



АГРАРЕН УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
Научно-изследователски център

Информационен лист
за научните проекти, финансирани целево от държавния бюджет

1. Тема на проект

“Модерни молекулярни подходи за функционално характеризиране на амилолитични млечно-кисели бактерии изолирани от спонтанно

Научен колектив:

Ръководител на проекта: гл. ас. д-р Мариана Красиминова Петкова - катедра „Микробиология и екологични биотехнологии“

Членове на научния колектив от:

Аграрен университет-Пловдив (АУ)

1. чл. кор. проф. Йорданка Найденова Кузманова - катедра „Микробиология и екологични биотехнологии“
2. гл. ас. д-р Катя Петкова Димитрова - катедра „Микробиология и екологични биотехнологии“
3. проф. д-р Нуреттин Тахсин Тахсин - катедра „Растениевъдство“
4. доц. д-р Марина Петрова Марчева - катедра „Генетика и селекция“
5. студент - Камен Василев Василев, фак. № 0298 Ж

Университет по хранителни технологии - Пловдив (УХТ)

1. проф. д-р Ангел Иванов Ангелов - катедра „Биотехнология“
2. доц. д-р Величка Гочева Гочева - катедра „Биотехнология“
3. гл. ас. Петя Стефанова - катедра „Биотехнология“
4. студент Ирен Венелинова Иванова - катедра „Биотехнология“

Пуратос България АД - Перник

1. инж. Ангел Петричански

3. Цел и задачи на проекта:

Целта на настоящия проект е да се проучат на генетично ниво основните функционални характеристики на аМКБ изолирани от спонтанно ферментирали теста от региона на Южен Централен район за планиране, както и да се проведат технологични изследвания за оценка на ферментационния капацитет на селектирани щамове при производство на хляб.

НАУЧНИ ЗАДАЧИ ЗА ТРЕТАТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ГОДИНА

За реализиране на целта е необходимо изпълнението на следните научни задачи:

1. Изследване на антимикробна активност и способност за синтез на бактериоцини:
2. Изследване на технологичните свойства на селектирани щамове аМКБ при производство на хляб.

Щамове	Концентрация на ДНК ng/μl
<i>Lactobacillus plantarum</i> C6	53.973
<i>Lactobacillus plantarum</i> I6	69.985
<i>Lactobacillus plantarum</i> K1	58.490
<i>Lactobacillus plantarum</i> L1	75.824
<i>Lactobacillus plantarum</i> Q2	77.227
<i>Lactobacillus plantarum</i> Q3	68,530
<i>Lactobacillus plantarum</i> Q4	87,230
<i>Lactobacillus plantarum</i> S1	56,550
<i>Lactobacillus plantarum</i> S4	64,600

Фигура 1. Определяна на количеството и качеството на изолираната ДНК. Спектрофотометрично определяне на чистотата на ДНК.

В опит да се определи дали избраните щамове носят гени за производството на известни платарицини, използвайки PCR анализ бяха използвани праймери, специфични за отделните гени на плантарицин (Таблица 1). Осем изолата от *Lactobacillus plantarum*, носят най-малко един или повече гена от плантарициновия клъстер, описан преди в щамовете на *L. plantarum* (Diep, 1996; Diep, 2003). В един изолат от настоящото изследване, *L. Plantarum* - 5.2 не са установени гени за синтез плантарицини (Фигура 2).

От гените в оперона *plnABCD* на *L. plantarum* – всички от изолираните щамове *Lactobacillus plantarum*, са установени за *plnA*, *plnB* и *plnC*, но не са изследвани за наличие на ген за синтез на *plnD*.

Вариации в този оперон също са докладвани за генните клъстери, описани при опитите с *L. plantarum* NC8 от маслини и *L. plantarum* J23 от гроздовата мъст (Maldonado, 2004; Rojo-Bezares, 2008). Сравнителен геномен анализ на *L. plantarum* щамовете също предполагат

висока вариабилност на производство на плантарицини и имунитет (Molenaar, 2005). Следователно, подобни варианти могат да се появят и в щамове, получени в настоящото изследване.

PCR анализът показва наличие на плантарицин А (*plnA*) в щамове на *L. plantarum* G6, K1, L1, Q3. *PlnA* индуцира транскрипция на гени, организирани по-долу пет оперона: *plnABCD*, *plnEFI*, *plnJKLR*, *plnMNOP* и *plnGHSTUV* (Diep, 1994). *plnA*, *plnE*, *plnF*, *plnJ*, *plnK* и *plnN* кодират типични прекурсори на бактериоцитен пептиди (Diep, 1996), докато е предположено, че *plnI* кодира протеини, свързани с имунитета. Други гени често се срещат заедно с производството на бактериоцини също са открити в *pln* опероните; *plnB* и *plnC* кодират протеини, участващи в трансдукцията на сигнала на феромоните, кодирани от *plnA* (Brurberg, 1997).

Плантарицин В (*plnB*) е установен в щамове Q3, Q4 и S1.

Плантарин EF и плантарицин W, кодирани от *plnEF* и *plnW* локуси, се класифицират съответно като клас I бактериоцини и клас II бактериоцини. Присъствие на два *pln* локуси, кодиращи бактериоцини от два различни класа, допринася значително за широкия инхибиращ спектър на щамове *L. plantarum*. *PlnW* е нов двупептиден бактериоцин от *Lactobacillus plantarum*, който инхибира голям брой грам - положителни бактерии (Holo, 2001). *PlnEF*, *-J* и *-K*, когато са тествани срещу грам отрицателния моделен организъм *Escherichia coli* K-12 са показали висока ефективност при определени условия (Pal, G and S. Srivastava, 2014). В настоящето проучване *PlnJ* не е амплифициран посредством PCR реакция със специфични праймери по Diep (1996).

От друга страна *PlnK* беше установен във всички щамове с изключение на *Lactobacillus plantarum* Q3. Ben Omar и сътр. (2008) докладват *plnD*, *plnEF*, *plnI*, *plnG* и *plnK* като най-често срещаните гени в МКБ от вида *L. plantarum*. Въпреки че *L. plantarum* е широко разпространен в ферментирани храни, гените, кодиращи плантарицини NC8 и W не бяха открити в нито един щам, изолирани от проби от пото-пото (Ben Omar, 2008). Изобилието от *plnK* е основното сходство в резултатите от тяхното проучване и настоящите резултати.

Ген за плантарицин S е открит при приблизително 20% от изолатите от *L. plantarum* в две различни изследвания (Maldonado, 2002; Ben Omar, 2008). В настоящето молекулярно изследване се не установи в изследваните щамове.

Новият генетичен състав и организацията на *plnEF* локуса и едновременното наличие на *plnEF* и *plnW* локуси показват, че всички щамове са нови мулти-бактериоцинови

производители, които притежават огромен потенциал за употреба в различни направления в хранително-вкусовата индустрия.

Производството на бактериоцини често се свързва с мобилните генетични елементи, които могат да улеснят трансфера на гените между различни видове и щамове, споделящи една и съща ниша. Ben Omar и сътр. (2008) откриха някои гени на плантарицин от *Lactobacillus fermentum*, изолиран в същата ниша като *L. plantarum*. Изолатите *L. plantarum* инхибират развитието и на *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*, които предизвикват хлебната развала.

Таблица 2. Молекулярен анализ на наличие на гени за производството на бактериоцини от изследваните щамове *Lactobacillus plantarum*.

	<i>Lactobacillus plantarum</i>							
Bacteriocins	G6	I6	K1	L1	Q3	Q4	S1	S4
<i>NISIN</i>	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND
<i>PEDIOCINE</i>	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pln A</i>	+	ND	+	+	+	ND	ND	+
<i>Pln B</i>	ND	+	ND	ND	+	+	+	ND
<i>Pln C</i>	ND	+	+	+	ND	+	+	+
<i>Pln D</i>	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pln EF</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pln I</i>	+	+	+	+	+	ND	+	+
<i>Pln J</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pln K</i>	+	+	+	+	ND	+	+	+
<i>Pln G</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pln N</i>	ND	+	+	+	ND	ND	ND	ND
<i>Pln NC8</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pln S</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pln W</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Генът, кодиращ низин е наличен в щамовете *Lactobacillus plantarum* K1, L1 Q3. Нисинът се произвежда и от щамове на *Lactobacillus brevis* (G2, G6, J5 L3, L5) и *Lactococcus lactis* A1. Низинът е термоустойчив бактериоцин, произведен от определени щамове на *Lactococcus* и *Lactobacillus*. Низинът е предимно активен срещу Грам-положителни бактерии, включително *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus* (Ray and Daeschel, 1994.) и видовете *Listeria* (Ponce, 1998). Директно добавяне на низин в храните води до незабавно намаляване на бактериите популации на хранителните патогени. Педиоцин се среща в генома на *Lactobacillus brevis* G6, но не беше установен в останалите от изследваните щамове.

Таблица 3. Молекулярен анализ на наличие на гени за производството на бактериоцини от изследваните щамове *Lactobacillus brevis* и *L. lactis*

Bacteriocins	<i>Lactobacillus brevis</i>								<i>L. lactis</i>
	C6	G2	G6	J5	K4	L3	Q1	L5	A1
Nisisin	ND	+	+	+	ND	+	ND	+	+

Предстоящи проучвания с неутрализираните и обработените с каталаза супернатанти на щамовете *L. Plantarum* и *Lactobacillus brevis*, които показват антимикробна активност срещу причинителите на микробната развала на хляба. Това са бакрерии от род *Bacillus* и плесенови гъби от род *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium* чрез агар-дифузионния метод..

Извод:

Изследваните щамове - *Lb. plantarum* (I6, K1, L1, Q2,Q3,Q4, S1 S4) *L. brevis* (K1, L1, Q3) *L. lactis* A1показват изразен инхибиторен ефект както към *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* така и към плесенови гъби, причинители на развалата на храната. Проявената от тези щамове аМКБ антимикробна активност най-вероятно се дължи на продукцията на бактериоцини (низин, педиоцин и плантарицини)или бактериоцинподобни метаболити.

ЛИТЕРАТУРА

- Anderssen, E.L., Diep, B.D., Nes, I.F., Eijsink, V.G., Nissen-Meyer, J., 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2269–2272.
- Ben Omar, N., Abriouel, H., Keleke, S., Sánchez Valenzuela, A., MartínezCañamero, M., Lucas López, R., Ortega, E., Gálvez, A., 2008. Bacteriocin producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *International Journal of Food Microbiology* 127, 18-25.
- Brurberg, M. B., I. F. Nes, and V. G. H. Eijsink. 1997. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 26: 347–360.
- Diep, D. B., L. S. Håvarstein, J. Nissen-Meyer, and I. F. Nes. 1994. The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:160–166.
- Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Nes, I.F., 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology* 178, 4472–4483.

Diep, D.B., Myhre, R., Johnsborg, O., Aakra, Å., Nes, I.F., 2003. Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the *pln* operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. *Molecular Microbiology* 47, 483–494.

Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanovic S. & Nes I.F. (2001) Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* 147: 643–651.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:39–86.

Losteinkit C, Uchiyamak, Ochi S, TakaokaT, Nagahisa K, Shioya S. 2001. 518 Characterization of Bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and 519 cloning of the related genes. *J. Biosci. and Bioengg.* 91:390–395.

Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., 2004. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific grampositive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology* 186, 1556–1564.

Maldonado, A., Ruiz-Barba, J.L., Floriano, B., Jiménez-Díaz, R., 2002. The locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lact. plantarum* strains isolated from olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 77, 117-124.

Ming, X., and M. A. Daeschel. 1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott-A. *J. Food Prot.* 56:944–948.

Molenaar, D., Bringel, F., Schuren, F.H., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kleerebezem, M., 2005. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *Journal of Bacteriology* 187, 6119–6127.

Pal, G and S. Srivastava. Inhibitory effect of plantaricin peptides (Pln E/F and J/K) against *Escherichia coli*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30 (2014), pp. 2829-2837.

Ponce E, Pla R, Sendra E, Guamis B, Mor-Mur M. 1998. Combined effect of nisin and high hydrostatic pressure on destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in liquid whole egg. *Int J Food Microbiol* 43:15–9.

Ray B, Daeschel MA. 1994. Bacteriocin of starter culture bacteria. In: Dillon VM, Board RG, editors. *Natural antimicrobial systems and food preservation*. Wallingford, U.K.: CAB Int. p 133–66.

Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Jiménez-Díaz, R., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2008. Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Archives of Microbiology* 189, 491–499.

Stephens, S., Floriano, B., Cathcart, D.P., Bayley, S.A., Witt, V.F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P.J., Ruiz-Barba, J.L., 1998. Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1871–1877.

Suwanjinda D, Eames C, Panbangred W (2007.) Screening of lactic acid bacteria for bacteriocins by microbiological and PCR methods. *Biochem Mol Biol Educ* 35:364–369

Yi H, Zhang L, Tuo Y, Han X, Du M. 2010. A novel method for rapid detection of 493 class IIa bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Food Control* 21:426–430.

С цел популяризиране на резултатите екипа по проекта ще участва в

1. International Conference on Agronomy and Food Science and Technology (AgroFood) Istanbul, 20-21 June, 2019
2. 8th Congress of European Microbiologists - FEMS2019 - 7-11 July 2019, Glasgow, Scotland.