknown26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 389 | 0.0 | 99 |

1.4 Въглехидратен профил API 20CHL

За проследяване на въглехидратният профил чрез API 20CHL анализ бяха избрани 8 изолата, 6 от тях изолирани от майчина кърма и 2 изолирани от слюнка на новородено. Осемте щама са щамове от род *Lactobacillus*, показали най-висок процент на идентичност след проведено секвениране и последващ биоинформатичен анализ. Беше използвана API 20CHL среда съгласно инструкциите на производителя (API SyStem, Bio-Merieux, Франция). Бактериалните изолати бяха идентифицирани чрез използване на компютърна програма, API LAB PLUS, софтуер версия 3.2.2 (BioMerieux) и препратка към определителя на Бърджи (таблица 3).

Таблица 3 Диференциална характеристика на някои от получените изолати от кърма и слюнка базирана на API 20 анализ

| изолати | St5 | St6 | St8 | St10 | St22 | St24 | Ss5 | Ss8 |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Субстрати | | | | | | | | |
| Glucose | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannitol | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lactose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Saccharose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Maltose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Salicin | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arabinose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Esculin | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cellobiose | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mannose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Melezitose | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Raffinose | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Rhaminose | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Trehalose | - | - | - | - | - | - | - | - |
| API идентификация | <i>L.fermentum</i> | <i>L.fermentum</i> | <i>L.fermentum</i> | <i>L.fermentum</i> | <i>L.fermentum</i> | <i>L.fermentum</i> | <i>L.fermentum</i> | <i>L.fermentum</i> |

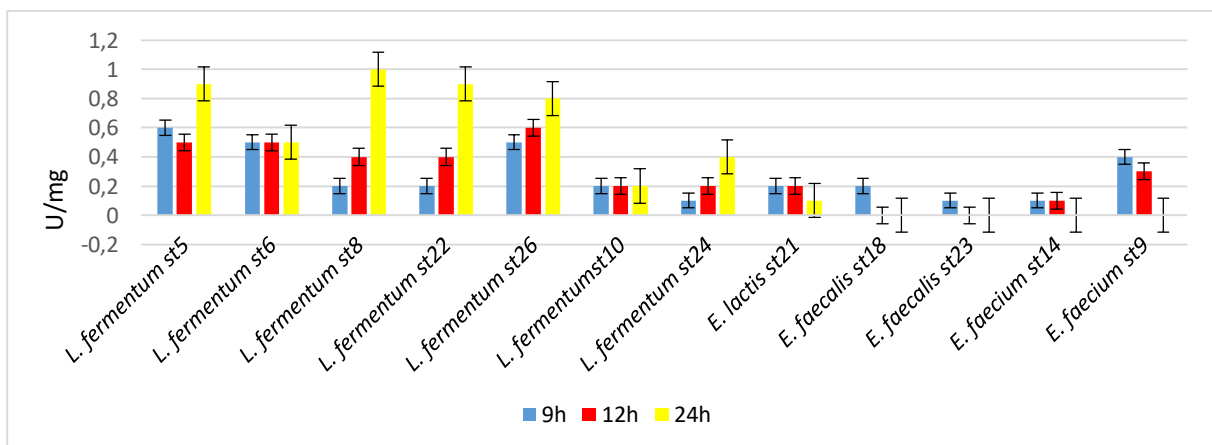
Всички изследвани осем щама се оказаха продуценти на газ при култивиране на среда съдържаща глюкоза и бяха определени като хетероферментативни. Всички щамове се оказаха аргинин положителни, всички успяват да ферментират маноза и не прораснаха при култивиране при 15°C. Всички осем щама бяха идентифицирани като *L.fermentum*.

2. Изследване ензимния профил на избраните щамове

2.1 Влияние на 2% лактоза върху активността на β -галактозидаза при изследваните щамове

На базата на проведената биохимично и молекулярно биологично идентификация на щамовете и предхождащите анализи върху метаболитните процеси бяха подбрани общо 19 щама изолирани от кърма и слюнка. Подбрани са щамове от всички установени видове бактерии с най-висок процент на идентичност, с най-добри растежни характеристики при култивиране на среди с различни въглеродни източници, както и тези показали антимикробна активност. Първоначално щамовете бяха култивирани на MRS среда, както и на mMRS с 2% лактоза, като се проследи количеството биомаса и ензимният профил в хода на ферментациите.

Проследи се динамиката на β -галактозидазната активност при 12 от изследваните щамове. На фиг. 3 са представени стойностите на клетъчносвързаната β -галактозидазната активност. Стойностите на ензимните активности в НУТ след култивиране на посочените щамове бяха значително по-ниски, което показва, че ензимът е клетъчносвързан.



Фигура 3 β – Галактозидазна активност на клетки от култивираните щамове след култивиране на среда съдържаща 2% лактоза

Изследвана беше α -галактозидазната активност при избраните 12 щама. При нито един от изследваните щамове от род *Enterococcus* не беше установена α -галактозидазна активност. Максимално отчетената специфична активност е 0.3 U/mg белтък при някои от изследваните щамове лактобацили, което е от 2 до 3 пъти по-ниска

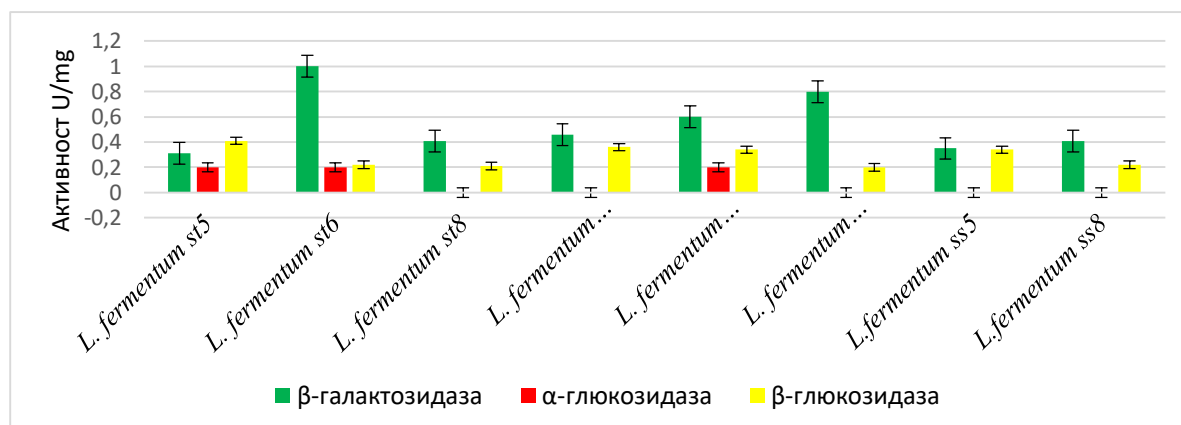
стойност спрямо измерената при тях β -галактозидазна активност. Отчетената ниска активност на α -галактозидаза в началните часове от култивирането на среда с 2% глюкоза ни дава основание да предположим конститутивния характер на ензима при тези изследвани щамове. Като цяло активността на този ензим е 2 до 3 пъти по-ниска от тази на β -галактозидазата на субстрат лактоза, което е обяснимо с индуцируемия характер на втория ензим.

2.2 Метаболизиране на галактоолигозахариди (GalOs), лактулоза и олигозахариди от кърма (HMOS) от изследваните щамове изолирани от кърма и слюнка на новородени.

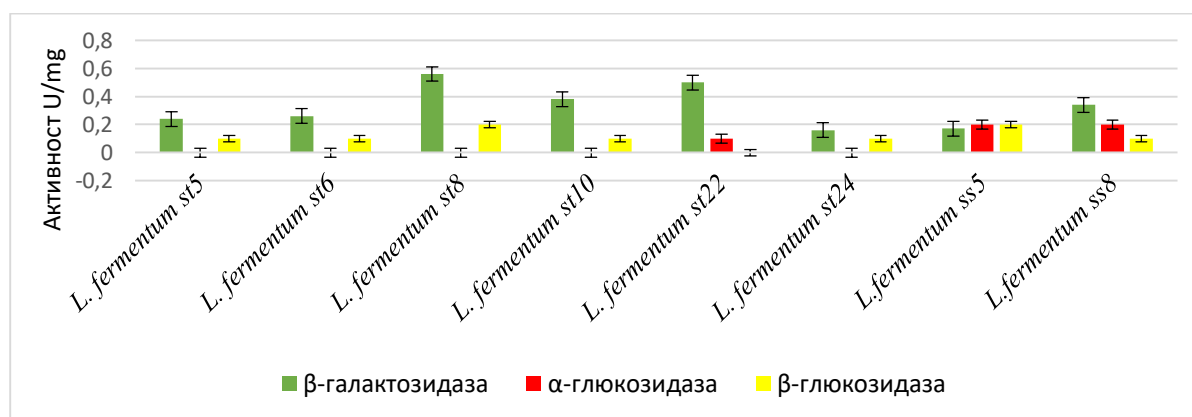
Ние избрахме да изследваме степента на усвояване на лактулоза, галактоолигозахариди и олигозахариди, изолирани от майчина кърма от 8 подбрани щамове лактобацили, предварително идентифицирани с 16S РНК и API идентификация и показали максимална корелация между клетъчен растеж на среда с 2% лактоза β -галактозидазна активност при предишни култивирания. Шест от щамове *L. fermentum St5*, *L. fermentum St6*, *L. fermentum St8*, *L. fermentum St10*, *L. fermentum St22* и *L. fermentum St24* са изолати от кърма, а два щамове - *L. fermentum ss5* и *L. fermentum ss6* бяха изолирани от слюнка на новородени. За да проследим техния пробиотичен потенциал определихме и някои по-важни ензимни активности, свързани с метаболизирането на галактоолигозахаридите, лактулозата и се явяват основни ензими при усвояването на олигозахариди от кърма.

Основната отчетена тенденция е, че се наблюдава щамово зависима възможност при усвояването на изследваните захари. Най-висока специфична β – галактозидазна активност е отчетена при щам *L. fermentum St5* (2.4 U/mg) и при щам *L. fermentum St22* (2,0 U/mg) при култивиране на среда, съдържаща НМОs. Така НМОs се явяват най-силният индуктор за транскрипцията на гените, кодиращи β – галактозидаза и последваща транслация и секреция на ензима в активна форма. Най-високи стойности на α - глюкозидазна активност бяха отчетени при щамове *L. fermentum St5*, *L. fermentum St6* и *L. fermentum St22* (0,2 U/mg) на 12h от началото на култивирането на среда съдържаща 2% галактоолигозахариди. Най-високи стойности на β – глюкозидазна активност (0.36 U/mg) бяха отчетени след култивиране на осемте щамове *L. fermentum* на среда съдържаща 2 % галактоолигозахариди и 2% олигозахариди от кърма (HMOS). От получените резултати става ясно че най-силен индуктор за секрецията и наличието едновременно на β – галактозидазна, β – глюкозидазна и α - глюкозидазна активност се явява присъствието на 2% галактоолигозахариди в средата за култивиране.

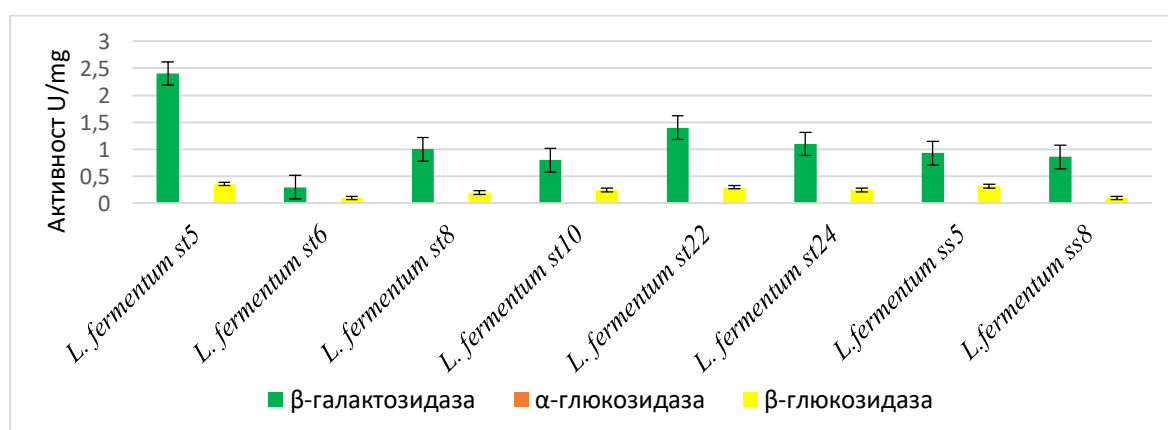
На фиг 4, 5 и 6 е представена съпоставка на трите изследвани ензимни активности след култивиране в среди с различни въглеродни източници.



Фигура 4 Сравнение между β -галактозидазна, β -глюкозидазна и α -глюкозидазна ензимна активност след култивиране на 2% галактоолигозахариди.



Фигура 5 Сравнение между β -галактозидазна, β -глюкозидазна и α -глюкозидазна ензимна активност след култивиране на 2% лактулоза.



Фигура 6 Сравнение между β -галактозидазна, β -глюкозидазна и α -глюкозидазна ензимна активност след култивиране на 2% олигозахариди от кърма.

Видовете на род *Lactobacillus* са част от микробиома в стомашно-чревния тракт и други мукозни повърхности при хората. Този род включва щамове от различни видове с голям потенциал за пробиотични свойства. Други микроорганизми, спадащи към

полезната микрофлора принадлежат към *Bifidobacterium*, род почти изключително свързан с чревната микрофлора. Тъй като полезните микроорганизми трябва да оцелеят в специфична екологична ниша и да бъдат метаболитно активни на целевите си места, а именно повърхности на лигавицата на гостоприемника, метаболизирането на произведения от лигавицата гликани е ключов фактор за тяхното оцеляване и активност. Способността за метаболизиране на гликани, като олигозахариди на човешкото мляко (НМОs), гликозо-аминогликани и гликанови остатъци на гликопротеини и гликолипиди, открити на повърхността на лигавицата, дава конкурентно предимство на лактобацилите и бифидобактериите (Vitelio et al., 2019).

Лактулозата е синтетичен дизахарид, състоящ се от галактоза и фруктоза. Той се използва за симптоматично лечение на констипация в дози от 10 до 30 g на прием и лечение на портална системна енцефалопатия в дози от 60 до 100 g. Освен това, по-ниски дози от 10 g лактулоза се използват като функционална хранителна съставка. Лактулозата не се усвоява, нито се абсорбира от горната част на стомашно-чревния тракт. След като достигне дебелото черво, тя се ферментира от микробиотата и служи като пребиотичен субстрат за увеличаване броя на *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, както и спомага за получаването на метаболити като късоверижни мастни киселини (SCFA) (Aguirre et al., 2014).

За разлика от бифидобактериите, употребата на НМОs от щамове на род *Lactobacillus* е относително неизследвана област и капацитетът за използване на този въглероден източник изглежда доста ограничен. Геномите на чревните лактобацили обикновено носят голям набор от гликозидхидролази (Pridmore et al., 2004; Altermann et al., 2005; Azcarate-Peril et al., 2008), но те вероятно са отговорни за хидролизата на въглехидрати, получени от хранителната диета. Основните ензими, участващи в разграждането на НМО са β -галактозидаза, фукозидаза, сиалидаза, лакто - N – фосфорилаза и β -хексозаминидаза (Fanaro et al., 2009).

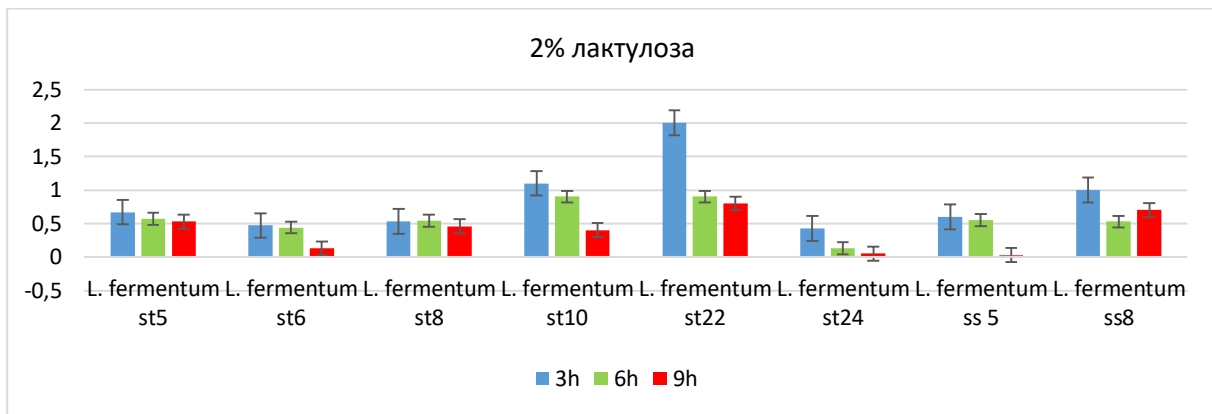
Повишеният интерес към галактоолигозахаридите (GOS) от различни автори се дължи до голяма степен на способността им да устоят на условията на храносмилането в проксималните отдели на стомашно-чревен тракт (GIT). Повече от 90% от GOS са на разположение за бактериална ферментация в дисталните отдели на стомашно-чревния тракт. При някои проучвания е установено, че добавянето на GOS към диетата и храната корелира с увеличение на фекалните бифидобактерии и лактобацили при кърмачета и възрастни (Ben et al., 2008, Fanaro et al., 2009). Някои изследвания са показали съответно по-ниско фекално рН след добавяне на GOS, вероятно поради увеличаване на

производството на ацетат и / или лактат, поради засилен клетъчен растеж на бифидобактерии и лактобацили. (Ben et al., 2008, Fanaro et al., 2009)

2.3 Доказване индуцируемият характер на β -галактозидазата в присъствие на 2% лактулоза, 2% галактоолигозахариди и 2% НМОs при почиващи клетки

Интерес представляваше проследяването в динамика на ензимните активности при подбраните щамове при използване на т.нар. почиващи клетки от тях. Беше проследена хидролизата на посочените захари под действие на ензима β -галактозидаза. Резултатите са представени на фигури 7, 8 и 9.

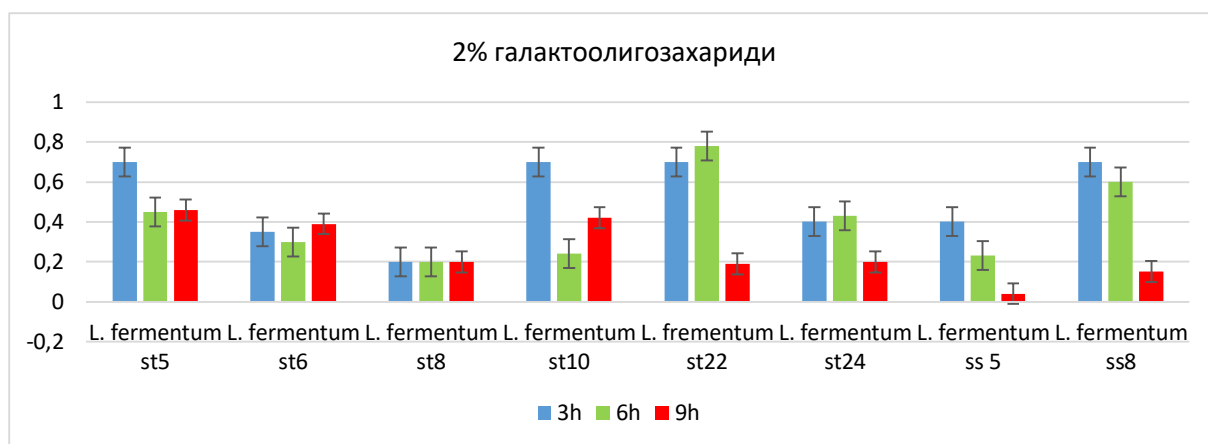
В присъствие на лактулоза активността на β - галактозидазата варира силно при различните щамове. Най- висока β - галактозидазна активност беше отчетена при щам *L. fermentum* St22 в присъствие на 2% лактулоза на третия час от началото на процеса, 2 U/mg белтък.



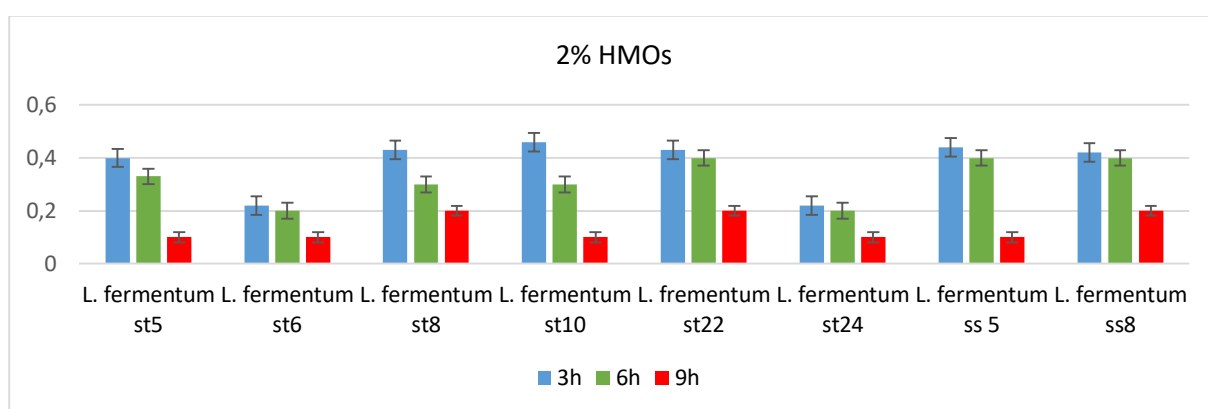
Фигура 7 β - Галактозидазна активност при почиващи клетки култивирани на 2% лактулоза

В присъствие на 2% галактоолигозахариди при всички изследвани щамове се запазва тенденцията за най-висока β -галактозидазна активност на 3-я час от началото на култивирането и последващото ѝ редуциране до 9-я час на култивиране. Единствено при щам *L. fermentum* St22 максималната активност от 0,78 U/mg белтък е отчетена на 6-я час от началото на процеса. При щамове *L. fermentum* St5, *L. fermentum* St10, *L. fermentum* St22 и *L. fermentum* ss8 е регистрирана максимална ензимна активност от 0,7 U/mg белтък на 3-я час от процеса. Сравнена с активността при 2% лактулоза тя е между 2 до 3 пъти по-ниска.

В присъствие на 2 % НМОs най-високи стойности на β - галактозидазна активност бяха отчетени на 3 h от началото на процеса (0,4 – 0,46 U/mg белтък) и постепенно се отчита намаляване на активността с времето. Тя, обаче е 4-5 пъти по-ниска от измерената активност при лактулоза.



Фигура 8 β - Галактозидазна активност при почиващи клетки култивирани на 2% галактоолигозахариди



Фигура 9 β - Галактозидазна активност при почиващи клетки култивирани на 2% олигозахариди от кърма

Усвояването и транспорта на галактоолигозахариди от млечнокиселите бактерии е слабо проучено. Вероятният механизъм за усвояването им е чрез ензимна хидролиза с участието на β -галактозидазата. Активността на β -галактозидазата в родовете *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Leuconostoc* е локализирана в цитоплазмата (Nguyen, et al., 2007). Резултатите от нашите изследвания показват стимулиране секрецията на β -галактозидазата при култивиране на изследваните щамове на среда с галактоолигозахариди.

2.4 Изследване на ензими, хидролизиращи НМОs

Разграждането на различни пробиотични олигозахариди, включително гликопротеини свързани към муцин, както и олигозахариди налични в кърмата и оказващи огромно влияние при колонизирането на различни бактериални видове в храносмилателните отдели при новородените се осъществява от специален набор от ензими (β -галактозидаза, фукозидаза, β -хексозаминидаза, лакто-N-фосфорилаза и сиализидаза) (Sela et al., 2011).

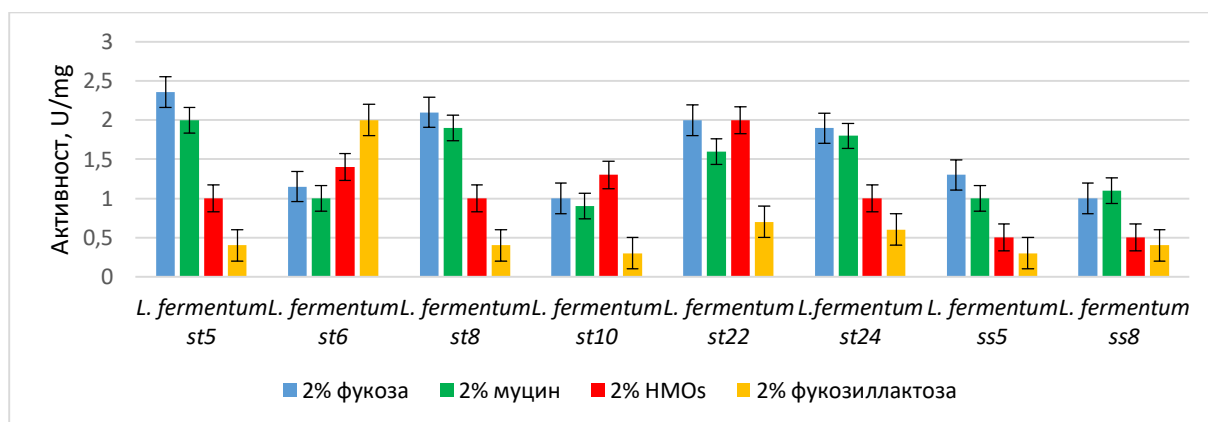
В тази връзка ние изследвахме подобраните по-рано 8 щама *L. fermentum* за наличие на фукозидазна активност. Едновременно с това потърсихме корелация между β - галактозидазната и фукозидазна активност в присъствие на различни субстрати.

След култивирането на щамовете в среда, съдържаща като въглероден източник глюкоза и в такава съдържаща лактоза беше изследвана фукозидазната активност в НУТ по отделно в двата случая с цел да се установи наличието на този ензим и евентуално дали той е екстрацелуларен или клетъчносвързан. В резултат на проведеното изследване не бяха отчетени активности при почти всички проби, с малки изключения, при които отчетените активности попадаха в границите на статистическа грешка поради ниските стойности.

С цел да се индуцира максимално експресията на предполагаемите налични гени, кодиращи фукозидаза и неговата последваща секреция, щамовете се култивираха на среди, съдържащи съответно 2% фукоза, 2% муцин, 2% НМО и 2% фукозиллактоза. В НУТ при всички щамове не бяха отчетени активности, за разлика от резултатите при изследване на клетките, където беше отчетено разграждане на специфичния за α -фукозидазата субстрат α -L-фукопиранозид. Резултатите показват наличие на клетъчносвързан ензим. Най-високи стойности бяха отчетени при щам *L. fermentum St5* след култивиране на среда с L-фукоза, 2,36 U/mg белтък специфична ензимна активност. От получените резултати може да се заключи, че експресията на фукозидазните гени и последваща секреция на ензима е силно зависима от наличието на специфичен субстрат, като L-фукоза например. Тризахаридът фукозиллактоза е синтезиран от генно-модифициран щам, получен след прехвърляне на гени, кодиращи трансферазни ензими. Структурата на тризахарида е получена след трансфериране на L-фукоза към лактоза посредством α -1,2 – гликозидна връзка. В следващите изследвания проверихме дали фукозиллактозата е подходящ субстрат за индуциране на α - фукозидаза от изследваните щамове. Наличието на L-фукоза в тризахарида фукозиллактоза не повлиява до такава степен секрецията на ензима. Това може да бъде обяснено с наличието на повече от един фукозидазен ензим, участващ в процеса на усвояване на тези захари, които се индуцират от различни субстрати, притежаващи специфични гликозидни връзки. (Stülke et al., 2018)

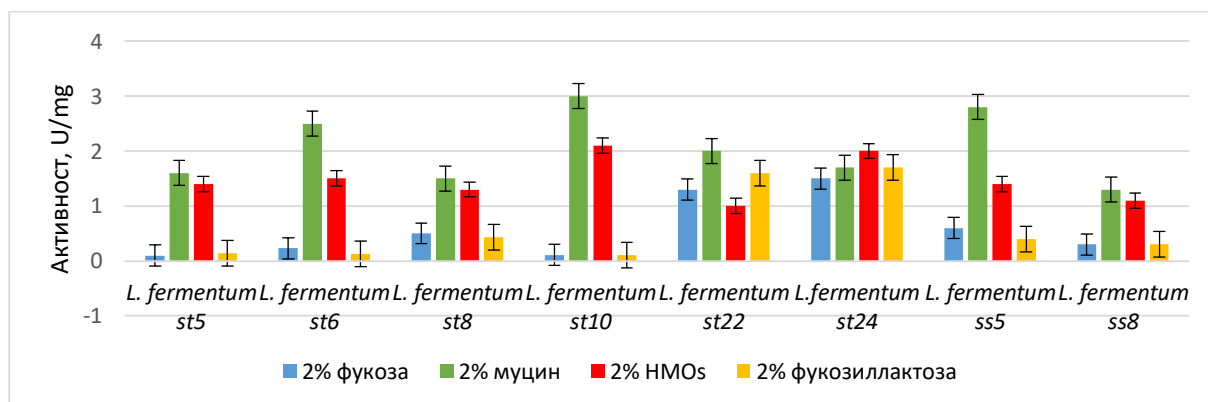
Най-висока α -фукозидазна активност след култивиране с муцин беше отчетена отново при щам *L. fermentum St5* (2,0 U/mg белтък), докато след култивиране на среда съдържаща НМО най-висока активност беше отбелязана при щам *L. fermentum St 22* (2,0 U/mg белтък) (фиг. 10). Ако трябва да класираме четирите субстрата като индуктори на α -фукозидаза, то редът е фукоза и муцин в еднаква степен индуцират секрецията, следва

НМО с известна условност и накрая фукозиллктозата, при която почти 4 пъти е измерената активност. От друга страна резултатите показват висока щамова зависимост при индуциране на α -фукозидазата.



Фигура 10 α - Фукозидазна активност на клетки при отделните щамове

По отношение на β -галактозидазната активност се установи, че най-ниска е тя при щам *L. fermentum* St5, който показва най-висока фукозидазна активност след култивиране на 2% фукоза.(таблица 20) Като цяло най-високи стойности на β -галактозидаза бяха отчетени при изследваните щамове след култивиране на муцин и олигозахариди изолирани от кърма (фиг 11).



Фигура 11 β -Галактозидазна активност на клетки при отделните щамове

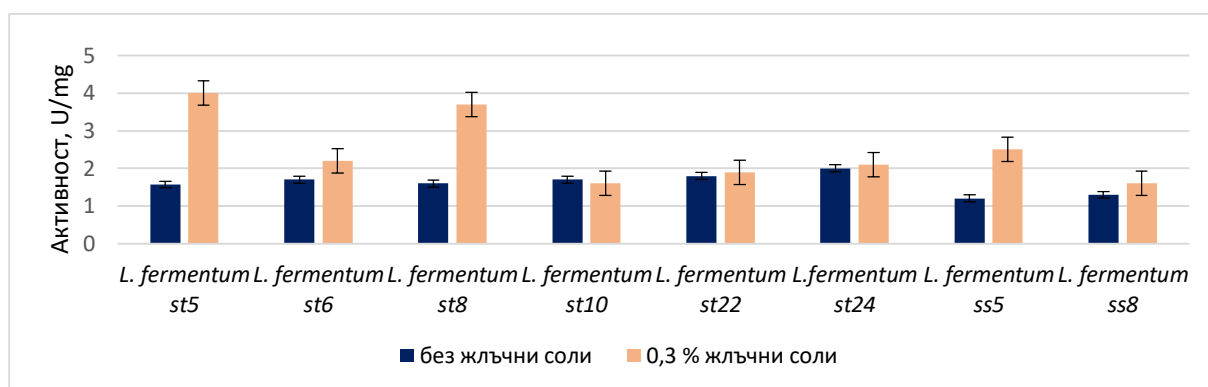
За целите на изследването и като въглероден източник за едно от култивиранията използвахме продукт 2-фукозиллактоза (2'-FL), предоставена от Фрисланд, Холандия. Продуктът е със следното съдържание: 2'- фукозиллактоза -93%, лактоза- 0.5%, алолактоза-1%, глюкоза < 0.1 %, галактоза < 0.1 %, фукоза 0.2%, протеин <0.01%, нитрит 0.1 mg/kg, нитрати 0.9 mg/kg.

Фукозиллактоза (2-FL), най-разпространеният фукозилиран олигозахарид в човешкото мляко, привлече голям интерес като функционална хранителна съставка поради неговите хранителни и фармацевтични свойства. Поради оскъдното съдържание

на 2-FL в кърмата е твърде скъпо да се получи 2-FL директно от човешкото мляко (Petschacher et al., 2016).

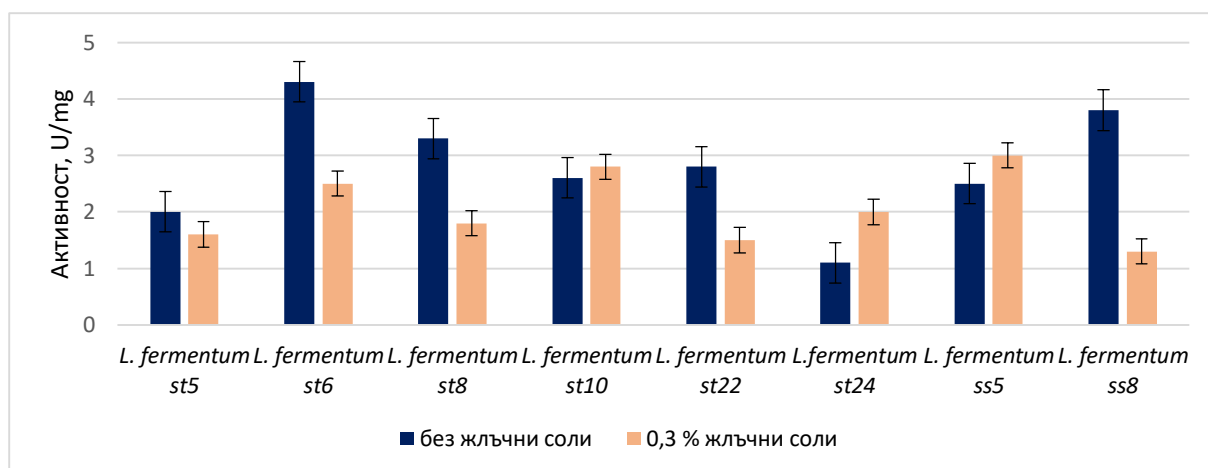
Жлъчните соли играят важна роля във физиологията на чревните бактерии, като по този начин обуславят тяхната функционалност. Това е особено важно за пробиотичните бактерии, тъй като техният полезен ефект трябва да се генерира в присъствието на тази биологична течност (Duary et al., 2012).

Ние проследихме корелацията между α -фукозидазната и β -галактозидазна активност при осемте изследвани щамове *L. fermentum* след култивиране на среда съдържаща 2% муцин и 0.3 % жлъчни соли. От резултатите се вижда, че α -фукозидазната активност при почти всички щамове е по-висока, когато те са култивирани на среда съдържаща 0.3% жлъчни соли. Особено ясно изразено е това при щамовете St 5 и St 8, при които фукозидазната ензимна активност е почти 2 пъти по-голяма в присъствие на жлъчни соли в средата за култивиране. (Фиг. 12)



Фигура 12 α -Фукозидазна активност при отделните щамове, култивирани на среда с 2% муцин и жлъчни соли.

По отношение на β - галактозидазата значително по-високи стойности на ензимна активност бяха отчетени в присъствие в средата на жлъчни соли само при щам *L. fermentum* St 24, докато при останалите се наблюдава инхибиране на ензима (Фиг. 13). Подобни резултати получават и други автори, а именно че при наличие на ниски концентрации жлъчни соли в средата за култивиране води до по-висока индукция на секрецията на фукозидаза. Duary и съавтори установяват, че гени, кодиращи повърхностно свързани протеини, такива като мукус свързващия протеин и други при изолати на *L. plantarum* се свръхекспресират когато към растежната среда са били добавени смес от муцин (0.05%) и жлъчка (1%) (Duary et al., 2012).



Фигура 13 β -Галактозидазна активност при отделните щамове, култивирани на среда с 2% муцин и жлъчни соли.

2.5 Изследване на катаболитната репресия при избраните щамове

Повечето бактерии могат селективно да използват субстрати от смес с различни въглеродни източници. Наличието на предпочитани източници на въглерод предотвратява експресията и често също активността на катаболните системи, които позволяват използването на вторични субстрати. Този принцип, наречен въглеродна катаболитна репресия (CCR), може да бъде постигнат чрез различни регулаторни механизми, включително активиране и репресия на транскрипция и контрол на трансляцията от РНК-свързващи протеини при в различни бактерии. Освен това, CCR регулира изразяването на фактори на вирулентност при много патогенни бактерии. Повечето бактерии могат да използват различни съединения като източници на въглерод. Тези източници на въглерод са обикновено такива, които позволяват най-бърз растеж. За да изследваме приоритетното усвояване на конкретните захари, както и промяната в стойностите на α -фукозидазната и β -галактозидазна активност ние култивирахме изследваните щамове в среди съдържащи съответно 8% лактоза + 0,8% FL, 8% лактоза + 0,8% муцин и 2% муцин. Заедно с щамове *L. fermentum* изследвахме и други щамове от различни видове лактобацили с пробиотични свойства за възможността да усвояват тези въглеродни източници и за наличие на α -фукозидазна активност.

На таблица 4 се вижда, че стойностите на β -галактозидазна активност при култивиране на среда съдържаща 8% лактоза + 0,8% FL се движат от 0.5 до 1.3 U/mg, докато фукозидазна активност почти не беше отчетена с изключение на няколко щамове *L. fermentum* (St 8, St 10, St 24, Ss5). При нито един от останалите щамове лактобацили не беше установена такава активност.

При култивиране в присъствие на 8% лактоза + 0,8% муцин бяха отчетени стойности на β -галактозидаза от 0.6 до 1.1 U/mg белтък и отново сравнително ниски стойности на α -фукозидазна активност при същите щамове *L. fermentum* (St 10, St 24, Ss5). Фукозидазна активност не беше отчетена при нито един от останалите щамове. От проведеното изследване става ясно, че ниските концентрации на муцин и фукозиллактоза, вложени в средата за култивиране не са достатъчно добри индуктори за α -фукозидаза. Почти еднаквият ензимен профил на двата типа култивиране показва, че лактозата е предпочитаната захар от конкретните щамове и най-вероятно главният индуктор за секрецията на β -галактозидаза.

Таблица 4 α -Фукозидазна и β -галактозидазна активност при култивиране на щамовете в среди с различни комбинации от въглеродни източници.

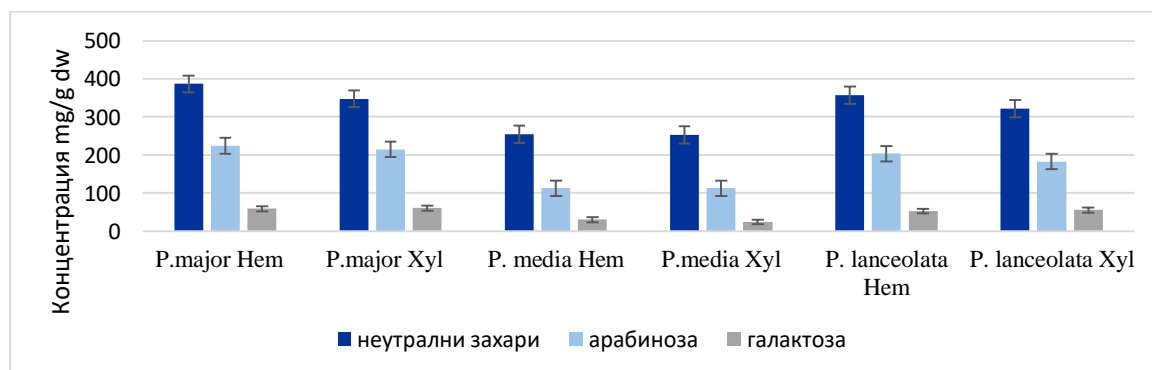
| щамове | 8% лактоза + 0,8% фукозиллактоза | | 8% лактоза + 0,8% муцин | | 2% муцин | |
|-------------------------------|----------------------------------|------------|-------------------------|------------|--------------|------------|
| | β -Gal | Fucosidase | β -Gal | Fucosidase | β -Gal | Fucosidase |
| <i>L. fermentum st 6</i> | 1,0 | 0 | 0,9 | 0 | 0,5 | 0,1 |
| <i>L. fermentum st 8</i> | 1,2 | 0,1 | 1,1 | 0 | 0,7 | 0,1 |
| <i>L. fermentum st 10</i> | 0,8 | 0,1 | 0,6 | 0,2 | 0,5 | 0,6 |
| <i>L. fermentum st 24</i> | 0,9 | 0,3 | 0,8 | 0,4 | 0,4 | 0,7 |
| <i>L. fermentum ss 5</i> | 0,9 | 0,2 | 0,9 | 0,1 | 0,6 | 0,4 |
| <i>L. fermentum ss 8</i> | 1,1 | 0 | 1,2 | 0 | 0,2 | 0,5 |
| <i>S. thermophilus st 229</i> | 0,5 | 0 | 0,8 | 0 | 0,5 | 0 |
| <i>L. acidophilus N</i> | 0,9 | 0 | 1,0 | 0 | 0,2 | 0 |
| <i>L. bulgaricus L 14</i> | 0,8 | 0 | 0,9 | 0 | 0,1 | 0 |
| <i>S. thermophilus st 226</i> | 1,3 | 0 | 1,2 | 0 | 0,1 | 0 |
| <i>L. brevis 27</i> | 1,1 | 0 | 1,0 | 0 | 0,2 | 0,05 |
| <i>L. plantarum 30</i> | 0,9 | 0 | 1,0 | 0 | 0,1 | 0 |
| <i>L. plantarum 26</i> | 1,2 | 0 | 1,1 | 0 | 0,1 | 0 |

По-различна е ситуацията при култивиране на щамовете в присъствие единствено на 2% муцин в средата. Тук стойностите на β -галактозидазна активност бяха сравнително по-ниски при почти всички изследвани лактобацили, но фукозидазна активност беше отчетена при щамове от слюнка на новородено и от майчина кърма (*L. fermentum ss5* и *L. fermentum ss8*). При нито един от останалите щамове не беше отчетена такава активност. При три щамове *L. fermentum* (St 10, St 24, Ss8) беше отчетена по-висока α -фукозидазна активност в сравнение с β -галактозидазната.

При щамовете *Streptococcus thermophilus* St 229, *Streptococcus thermophilus* St 226, *Lactobacillus acidophilus* N, *Lactobacillus brevis* 27, *Lactobacillus plantarum* 30 и *Lactobacillus plantarum* 26 не беше отчетена α -фукозидазна активност при нито един от вариантите на култивиране. Вероятната причина е липсата на гени, отговорни за

секрецията на фукозидазни ензими. Посочените щамове показаха пробиотични свойства при предхождащи изследвания. Те показаха възможност да усвояват различни олигозахариди като галактоолигозахариди, фруктоолигозахариди, ксилоолигозахариди, глюкоолигозахариди. При това се установиха и индуциране секрецията на различни ензими, отговорни за разграждането на специфичните структури на използваните олигозахариди. Доказа се индуцираният характер на β -глюкозидаза, β -ксилозидаза и ксиланаза при култивиране на ксилоолигозахариди.

Изследвахме пластичността на един от използваните щамове с доказан пробиотичен потенциал *L. plantarum* 30 по отношение на въглехидратния метаболизъм при култивиране на среди с пребиотични олигозахариди с различен произход. В случая използвахме олигозахариди, получени след ензимен хидролиз на полизахариди от живовлек. Известно е, че полизахаридите от живовлек се използват в традиционната медицина за преодоляване на обострени състояния на стомашно-чревния тракт (гастрити, колити). За сравнение изследвахме възможността на един от посочените щамове *L. plantarum* 30 да усвоява захари, съдържащи се в хидролизати от сухи листа на три вида живовлек (*P. major*, *P. lanceolata*, *P. media*), получени след ензимен хидролиз. Концентрацията на общите захари в хидролизатите на листата на *Plantago* варира от 252,06 до 386,71 mg / g dw, намалявайки в следния ред: *P. Major* > *P. lanceolata* > *P. media*. Хемичеселулазните хидролизати на листата на трите вида *Plantago* показват по-висока захарна концентрация в сравнение с ксиланазните хидролизати. Основните въглехидрати в хидролизатите са галактоза и арабиноза в съотношения 1: 3 и 1: 4 (фиг. 14). Най-високото разграждане на полизахаридните вериги е постигнато под въздействие на ензима хемичеселулаза, като концентрацията на арабиноза в получените изолати е до 223.97 mg / g dw, а концентрацията на галактоза е 58.86 mg / g dw.



Фигура 14 Концентрация на тоталните неутрални захари, арабиноза и галактоза в хидролизати на *P. major*, *P. media* и *P. lanceolata* след въздействие с хемичеселулаза (Hem) и ксиланаза (Xyl).

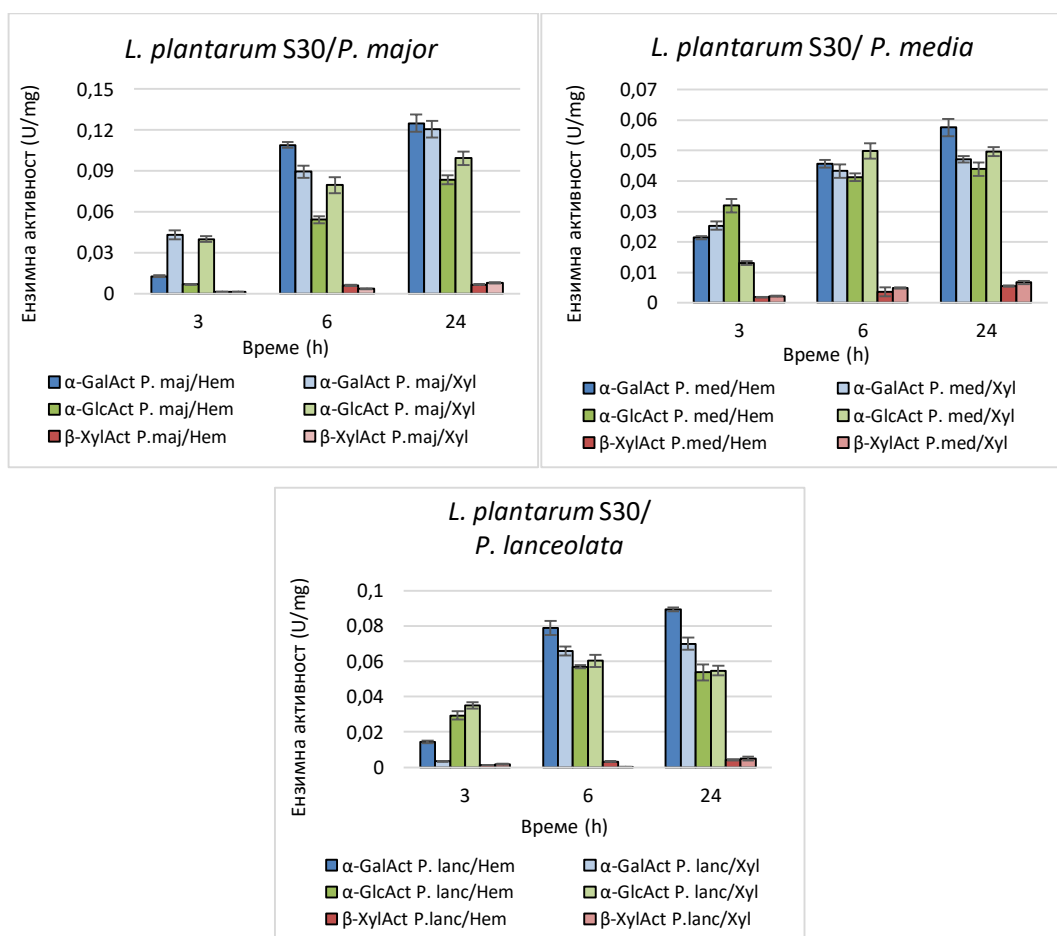
В присъствието на различни олигозахариди и дизахариди като субстрати, лактобацилите продуцират различни гликохидролазни ензими за техния метаболизъм. Метаболизирането на хидролизати от *Plantago* spp. се установи чрез измерване на клетъчния растеж, производството на различни крайни продукти и активността на α -галактозидаза, α -глюкозидаза и β -ксилозидаза от тестваният щам щамове на *L. plantarum* 30. Резултатите показват, че щамът специфично метаболизира въглехидратния състав, когато се култивира в mMRS среда в присъствието на 10% хидролизати от сухи листа от вида *Plantago* (Таблица 5).

Таблица 5 Стойности на оптична плътност (OD), продукция на лактат, ацетати етанол от щамове *L. plantarum* S26, *L. plantarum* S27 и *L. plantarum* S30, след култивиране на среда с 10% хидролизати от сухи листа на *P. major*, *P. media* и *P. lanceolata*.

| Щам | Източник на хидролизата | OD | лактат, (mg/ml) | ацетат, (mg/ml) | етанол, (mg/ml) |
|---------------------|--------------------------|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>L. plantarum</i> | глюкоза | 3.84 ± 0.12 | 3.12 ± 0.17 | 0.11 ± 0.02 | 0.03 ± 0.01 |
| <i>S30</i> | <i>P. major</i> Hem | 2.15 ± 0.10 | 2.21 ± 0.15 | 0.82 ± 0.10 | 0.13 ± 0.03 |
| | <i>P. major</i> Xyl | 1.74 ± 0.15 | 0.83 ± 0.12 | 0.86 ± 0.10 | 0.12 ± 0.02 |
| <i>S30</i> | <i>P. media</i> Hem | 2.05 ± 0.14 | 1.72 ± 0.14 | 0.48 ± 0.08 | 0.15 ± 0.02 |
| | <i>P. media</i> Xyl | 2.46 ± 0.20 | 1.28 ± 0.10 | 0.66 ± 0.08 | 0.10 ± 0.03 |
| | <i>P. lanceolata</i> Hem | 1.76 ± 0.22 | 1.12 ± 0.09 | 0.71 ± 0.05 | 0.08 ± 0.02 |
| | <i>P. lanceolata</i> Xyl | 1.69 ± 0.25 | 0.96 ± 0.08 | 0.77 ± 0.06 | 0.10 ± 0.02 |

Щама *L. plantarum* 30 показва най-високи стойности на α -галактозидазната активност (до 0.133 U / mg), последвани от α -глюкозидазна активност (до 0.10 U / mg) и около 10 пъти по-ниски от стойностите на β -ксилозидазна активност (до 0.009 U / mg). По отношение на динамиката на секрецията на гликохидролазите, щама *L. plantarum* 30 показва най-високи стойности при 24-часовия старт след ферментацията в почти всички проби. Най-високите регистрирани стойности на α -галактозидазната и α -глюкозидазната активност корелират с най-високото съдържание на захар в хидролизати на *P. major* (фиг. 15). От проведените експерименти следва да се заключи, че лактобацилите притежават висока пластичност при усвояване на захари с различна структура. Това особено личи при култивирането им на среди, съдържащи олигозахариди с различна структура, монозахариден състав и гликозидни връзки между отделните монозахаридни остатъци. От друга страна нашите резултати потвърждават вече наложилата се хипотеза за щамовата специфичност на ензимния профил, отговорен за усвояването на различни

олигозахариди. Изследваният щам *L. plantarum* 30 показва β -галактозидазна активност в присъствие на муцин, галактоолигозахариди и олигозахариди от живовлек.



Фигура 15 α -Галактозидазна, α -глюкозидазна и β -ксилозидазна активност при щам *L. plantarum* 30 в присъствие на 10% хидролизати от сухи листа на *P. major*, *P. media*, *P. Lanceolata* в присъствие на хемицелулаза и ксиланаза.

Обозначения: α -GalAct: α -галактозидазна активност, α -GlcAct: α -глюкозидазна активност, β -XylAct: β -ксилозидазна активност, Hem – хемицелулаза, Xyl-ксилозидаза.

Освен това успешно усвоява монозахариди като галактоза и арабиноза, присъстващи в състава както на олигозахаридите от майчината кърма, така и в растителни олигозахариди. Много по-специфично е усвояването на другите компоненти на НМО, като фукоза и сиалова киселина. Тук именно се установи съществената разлика между щамовете с доказани пробиотични свойства като *Str. thermophilus* St 229, *Str. thermophilus* St 226, *L. acidophilus* N, *L. brevis* 27, *L. plantarum* 30 и *L. plantarum* 26, *L. bulgaricus* L14 и новите щамове *L. fermentum* St 5 и *L. fermentum* St 22, изолирани от майчина кърма. Пърите не са селектирани по отношение на ензима фукозидаза и не проявяват такава активност, докато вторите секретират фукозидаза.

Тъй като след проведено молекулярно биологично проучване беше установено наличието на ген, отговорен за наличието на фукозидазна активност при щамовете

L.fermentum St 5 и *L.fermentum St 22* ние използвахме тези два щама за по-подробно охарактеризиране на ензимният профил при култивирането им в 5 различни хранителни среди съдържащи 5 различни комбинации от захари (Таблица 6).

Таблица 6 α -Фукозидазна и β -галактозидазна активност при култивиране на щамовете *L.fermentum St 5* и *L.fermentum St 22* в среди с различни комбинации от въглеродни източници.

| 6h | 8% лактоза + 0,8% НМО | | 8% лактоза + 0,8% FL | | 8% лактоза+ 0,4 % муцин | | 8% лактоза + 0,8 % муцин | | 8% лактоза + 1,5 % муцин | |
|-------|-----------------------|-----|----------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|-----|
| | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc |
| St 5 | 0,3 | 0 | 0,3 | 0 | 0,2 | 0 | 0,2 | 0 | 0,2 | 0 |
| St 22 | 0,3 | 0 | 0,2 | 0 | 0,2 | 0 | 0,3 | 0 | 0,2 | 0 |
| 12h | 8% лактоза + 0,8% НМО | | 8% лактоза + 0,8% FL | | 8% лактоза+ 0,4 % муцин | | 8% лактоза + 0,8 % муцин | | 8% лактоза + 1,5 % муцин | |
| | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc |
| St 5 | 1,1 | 0 | 0,9 | 0 | 0,7 | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,6 | 0,2 |
| St 22 | 1,2 | 0 | 0,8 | 0 | 0,8 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,7 | 0,3 |
| 18h | 8% лактоза + 0,8% НМО | | 8% лактоза + 0,8% FL | | 8% лактоза + 0,4 % муцин | | 8% лактоза + 0,8 % муцин | | 8% лактоза + 1,5 % муцин | |
| | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc |
| St 5 | 1,3 | 0 | 1 | 0 | 0,9 | 0 | 0,8 | 0,3 | 0,8 | 0,4 |
| St 22 | 1,2 | 0 | 1,1 | 0 | 1,1 | 0 | 0,9 | 0,4 | 1 | 0,5 |
| 24h | 8% лактоза + 0,8% НМО | | 8% лактоза + 0,8% FL | | 8% лактоза+ 0,4 % муцин | | 8% лактоза + 0,8 % муцин | | 8% лактоза + 1,5 % муцин | |
| | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc | β -Gal | Fuc |
| St 5 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0,9 | 0 | 0,7 | 0,3 | 0,7 | 0,3 |
| St 22 | 1,1 | 0 | 1 | 0 | 0,8 | 0 | 0,7 | 0,2 | 0,6 | 0,2 |

Най-високи стойности на фукозидазна и галактозидазна активност бяха отчетени на 18 h от началото на култивирането и при двата щама. Фукозидазните активност бяха най-високи при култивиране на среда съдържаща 8% лактоза + 0,8 % муцин и на среда съдържаща 8% лактоза + 1,5 % муцин.

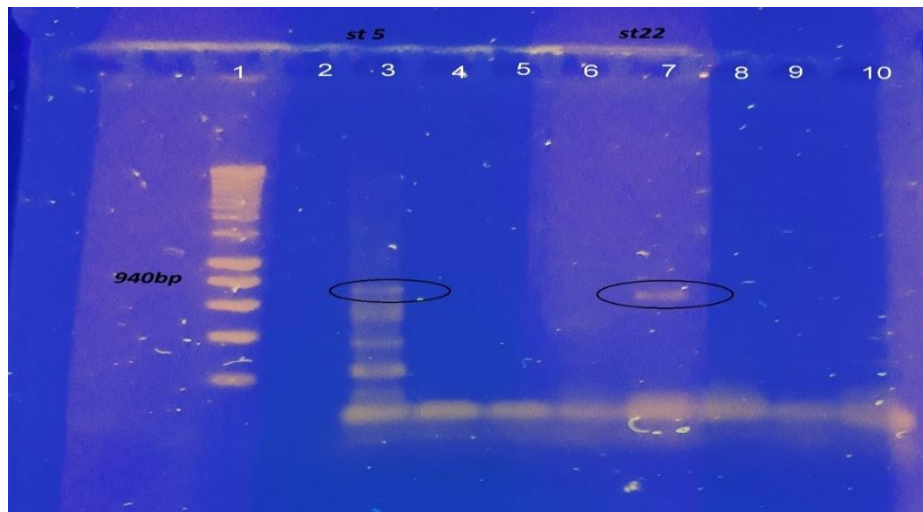
Катаболитната репресия е един от най-важните регулаторни механизми при много бактерии: до 5–10% от всички бактериални гени са обект на CCR.(Lui et al., 2005)

3. Сравнителен анализ на пробиотичния потенциал на изолираните щамове *L. fermentum St5* и *L.fermentum St22*

3.1 Установяване наличието на гена *afcA* при щамовете *L. fermentum St5* и *L. fermentum St22*

Установено е, че α -(1,2)-L-фукозидазата (Е.С. 3.2.1.63) отцепва терминално свързана α -L-фукоза от различни олигозахариди включително и от муцин свързани гликопротеини. Този ензим е установен при различни представители на род *Bifidobacterium* и се кодира от гена *afcA*. Протеиновата секвенция е с дължина около 1960

аминокиселини. Щамовете *L. fermentum* St5 и *L. fermentum* St22 както и останалите 6 щама, които бяха тествани показаха наличие на α -фукозидазна активност. С цел да се установи наличието на ген за специфичната α (1,2)-L- фукозидаза се проведе изолиране на ДНК от посочените щамове и последващ PCR при който бяха използвани следните праймери: Fuc-F (5- TTCAACGAGGAGACGCTGTGGAC CGG-3) и Fuc-R (5- GCCAGTAGTTCATCTGGAGGTTTAC-3).



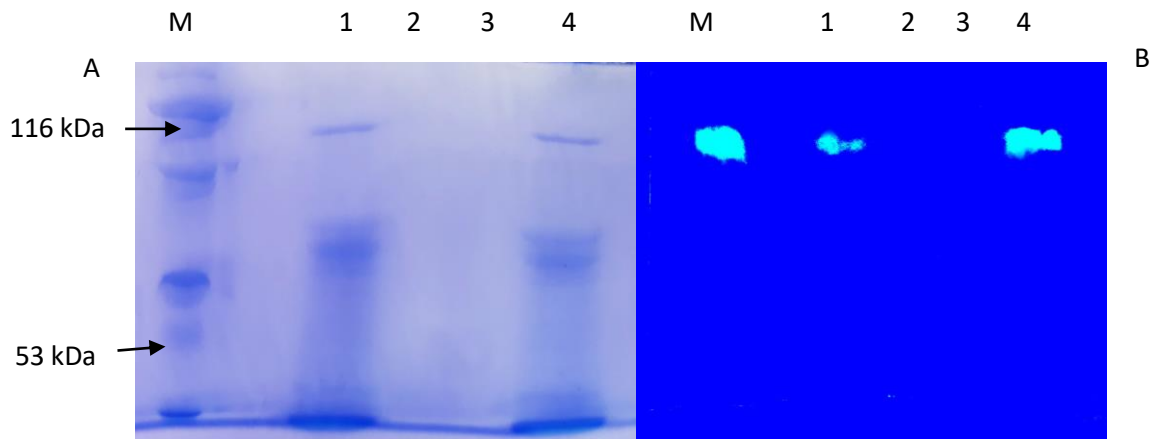
Фигура 16 Електрофоретичен анализ на PCR смеси след полимеразна реакция за размножаване на гена *afaA* **Легенда:** 1- маркер, 3- PCR смес от *L. fermentum* St5, 4- PCR смес от *L. fermentum* St6, 5- PCR смес от *L. fermentum* St8, 6- PCR смес от *L. fermentum* St10, 7- PCR смес от *L. fermentum* St22, 8- PCR смес от *L. fermentum* St24, 9- PCR смес от *L. fermentum* ss5, 10- PCR смес от *L. fermentum* ss

След проведенят PCR беше извършен електрофоретичен анализ на смесите. На гела се установиха ивици с очакваната дължина на продукта на реакцията само при два щама *L. fermentum* St5 и *L. fermentum* St22. Получените продукти бяха изпратени за секвениране в Макроджен, Холандия с цел установяване на секвенцията им (Фиг. 16).

Предполаганото наличие на гена *afaA*, кодиращ синтеза на конкретния фукозидазен ензим при установените два щама ги прави важни представители на човешкия микробиом, способни да метаболизират различни олигозахариди, включително и такива изолирани от кърма чрез отцепване на терминално свързана фукоза в тях. След секвениране бяха получени секвенции за двата щама които след BlaSt показаха идентичност съответно 47. 64% за щам *L. fermentum* St 5 с продукта на *afaA* гена при бифидобактерии и 100% идентичност при щам *L. fermentum* St 22 с хипотетичен протеин на бифидобактерии.

3.2 Охарактеризиране на молекулната маса на частично пречистена β -галактозидаза от щамове *L.fermentum* St 5 и *L.fermentum* St 22

След провеждане на SDS-PAGE бяха установени ивици и при двете проби отговарящи на β -галактозидаза с молекулна маса 116 kDa. Освен посочените ивици отговарящи на β -галактозидазата бяха установени и други с по-ниско молекулно тегло. (Фиг 17)



Фигура 17 *In situ* анализ и детекция активността на частично пречистена β -галактозидаза от щамове *Lactobacillus fermentum* st5 и *Lactobacillus fermentum* st22. А – SDS PAGE, В- нативна PAGE фореа, β –галактозидазната активност беше детектирана посредством MUG като субстрат. М, маркер; 1, концентрирани ензимни фракции от щам *Lactobacillus fermentum* st5; 4, концентрирани ензимни фракции от щам *Lactobacillus fermentum* st22

За да се докаже β -галактозидазната активност беше приложен флуоресцентен субстрат 4-метилумбелиферил β -D-галактозид (MUG) за детекция на ензима. Под въздействие на ензима β -галактозидаза субстратът се разпада на флуоресцентен 4-метилумбелиферил и β -D- галактозид. След прибавянето на посочения субстрат и 30 мин. инкубиране бяха отчетени флуоресцентни ивици и при двете ензимни проби на нивото на молекулна маса 116 kDa, корелираща с флуоресцентната ивица от маркера. По този начин установихме наличието на бета- галактозидазни ензими с приблизително молекулно тегло 116 kDa и при двата изследвани щама *L.fermentum*.

3.3 Антимикробна активност

Антимикробната активност е едно от важните качества, търсено при подбора на пробиотични щамове, тъй като щамове, секретирани метаболитни компоненти, като органични киселини, мастни киселини, водороден прекис и бактериоцини показват антимикробни ефекти и имат защитен ефект (Garotte et al., 2000).

Антагонистичната активност срещу интестинални и хранителни патогени е важна част от пробиотичните свойства на лактобацилите. Благодарение на способността си да продуцират различни антимикробни субстанции, те инхибират развитието на патогенни микроорганизми. Изследвахме 18 щамове изолирани от кърма и слюнка за наличие на антимикробна активност. Резултатите получени от експеримента за антибактериална активност на безклетъчни и неутрализираните супернатанти на щамовете спрямо тест културите *E.coli*, *St. aureus* и *Ps. aureginosa* са представени в таблица 7.

Таблица 7 Антибактериална активност на отделните изолати спрямо тест култури

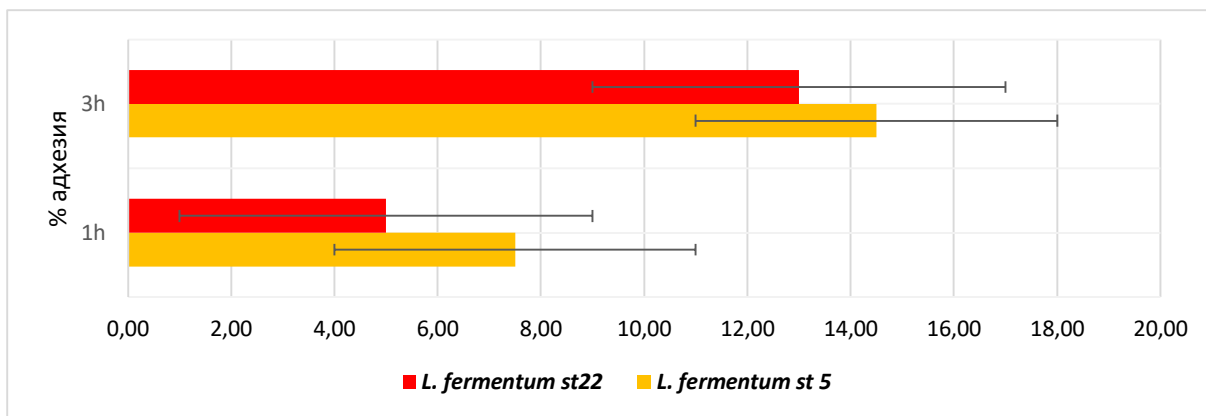
| Изолат | Морфологична форма | Източник | Активност спрямо <i>E.coli</i> ATCC 25922 — зона в mm | Активност спрямо <i>St. Aureus</i> ATCC 25853—зона в mm | Активност спрямо <i>Ps. Aureginosa</i> ATCC 25923—зона в mm |
|--------------|--------------------|----------|---|---|---|
| <i>St 24</i> | пърчки | кърма | 5 | 0 | 0 |
| <i>St 23</i> | коки | кърма | 8 | 0 | 0 |
| <i>St 14</i> | коки | кърма | 9 | 0 | 0 |
| <i>Ss 20</i> | коки | слюнка | 0 | 9 | 0 |

Получените резултати показаха, че щам *L. fermentum St 24*, както и *Enterococcus faecalis St 23* и *Enterococcus faecium St 14* притежават антибактериална активност спрямо *E.coli*. Само щам *Enterococcus faecalis ss 20* показва активност спрямо *St. aureus*. При щамовете *L.fermentum St5* и *L.fermentum St22* не беше установена продукцията на бактериоцини спрямо изследваните тест култури.

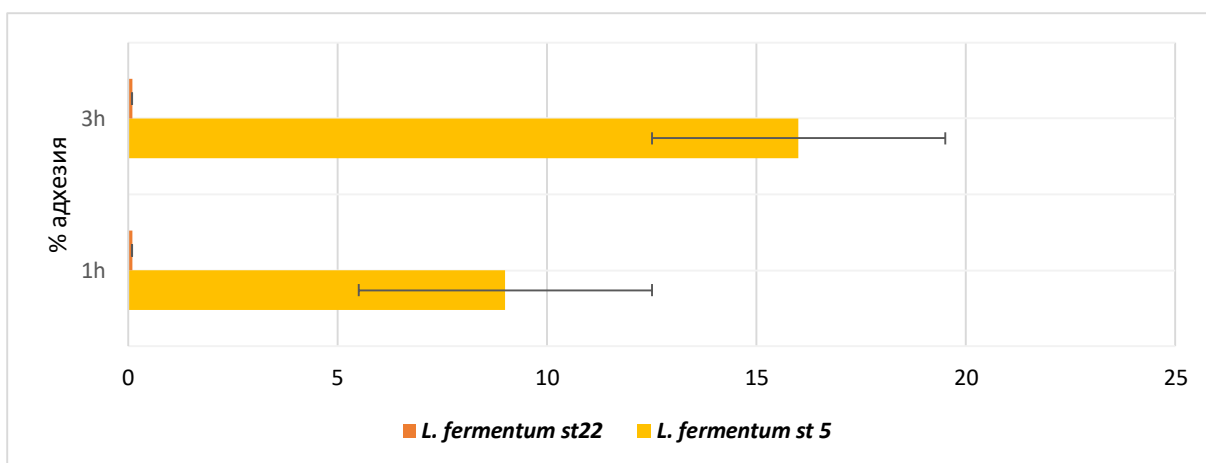
Неутрализираните супернатанти на изолатите показали антибактериална активност не са допълнително изследвани за определяне природата на инхибиращият фактор.

3.4 Адхезивни свойства

Адхезията към чревната повърхност, се счита за важна предпоставка за взаимодействие на пробиотичните бактерии с гостоприемника и оказването на техният благоприятен ефект. В тази връзка изследвахме адхезивните свойства на 2 щамове (*L. fermentum St5* и *L.fermentum St22*), изолирани от кърма, които показаха добри растежни характеристики, добри ензимни активност, както и наличие на ген за фукозидазна активност. За целта използвахме HT-29 клетки, както и муцин продуциращата клетъчна линия LS 180.



Фигура 18 Процент адхезия на щамове *L. fermentum* St5 и *L.fermentum* St22 към HT-29 клетъчна линия



Фигура 19 Процент адхезия на щамове *L. fermentum* St5 и *L.fermentum* St22 към муцин-продуциращата клетъчна линия LS180

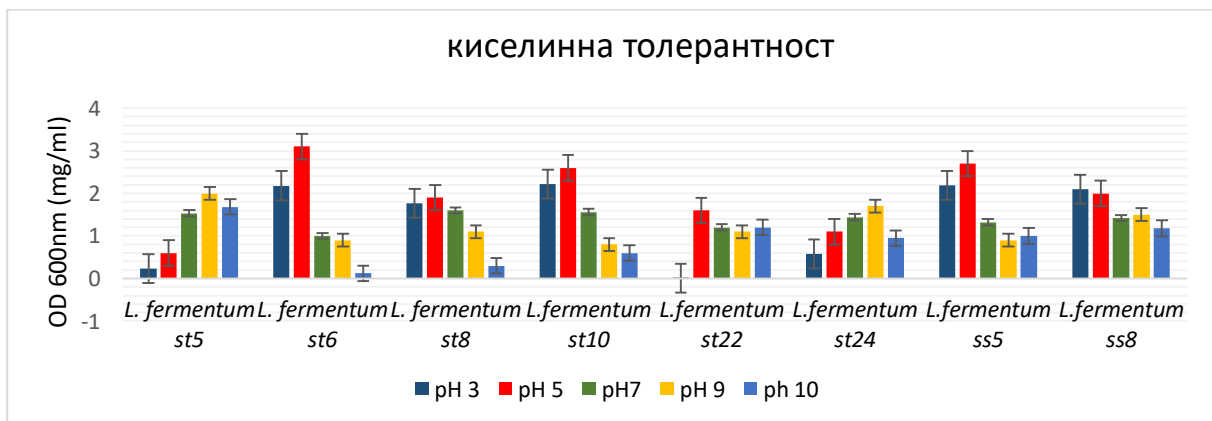
Свързващите характеристики на двата щамове доста варират. Спрямо HT-29 клетъчна линия и при двата щамове се забелязва добър процент на адхезия, като с по-добри характеристики е щам *L. fermentum* St5. И при двата щамове се установи по-добра адхезия на 3 часа в сравнение с 1 час. (фиг. 18) Значително намалена способност за свързване притежава щам *L.fermentum* St22 спрямо клетъчна линия LS180. Процентите адхезия при щам *L. fermentum* St5 спрямо същата линия са съответно за 1h – 9% и 3h- 16% (фиг.19). Адхезията е от огромно значение при патогенните бактерии, които се нуждаят от гостоприемник за колонизация в резултат на която настъпва инфекциозен процес.

3.5 Киселинна толерантност и толерантност към жлъчни соли на избраните щамове

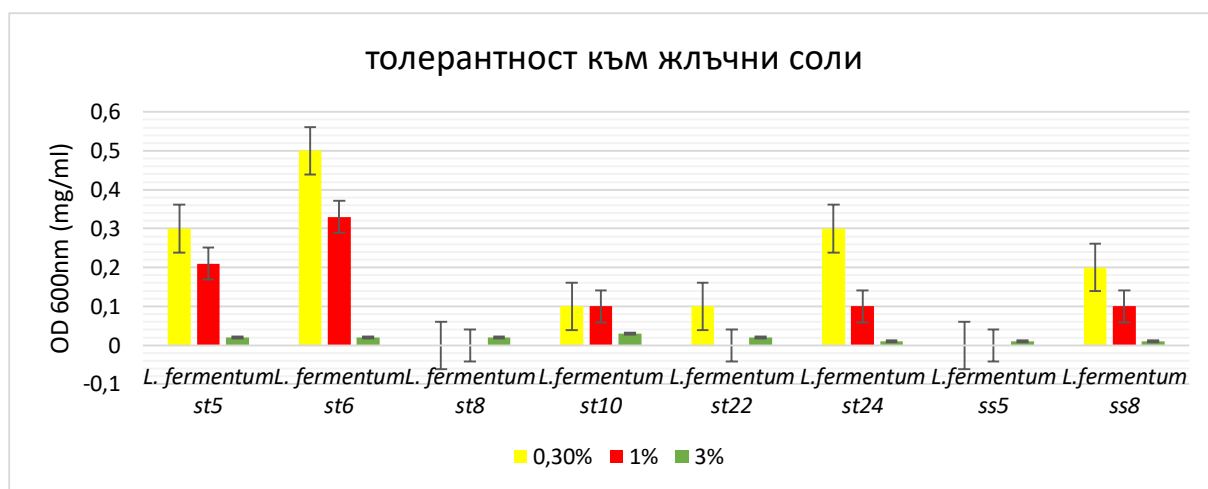
Ние изследвахме киселинната и алкална толерантност на избраните щамове при рН диапазон от 3 до 10. След култивиране на щамове в среди с различно рН отчетохме натрупването на биомаса в mg/ml. Най-голям толеранс при начална киселинност на средата рН 3 беше отчетен при щамове *L. fermentum* St6, *L. fermentum* St8, *L. fermentum*

St10 - изолирани от кърма и при *L. fermentum ss5* и *L. fermentum ss8* – щамове изолирани от слюнка на новородени, като при тях беше установено най-голямо количество биомаса. При останалите щамове беше отчетено сравнително по-слабо количество на биомаса и съответно по-слаба толерантност в киселия спектър. При щамовете *L. fermentum St6*, *L. fermentum St8*, *L. fermentum St10*, *L. fermentum ss5* и *L. fermentum St22* най-голямо количество биомаса беше установено при култивиране в среда с рН 5. При два от щамовете *L. fermentum St5* и *L. fermentum St24* най-добър растеж беше отчетен при култивиране в среда с рН 9. Щамът *L. fermentum ss8* се развиваше най-добре при начална киселинност на средата с рН 3. Резултатите са представени на фиг. 20.

Едновременно с това проследихме влиянието на различни концентрации жлъчни соли присъстващи в средата за култивиране върху растежа и натрупването на биомаса. Резултатите, както и тези свързани с киселинната толерантност бяха отчетени след трикратни повторения на 24 час от началото на култивирането. Концентрациите на жлъчни соли присъстващи в средата от 0.3% до 3% бяха съобразени с референтните стойности на жлъчни соли отделящи се с жлъчката за едно денонощие при здрав възрастен индивид. Толерантността към жлъчни соли беше определена чрез определяне на количеството биомаса в mg/ml. Най-добра толерантност показва щам *L. fermentum St6* последван от щамовете *L. fermentum St5*, *L. fermentum St24* и *L. fermentum ss8*. Почти не беше отчетен растеж при култивиране на осемте щамове в среда съдържаща 3% жлъчни соли. Данните от получените резултати са представени на фиг. 21



Фигура 20 Количество биомаса при изследваните щамове при култивиране на MRS среда с различно рН



Фигура 21 Количество биомаса при изследваните щамове при култивиране на MRS среда с различно съдържание на жлъчни соли

Толерантността към жлъчните соли е едно от най-важните свойства за пробиотичните бактерии, тъй като определя способността им да оцелеят в тънките черва и следователно способността им да изпълняват функционалната си роля като пробиотици.

Обобщение

Човешкият микробиом е обширна система от микробни общности, които обитават различни ниши в човешкото тяло и играят съществена роля в човешката физиология и здраве. Гастроинтестиналният микробиом помага установяването на мукозната бариера и абсорбирането на хранителните вещества, участва в продукцията на метаболити, допринася за метаболизма на ксенобиотиците, подпомага имунната система и предотвратяват колонизацията на патогени (Cebra et al., 1999, Shanahan et al., 2002).

Формирането на чревната микрофлора на кърмачетата се определя като резултат на тристранна връзка между майчиното мляко, новороденото и бактерии, като е общоприето, че бифидобактериите доминират в детската чревна екосистема. От друга страна род *Lactobacillus* е важна част от микробиота на стомашно-чревния тракт при здрави бебета. Консумацията на майчино мляко насърчава пролиферацията на лактобацили в стомашно-чревния тракт, тъй като осигурява хранителни вещества като пребиотични НМОs. Част от лактобацилите, населяващи стомашно-чревния тракт на новородените притежават набор от специфични ензими като фукозидази, които подпомагат усвояването на сложни захари и опосредстват метаболизма на НМОs.

Смята се, че колонизацията на гастроинтестиналният тракт на новороденото започва по време на раждането, тъй като бебето е изложено на вагиналната и фекална микробиота на майката (Makino et al., 2011). По-нататък микробиотата се модулира чрез експозиция на коластрата и майчиното мляко, като претърпява промени и след въвеждане на изкуствено мляко в диетата както и на други храни (Albesharat et al., 2011). Тази експозиция играе решаваща роля в образуването на чревната бариера и узряването на имунната система. Промените в този процес могат да повлияят върху риска от развитие на различни заболявания на по-късен етап от живота (Makino et al., 2011, Penders et al., 2006). Редица други автори, проучващи ранната колонизация при новородените съобщават за изолиране и идентифициране на щамове от видове бактерии установени и при нашето проучване (Makino et al., 2011). Козак и съавтори събират общо 60 проби от майчиното мляко и 30 бебешки фекални проби от 15 здрави майки и техните кърмачета в продължение на 2 последователни дни.

Функционалните стомашно-чревни нарушения при новородени са чести и могат да бъдат предизвикани по различни причини. Голям проблем е така наречената лактозна непоносимост (т.е. пациенти с дефицит на чревна лактаза и със симптоми на лактозна малабсорбция). В този случай от особено значение е моделирането на чревна флора, подпомагаща усвояването на лактозата. Получените от нас резултати подкрепят включването на β -галактозидазната активност като основен параметър при подбора на пробиотични щамове. Различни автори предлагат обогатяване на чревната флора със щамове *Bifidobacterium longum* BB536 и *Lactobacillus rhamnosus* HN001 плюс витамин В6 при пациенти с лактозна недостатъчност. Те подчертават важността на избраните пробиотици и витамин В6 за облекчаване на симптомите и дисбиозата в червата при пациенти с непоносимост към лактоза, с персистиращи функционални стомашно-чревни симптоми (Vitelio et al., 2019).

Доказано е, че видовете на род *Lactobacillus* са част от микробиома в стомашно-чревния тракт и други мукозни повърхности при хората. Този род включва щамове от различни видове с голям потенциал за пробиотични свойства. Получените от нас резултати показват потенциалът на щамове *L. fermentum* да бъдат използвани за разработването на пробиотици за кърмачета и деца на възраст до една година.

Полезните за човека микроорганизми трябва да оцелеят в специфична екологична ниша и да бъдат метаболитно активни на целевите си места, а именно повърхности на лигавицата на гостоприемника, метаболизирането на произведени от лигавицата гликани е ключов фактор за тяхното оцеляване и активност. Способността за

метаболизирани на гликани, като олигозахариди на човешкото мляко (НМОs), гликозаминогликани и гликанови остатъци на гликопротеини и гликолипиди, открити на повърхността на лигавицата, дава конкурентно предимство на лактобацилите и бифидобактериите (Vitelio et al., 2019). За разлика от бифидобактериите, употребата на НМОs от щамове на род *Lactobacillus* е относително неизследвана област и капацитетът за използване на този въглероден източник изглежда доста ограничен. Геномите на чревните лактобацили обикновено носят голям набор от гликозидхидролази (Pridmore et al., 2004; Altermann et al., 2005; Azcarate-Peril et al., 2008), но те вероятно са отговорни за хидролизата на въглехидрати, получени от хранителната диета.

Получените от нас резултати за щамове *L. fermentum* st 5 и *L. fermentum* st 22 доказват потенциалът им да метаболизират както олигозахариди от майчина кърма, така и пребиотични олигозахариди със специфична структура, включително получени от ензимни хидролизати на полизахариди от медицински растения.

Основните ензими, участващи в разграждането на НМО са β -галактозидаза, фукозидаза, сиалидаза, лакто - N – фосфорилаза и β -хексозаминидаза (Fanaro et al., 2009). При изследваните от нас щамове от *L. fermentum* за първи път се доказва секрецията на α -фукозидаза, която хидролизира термалните фукозни остатъци от НМО.

Способността за хидролизиране на терминални монозахариди от НМОs също е ограничена при отделните видове лактобацили. Фукозидазите са установени само при няколко вида (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) (Azcarate-Peril et al., 2008). Сиалидази не са описани при лактобацили, въпреки че някои автори доказват усвояването на 6'-сиалилактоза, получена от разграждането на НМО от *Lactobacillus delbrueckii* ATCC7830 (Ito et al., 2013). Въпреки това, при някои видове се срещат клъстери от гени, отговорни за катаболизма на сиалова киселина. В *L. sakei* 23K присъстват два съседни и различно транскрибирани генни клъстера, nanTEAR и nanKMP, които съдържат гени, участващи в усвояването на ацетилневраминава киселина Neu5Ac (Anba-Mondoloni et al., 2013).

В нашите изследвания ние установихме *afcA* гена, кодиращ 1,2- α -L – фукозидаза (Е.С. 3.2.1.63) и е отчетена ензимна активност при щамове *Lactobacillus fermentum*, изолирани от майчина кърма. Досега само три α -L-фукозидази (AlfA, AlfB и AlfC) от семейство GH29 са характеризирани при лактобацили (Rodríguez-Díaz et al., 2011). Тези ензими са открити предимно в щамове на филогенетично свързана група *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, като при отделните щамове присъстват само два или пълният набор от ензимите. И трите ензима са вътреклетъчни хомотетрамери (Rodríguez-Díaz et al., 2011) и тяхната функция зависи от наличието на фукозилirани въглехидрати. Досега

не са идентифицирани специфични субстрати за индукцията на AlfA, кодиращ ензим способен да отделя α -1,6-свързани фукозни остатъци от някои олигозахариди, макар и с ниска ефикасност (Rodríguez-Díaz et al., 2011). От друга страна, Alf B и Alf C притежават висока активност върху α -1,3 и α -1,6 връзки в фукозил-GlcNAc (Rodríguez-Díaz et al., 2011).

Нашите резултати недвусмислено потвърдиха възможностите на изолираните от нас щамове *Lactobacillus fermentum* да метаболизират L-фукоза. Изследваните от Родригес – Диез и колектив щамове на *L. casei* и *L. paracasei* не притежават капацитет да метаболизират вътреклетъчно генерираната L-фукоза и те я изтласкват в околната среда (Rodríguez-Díaz et al., 2012). Гените, отговорни за усвояване на L-фукозата и нейното последващо метаболизиране са били характеризирани за пръв път при щам *L. rhamnosus* GG. Противоположно на бифидобактериите, L-фукозният катаболен път при лактобацилите е подобен на този описан при *Escherichia coli* и някои чревни бактерии представители на *Bacteroides*. L-Фукоза се транспортира посредством захарна пермеаза преди да бъде превърната в L-фукулоза. След последващо фосфорилиране на L-фукулоза чрез няколко ензимни стъпки тя се превръща в L-лакталдехид и дихидроксиацетон фосфат, който стават част от гликолиза. В зависимост от редокс условия L-лакталдехид може да се метаболизира до L-лактат или L-1,2-пропандиол (Весерга et al., 2015).

Епителът на гастроинтестиналният тракт е покрит с дебел защитен слой от слуз която играе ключова роля в установените симбиотични отношения между гостоприемника и чревната микробиота. Защитният слой е съставен предимно от муцини, които са кодирани от повече от 20 гени в човешкия геном и могат да бъдат секреторни или мембранни свързани (Bansil and Turner, 2018). Описани са високо гликолизирани муцини (въглехидратите представляват 50–80% w / w), с много голяма пропорция на O-гликозилиращи модификации. Муцините съдържат домейни, характеризиращи се с тандемни повторения на аминокиселините пролин, треонин и серин (PTS домени), които представляват цели за O-гликозилиране. Поради това, O- и N-гликозилираните протеини, особено муцините, представляват източник на въглерод и енергия за чревни бактерии (Sicard et al., 2017). Родове и видове, специално адаптирани към тази екологична ниша, като *Bacteroides*, *Ruminococcus* или *Akkermansia muciniphila*, притежават набор от ензими за използване на този ресурс, освобождавайки монозахариди от муцини (Tailford et al., 2015). In vitro експерименти за растеж с използване на муцини като източник на въглерод са показали много ограничен

капацитет за използване на свързаните с муцин въглеhidрати от лактобацили. При проведените от нас експерименти ние установихме индуциране секрецията на α -L-фукозидази при изследваните от нас щамове *L. fermentum* култивирани в присъствие на муцин, които допълнително се стимулират в присъствие на 0,3% жлъчни соли.

При някои лактобацили са описани протеинови структури за взаимодействие с муцини (например, различни видове адhezини, съдържащи Mub домени) (Etzold et al., 2014) или специализирани пили за адhezия към муцин. В подкрепа на това твърдение ние доказахме адhezията на *Lactobacillus fermentum* st5 и *Lactobacillus fermentum* st 22 върху клетъчна линия HT 29, а при щам *Lactobacillus fermentum* st5 се установи адhezия и спрямо муцин-продуциращата клетъчна линия LS 180.

Изводи

1. Установена е видовата принадлежност към *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus gastricus*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* на 56 щамове бактерии, изолирани от майчина кърма и от слюнка на новородени.
2. Доказана е щамова специфичност при изследваните 8 щамове *Lactobacillus fermentum* по отношение на индукцията на ензимите β -галактозидаза, α -галактозидаза и β -глюкозидаза при култивиране на хранителни среди в присъствие на различни концентрации на лактоза, лактулоза, галактоолигозахариди и олигозахариди от майчина кърма, като е установена най-висока активност на ензима β -галактозидаза при използване на лактоза и олигозахариди от кърма.
3. Доказана е щамова специфичност при индуцирането на α -фукозидаза при изследваните 8 щамове *Lactobacillus fermentum* от L-фукоза, муцин, фукозиллактоза (2-FL) и олигозахариди от майчина кърма, като е установена най-висока активност на α -фукозидаза при използване на L-фукоза. В сравнение при пробиотични щамове *Str. thermophilus* St 229, *Str. thermophilus* St 226, *L. acidophilus* N, *L. brevis* 27, *L. plantarum* 30 и *L. plantarum* 26, *L. bulgaricus* L14 не е установена α -фукозидазна активност.
4. Доказано е стимулиране секрецията на α -фукозидаза и двойно по-висока ензимна активност при щамове *Lactobacillus fermentum* st5 и *Lactobacillus fermentum* st 22, култивирани в присъствие на 0,3% жлъчни соли.
5. При щамове *Lactobacillus fermentum* st5 и *Lactobacillus fermentum* st 22 е установено наличие на *afcA* гена, кодиращ 1,2- α -L – фукозидаза (Е.С. 3.2.1.63) и е определена молекулната маса на секретирания от тях β -галактозидаза от 116 kDa.
6. Щамовете *Lactobacillus fermentum* st5 и *Lactobacillus fermentum* st 22 показват способност да адхезират върху клетъчна линия HT 29 като при щам *Lactobacillus fermentum* st5 се установи адхезия и спрямо муцин-продуциращата клетъчна линия LS 180.
7. Доказана е пластичността на въглехидратния метаболизъм при щам *L. plantarum* 30, култивиран в присъствие на олигозахариди с различна структура и произход, като се индуцира секрецията на ензимите β -галактозидаза, α -глюкозидаза, β -глюкозидаза и β -ксилозидаза в присъствие на фукозиллактоза, муцин и олигозахариди от листа на *P. major*, *P. media* и *P. lanceolata*.

Научни приноси:

Научни приноси с оригинален характер:

1. За първи път е доказан *afcA* гена, кодиращ 1,2- α -L – фукозидаза (E.C. 3.2.1.63) и е отчетена ензимна активност при щамове *Lactobacillus fermentum*, изолирани от майчина кърма.
2. За първи път е доказан индуциращият ефект на L-фукоза, муцин, 2-фукозил-лактоза и олигозахариди от майчина кърма при секретирание на α -L– фукозидаза при щамове *Lactobacillus fermentum*, изолирани от майчина кърма.
3. За първи път е установена корелация между β -галактозидазна и α -L – фукозидазна активност при щамове *Lactobacillus fermentum*, изолирани от майчина кърма.

Научни приноси с потвърдителен характер:

1. Установена е щамова специфичност по отношение на индукцията на ензимите β -галактозидаза, α -галактозидаза и β -глюкозидаза при култивиране на хранителни среди в присъствие на различни концентрации на лактоза, лактулоза, галактоолигозахариди и олигозахариди от майчина кърма при щамове *Lactobacillus fermentum*, изолирани от майчина кърма.
2. Установено е, че лактобацилите притежават висока пластичност на метаболитните процеси при усвояване на олигозахариди с различна структура, монозахариден състав и гликозидни връзки между отделните монозахаридни остатъци. От друга страна е потвърдена вече наложената се хипотеза за щамовата специфичност на ензимния профил, отговорен за усвояването на различни олигозахариди.

Научно-приложни приноси:

1. Разработена е схема за скриниране на щамове млечнокисели бактерии от специфични екологични ниши, проявяващи пробиотични свойства при активно метаболизиране на комбинация от олигозахариди с висок пребиотичен потенциал.

Публикации във връзка с дисертацията

1. Lukova, P, Karcheva-Bahchevanska, **D, Mollova, D.**, Nikolova, M., Mladenov, R., Iliev, I. “Study of prebiotic potential and antioxidant activity in *Plantago* spp. leaves after enzymatic hydrolysis with hemicellulase and xylanase”, *Engineering in Life Sciences* , vol.18, page 831-839,
2. **Mollova, D.**, Vasileva, T., Iliev, I.,” β -Galactosidase from strains isolated from breast milk and infant saliva: characterization and participation in absorption of different oligosaccharides”, *Journal of Bioscience and Biotechnology*, vol.8, issue 1, 2019, in press

Участия в национални и международни научни форуми

1. **Mollova, D.**, Iliev, I., Vasileva, T., “Utilization of human breast milk oligosaccharides from lactic acid bacteria strains isolated from neonatal gut microbiota”, 14 Конгрес на микробиолозите в България, 10-13 октомври 2018, Хисаря, България, постер
2. **Mollova, D.**, Iliev, I., Vasileva, T., “Characterisation of bacterial isolates from the microbiota of breast milk and infant saliva”, Международна научна конференция Климентови дни, 8-9 ноември 2018, София, България, постер
3. **Mollova, D.**, Iliev, I., Vasileva, T., 4- Балканска научна конференция по биология, 1-3 ноември, 2017, Пловдив, България, постер

Investigation of the influence of the structural and functional properties of oligosaccharides on the enzymatic kinetics of microbial glycosidohydrolase produced by Lactic acid bacteria isolated from the infant microbe

Daniela Mollova

In recent years, there has been an increasing interest to study of the stages of colonization of the digestive tract in neonates. Narrow relationships with the gastrointestinal microflora may be at the root and be critical to the health of the newborn, as well as to the risk of developing various other noninfectious disease.

In this study, we mainly studied the not well-studied kinetic characteristics of various glycosidohydrolase produced by members of the *Lactobacillus* genus and involved in the uptake of oligosaccharides from the milk composition. The studied strains were isolated from breast milk and saliva of newborns. Among the different bioactive components of human milk, oligosaccharides are the most common and include more than 100 different bioactive carbohydrate structures built from 3 to 32 monosaccharides.

We found the presence of fucosidase activity in some of the isolated lactobacilli strains. In two of the isolated strains *L.fermentum* st 5 and *L.fermentum* st 22 we demonstrated the presence of a *afcA* gene for the catalytic domain of α -L-fucosidase. We also investigated the β -galactosidase, α -galactosidase, β -glucosidase and α -glucosidase activity when the strains were cultivated with a different carbon source. After native phoresis, we found a molecular mass of 116kDa of beta-galactosidase isolated from the strains *L.fermentum* st 5 and *L.fermentum* st 22. A correlation between β -galactosidase and α -L-fucosidase activity in *Lactobacillus fermentum* strains isolated from breast milk was first established.

A scheme for screening strains of lactic acid bacteria from specific ecological niches has been developed demonstrating probiotic properties in the active metabolism of a combination of oligosaccharides with high prebiotic potential.