

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен
„доктор” в професионално направление **4.3 Биологически науки, научна**
специалност 01.06.12 Микробиология

Автор на дисертационния труд: ас. Анна Иванова Бръчкова

Тема на дисертационния труд: „Изолиране, идентификация и биологично действие на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини от антарктически микроорганизми от вида *Laceyella sacchari*”

Рецензент: доц. д-р Людмила Владимирова Кабаиванова, ИМикБ, БАН, член на Научното жури със заповед: N I-20/5.02.2018г. на Директора на Института по микробиология „Стефан Ангелов“

Рецензията е изготвена в съответствие с Правилника за прилагане на ЗРАСРБ в Института по микробиология.

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата:

Кандидатката Анна Бръчкова е получила средно образование в ПГИЧЕ “Св. Методий”, гр. София, а висше – в Софийски Университет “Св. Климент Охридски”. През 2008г. се дипломира като магистър биолог. Редовен докторант е била в лаборатория “Микробен синтез и екология“, Департамент “Приложна микробиология” в Института по микробиология от 2010г. Завършила е обучението си, като е взела успешно всички необходими изпити. Обучението си е успяла да съчетае със стаж - 9 месеца в Германия и 6 месеца в Холандия в областта на екологията. Посещавала е курсове по английски и фински език. Също владее и немски език. Изследователската работа, както и научните интереси на ас. Бръчкова са насочени в областта на микробиологията и биотехнологията, включващи

изследване биоразнообразието на екстремни микроорганизми на континента Антарктида, определяне систематичната им принадлежност, както и определяне и характеристика на продуцираните от тях биологично активни вещества чрез използване на различни структурни методи и анализи.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите:

Дисертацията съдържа всички необходими раздела. Дисертационният труд е написан на 161 страници и е илюстриран с 51 фигури, 12 таблици и 2 схеми. Цитирани са 305 литературни източника, по-голямата част от които е след 2000 година. Пълно отразява получените от докторантката резултати.

Темата на представения дисертационен труд е актуална и с оригинален принос в науката. Синтезата на широка гама от биологично активни вещества от полярни микроорганизми е едно от основните направления в развитието на приложната микробиология, с увеличаване на тяхната биопродукция чрез прилагане на генетични методи и насочена регулация, биха могли да се получат производствени щамове на важните за медицината карболини и дикетопиперазини.

В раздел „Цел и задачи“ точно и ясно са формулирани основната цел, а именно да се изследват и идентифицират до вид два непроучени щама микроорганизми, изолирани от екскременти на пингвини, колекционирани на остров Ливингстън, Антарктида и да се проучи биопродукцията им по отношение на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини (циклични дипептиди).

Литературният обзор обосновава значимостта на изследванията в областта на таксономията и биохимията на микроорганизмите с разкриване на систематичната принадлежност на микроорганизмите на Антарктида - единственият континент на планетата Земя, който до голяма степен е непроучен, както и биологично активните вещества, които те продуцират. Литературният обзор е много конкретен и целенасочен. Анализирани и обобщени са голям обем научна информация, което показва много добрата теоретична подготовка на докторантката по темата на дисертацията.

Разгледани са два антарктически щам на базата на биохимични и физиологични критерии и са идентифицирани първоначално до род *Thermoactinomyces*, последвани от проведени молекулярно генетични изследвания -

PCR и секвениране с използване на BLAST анализ за определяне на видовата принадлежност – *Laceyella sacchari*. Тази идентификация допълва научната информация за ареала на този термофилен вид.

Важно място в дисертацията заемат изследванията върху биологично активните вещества, които тези екстремофили продуцират. Преживяването на микроорганизмите в антарктически условия на живот изисква от съответните видове особена приспособяемост и издръжливост при стресовите фактори, като например недостиг на субстрат, UV–лъчения, ниски температури в продължително дълъг период от време и кратковременни интензивни нагрявания през антарктическото лято. Ето защо, би трябвало да се очаква генетично приспособяване на антарктическите организми към факторите на стреса. Всичко това предполага в глобален аспект биосинтезата на известни и нови метаболити с уникални структури и специфично биологично действие. Именно това застана в основата на изпълнението на поставените задачи.

Съвременните структурни методи предоставят гъвкави възможности, за да бъдат изследван получените биологично активни вещества. Тези възможности е описала и доказала докторантката в „Експерименталната част“ от работата си и умело и задълбочено е представила получените резултати. В глава „Материали и методи“ подходящо са комбинирани класически и най-съвременни методи за химичен, микробиологичен и молекулярен анализ. Обемът, многообразието и високото технологично ниво на използваните методи са значителни и можем да направим важния извод, че докторант Бръчкова е изграден, високо квалифициран специалист за провеждане на експериментална дейност.

Използвани са Аналитична високо ефективна течна хроматография/UV-Vis с диод арай детектор/Електроспрей йонизация с положителен йон-масспектрален анализ (метаболомика) за охарактеризиране на компонентния състав на вторични метаболити (алкалоиди) от етилацетатния екстракт от културалния филтрат на *Laceyella sacchari*. Данните отнасят разглежданите два компонента към β -карболиновите алкалоиди. Изследванията са задълбочени към доказване на пълните им химически структури с приложение на Ядрено магнитен резонанс (протонен ^1H ЯМР и въглероден ^{13}C - ЯМР), Heteronuclear Single Quantum Coherence, Attached Proton Test, Heteronuclear Multiple Bond Correlation. В изпълнение на последваща задача от разработвания дисертационен труд е

проследена и динамиката на синтез на дикетопиперазини (циклични дипептиди) при култивиране на изследваните щамове. Идентифицирани са 5 компонента, които са детайлно охарактеризирани. На базата на химическите характеристики и интерпретацията на представените еднодименсионални и двудименсионални ЯМР спектри и мас-спектрални анализи са доказани пълните химични структури на получените биологично активни вещества. Не на последно място идват и направените тестове върху техните свойства. Доказани са антимикробните им свойства върху бактерии, дрожди и гъби.

Като значителен успех могат да се определят задълбочените изследвания, довели до изясняване на пълната химична структура на синтезираните биологично активни продукти - β -карболиновия алкалоид 1-метил- β -карболин и частично определена структура на 1-ацетил-4-метил- β -карболин, както и 5 дикетопиперазини (циклични дипептиди). Доказано е също и, че изолираните и охарактеризирани биологично активни вещества са с антимикробна активност *in vitro*. Направена е коректна интерпретация на получените резултати с категорични заключения, касаещи идентификацията на микроорганизмите, съществуващи в екстремни хабитати, такакъвто е Антарктида.

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд:

Представеният автореферат е в обем от 50 страници и отразява пълно изпълненото в дисертационния труд. Оформен е много добре съгласно изискванията на Правилника за приложение на ЗРАСРБ.

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд:

Всички поставени задачи в настоящата разработка са изпълнени. Логично, въз основа на получените резултати, докторантката Анна Бръчкова извежда девет изводи. Посочените от докторантката основни изводи и приноси на разработения дисертационен труд, смятам за основателни. Приносите в дисертацията допринасят за разясняване структурата и свойствата на синтезираните β – карболинови алкалоиди и дикетопиперазини от антарктически щамове, с което се обогатява

наличната информация относно микробното разнообразие на континента Антарктида, както и биопродукцията на екстремните микроорганизми с възможност за приложение.

Могат да бъдат обобщени, както следва:

- За първи път са изследвани два непроучени щама *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-14A и *Thermoactinomyces* sp. IMBAS-22A, изолирани от екскременти на пингвини, колекционирани на остров Ливингстън, Антарктида, продуценти на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини (циклични дипептиди). Двата щам са идентифицирани до вида *Laceyella sacchari* с помощта на молекулярно биологични методи. Тези данни допълват научната информация за ареала на този вид.
- Разработени са оригинални лабораторни технологии за изолиране, пречистване и препаративно хроматографско разделяне на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини от културалните течности на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и *Laceyella sacchari* IMBAS-22A.
- Доказана е пълната химическа структура чрез HPLC/DAD/ESI-MS, 1D и 2D ЯМР- анализи (^1H , ^{13}C , APT, HSQC и HMBC) на β -карболиновия алкалоид 1-метил- β -карболин (харман) с Мм 182 Da и емпирична формула $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2$, изолиран от културалната течност на *Laceyella sacchari* IMBAS-14A. Алкалоидът преди това е изолиран многократно от медицински растения и от *Pseudomonas* sp. K44-1 и за първи път от *Laceyella sacchari*.
- Доказана е предполагаемата частична структура на 1-ацетил-4-метил- β -карболина по метода на метаболомиката (HPLC/DAD/ESI-MS). 1-ацетил-4-метил- β -карболинът е с Мм 224 Da, емпирична формула $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ и за първи път е изолиран от природни източници.

- Получени са нови данни по отношение на биопродукцията на щам *Laceyella sacchari* IMBAS-22A. Той е продуцент на дикетопиперазините (циклични дипептиди) Cyclo(Pro-Leu), Cyclo(Pro-Phe), Cyclo(Leu-Val), Cyclo(Phe-Leu) и Cyclo(Leu-Leu), които са с антимикробно действие. Те са изолирани за първи път от вида *Laceyella sacchari*.

5. Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд:

Представеният дисертационен труд се основава на три научни публикации с Импакт фактор в списанията– Biotechnology and Biotechnological Equipment (2 публикации) и Доклади на БАН (1 публикация). Открити са и 5 цитата. Съгласно Правилника на Института по микробиология за условията и реда за придобиване на образователната и научна степен „доктор“, количествените показатели в случая отговарят на изискванията.

6. Критични бележки и коментари:

Нямам забележки към дисертационния труд. Поставените задачи са изпълнени и се вижда, че докторантката е представила достатъчен по обем материал, който е добре оформен. Ас. Бръчкова се представя като млад учен с много добра теоретична и практическа подготовка. Владенето на съвременни методи за изследване, както и умелото методично правилно поставяне на експериментите, са в основата на доброто интерпретиране на получените резултати.

Ще си позволя да препоръчам на докторантката да разшири изследванията върху практическото приложение на изолираните биологично активни вещества в бъдещата си работа по отношение възможностите за приложението им във фармацията и медицината, където тези продукти биха имали важна роля.

7. Заключение

Докторант Анна Бръчкова ни представя едно задълбочено изследване, водещо до идентификация на два щамове до вида *Laceyella sacchari* IMBAS-14A и

IMBAS-22A с помощта на молекулярно биологични методи. Разработени са оригинални лабораторни технологии за изолиране, пречистване и препаративно хроматографско разделяне на β -карболинови алкалоиди и дикетопиперазини от културалните течности. Доказана е химическата структура на получените биологично активни вещества и антимикробната им активност *in vitro*. Актуалността и научната стойност на тази дисертация са несъмнени. Докторантката е извършила голяма по обем експериментална работа на съвременно ниво, придобила е теоретична и методична компетентност в съответствие с изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“.

В заключение считам, че представеният ми за рецензиране дисертационен труд по обем, актуалност на тематиката, интересно научно изложение, показаните резултати и постигнатите приноси, заедно с наукометричните данни, отговаря на законовите изисквания според ЗРАСРБ и на Правилника за условията и реда за придобиване на научни звания и заемане на академични длъжности в Института по Микробиология, БАН. Давам положителна оценка на дисертационния труд и препоръчвам на членовете на Научното жури, да гласуват положително за присъждане на образователната и научна степен “ДОКТОР” на ас. Анна Иванова Бръчкова в професионално направление 4.3 Биологически науки, научна специалност 01.06.12. Микробиология.

София,

09.04.2018г.

Рецензент:

/доц. д-р Л. Кабаиванова/