

Рецензия

от проф. д-р Мариела Константинова Оджакова-Байтошева,
СУ „Св.Климент Охридски“

относно дисертационен труд за присъждане на научна степен **“доктор на науките”**

по професионално направление „Биологически науки“ – 4.3, научна специалност Микробиология“

Автор: доц. д-р Пенка Младенова Петрова , Институт по Микробиология, БАН

Тема: „Молекулярно-биологични изследвания на нови бактериални гликозид-хидролази с промишлено приложение“

Общо представяне на процедурата и дисертанта. Представеният комплект материали на хартиен и електронен носител е в съответствие с Правилника за развитие на академичния състав на ИМКБ, БАН и отговаря на критериите за придобиване на научната степен „доктор на науките“. Пенка Петрова завършва БФ на СУ “Кл. Охридски”, специалност Биотехнологични процеси, Генно и клетъчно инженерство през 1994 г. През 2003 г. защитава дисертационен труд на тема “Създаване на система за генно клониране при *Streptococcus thermophilus*” и придобива научна степен „Доктор“ по научна специалност 01.06.12 – Микробиология. От 2003 до 2009 г. работи в ИМКБ последователно като научен сътрудник, III, II, I степен, а от 2011 г. е избрана за доцент. От 2013 г. е Ръководител на Лаборатория по генна експресия, ИМКБ ; от 2015 г е председател на комисия за работа с ГМО (в ИМикБ) към МОСВ; от 2018 е ръководител на Департамента по обща микробиология и ръководител на Лаборатория по метагеномика и генна експресия. През 2019 г е избрана за директор на ИМКБ.

Актуалност на тематиката. Представеният дисертационен труд е обобщение на получената информация от проведените от доц. Петрова изследвания свързани с молекулярно-биологично характеризирани на нови гликозид-хидролази и създаване на рекомбинантни ензими с подобрени свойства и приложение в индустрията и медицината. Изучаването на ензимното разнообразие и кодиращите гени допринася за допълване на информацията за генетичните адаптивни и еволюционните механизми и за филогенетичните връзки между различни микробни групи. От друга страна, към гликозид-хидролазите спадат едни от най-важните индустриални ензими с приложения в хранително-вкусовата промишленост, медицината, фармацевтиката и биотехнологиите. Продуцентите на гликозидази са добре изучени, но информацията за кодиращите ги гени е оскъдна. Макар, че млечнокиселите бактерии са широко използвани в зърнени хранителни ферментации, за млечно киселите бактерии доскоро се считаше, че нямат амилазна или инулиназна активност и изолираните щамове с такъв фенотип бяха голяма рядкост. Генетичните основи на тези нетипични за МКБ ензимни активности са неясни, като са изолирани отделни гени с малка степен на сходство помежду им. Днес МКБ се употребяват широко като пробиотици и при създаването на нови синбиотични формули - комбинация между пробиотичен щам и пребиотични въглехидрати, които да поддържат неговото мултиплициране в гастроинтестиналния тракт Това налага изясняване на механизмите на усвояване на пребиотични фибри от пребиотичните щамове, в основата на които са гликозид-

хидролазите, синтезирани от МКБ. Проучването на генетичните и биохимични "взаимоотношения" между пробиотичния щам и пребиотичните фибри биха дали нова информация за способността на бактериите да усвояват фибрите, както и потенциално да синтезират такива. Селекцията на МКБ с амилазна активност би дала възможност за разработването на нов клас амилотични пробиотици с важни приложения при пациенти с хранителни алергии. Характеризирането на ензими с амилазна, β -фруктозидазна или β -галактозидазна активност от щамове МКБ са изключително ценни за изясняването на фината синбиотична връзка между про- и пребиотиците. Структурният и функционален анализ на гените и ензимите, отговорни за усвояването на фруктоолигозахариди и инулин допринасят за разбиране на механизма на този процес, което е важно при разработването на синбиотични продукти.

Структура на дисертационния труд. Дисертационният труд е структуриран според изискванията и съдържа въведение (2 стр.), литературен обзор (107 стр.), цел и задачи, материали и методи (28 стр.), резултати и обсъждане (157 стр.), изводи, приноси, списък на използваните литературни източници и списък на авторските публикации по темата на дисертационния труд. Включени са 52 таблици и 140 фигури. Списъкът на цитираната литература обхваща 625 източника, от които само 3 на кирилица.

Методика на изследването. Използвана е много разнообразна и съвременна методология (микробиологични биохимични, аналитични и молекулярно биологични методи), което илюстрира високата професионална компетентност на доц. Петрова и е в основата на високото качество и стойност на дисертационния труд. Подробно са описани използваните референтни щамове, съставът на хранителните среди и условията за култивиране, както и използваните класически микробиологични тестове. Биохимичните и аналитични методи включват анализ на ензимни активности, определяне на рН и температурен оптимум на ензими, ензимна кинетика, методики за пречистване на ензимни препарати и др. Молекулярно-биологичните методи включват получаване и пречистване на нуклеинови киселини, методите за клониране и анализ на рекомбинантни клонове, секвениране и филогенетични анализи. Прилагани са високо-разделителна мас-спектрометрия в комбинация с течна хроматография, RT-PCR, RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA-PCR), мултилокусен анализ MLST, пулсова електрофореза и др. Използваните методи са съвременни и адекватни на планираните изследвания.

Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите. Целта на дисертационния труд е молекулярно-биологично характеризирани на нови гликозид-хидролази и създаване на рекомбинантни ензими с подобрени свойства и приложение в индустрията и медицината. За постигането на тази цел са поставени 5 основни задачи, от които произтичат 6 конкретни подзадачи, подредени в хронологичен ред и отразяващи развитието на научните интереси на доц. Петрова и стремежът ѝ към разработване на съвременни тематика. Разделът „Резултати и дискусия“ съдържа 4 глави подредени в логичен ред и изложени на 157 страници.

Многообразието на изследваните ензими и бактериални продуценти изисква интердисциплинарен подход, съчетаващ познания в областта на микробиологията,

биохимията, ензимологията и молекулярната биология, рекомбинантните ДНК технологии, транскриптомиката и биоинформатиката. Базирайки се на прилагането на новите технологии в тези научни области, дисертационният труд ясно демонстрира задълбочените теоретични познания, професионалните умения и научно-изследователски интереси на доц. Петрова.

Доц. Петрова изследва богат спектър от бактериални гликозидхидролазни ензими, охарактеризирани чрез съвременни омикс-технологии. Обект на изследванията са ензимите, отговорни за разграждането или синтезата на пребиотичните въглехидрати (инулин, фруктоолигозахариди, галактоолигозахариди и нишесте) от млечнокисели бактерии. Съчетанието на синергичното действие на пребиотичните бактерии и пребиотичните въглехидрати се основава на специфични молекулярни взаимодействия между бактериите и полизахаридните молекули. Съвременните тенденции в разработването на нови бактериални препарати са насочени към употребата на синбиотици - лекарствени средства, които съдържат пребиотични щамове, способни да консумират или да произвеждат пребиотични въглехидрати. Ето защо характеризирането на щамове МКБ с нови или рядко проявявани гликозидхидролазни активности дава възможност за разработване на нови синбиотични препарати и функционални храни с нови качества и разширява научните познания за генетичните и биохимични механизми за адаптация на МКБ.

В настоящата работа са включени десетки видове и щамове бактерии, някои от които са използвани като продуценти на ензими, а други - като гостоприемници при хетероложната експресия на гени, кодиращи гликозид-хидролази. Разгледана е активността, субстратната специфичност и структурата на ензими със субстрат въглехидрати при Грам-положителни млечнокисели бактерии и такива от род *Bacillus*, като фокусът в изследванията е върху разкриване на генетичните детерминанти, определящи ензимната активност - секвениране на гените и проучване на механизмите, влияещи върху генната експресия. Някои от щамовете с проучени ценни ензимни активности имат доказано потенциално приложение при разработване на биотехнологии, синбиотични продукти и функционални храни.

Използвайки различни генетични подходи (PCR амплификация на 16S рДНК фрагмент, ARDRA, PFGE) от създадената колекция от 115 щама, изолирани от 97 ферментирали млечни и зърнени продукти, събрани от над 40 района в цялата страна е показано, че щамовете принадлежат към 18 вида МКБ като 4 от тях са представители на типичния за страната ни *L. d. bulgaricus*. Настоящото проучване включва ново цялостно изследване на микрофлората на киселото мляко, бозата, ръженото тесто и др. Резултатите показват, че новоизолираните щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* са генетично различни и се различават от стартерните култури на едни от най-популярните български кисели млека. Като резултат от генетичните изследвания са идентифицирани 75 щама пръчковидни МКБ и 40 - млечнокисели коки. Най-голямото биоразнообразие на МКБ се наблюдава при киселите млека от Родопите, много от които съдържат няколко вида МКБ с различна морфология. За първи път са изолирани видовете *L. paracasei* и *L. rhamnosus* като съпътстваща микрофлора. Симбиотичните взаимоотношения между *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Str. thermophilus* щамове са най-добре запазени в киселите млека от селата на Централна и Западна Стара планина.

Изследвана е способността на новоизолираните щамове да усвояват различни въглехидрати. При 25 от щамовете е показано образуването на триглицериди по време на метаболизма на лактоза, показана е трансферазна активност на β -галактозидазата и натрупването на пребиотика галакто-олигозахарид. Изследвани са 115 щамове от *Lactobacillus*, *Pediococcus* и *Enterococcus* за амилазна активност и са изолирани първите в света амилолитични представители на вида *L. sakei* и рода *Enterococcus*. Показано е, че гликоген-фосфорилазата и амилопулулазата нямат отношение към хидролизата на нишесте от *Lc. lactis* и че в присъствието на глюкоза β -амилазните гени не се експресират поради катаболитна репресия.

Намрени са 4 МКБ които разграждат дълговерижен инулин. Гените, кодиращи β -фруктозидазите на щамове *L. paracasei* B41 и LC1 са секвенирани и биоинформатичният анализ показва, че ензимите принадлежат към клетъчно-свързаните β -фруктозидази и представляват нови, неописани досега ензими.

Доц. Петрова клонира гена (*amy41*), кодиращ амилопулулаза в изолирания от нея щам *L. paracasei* B41 и го експресира в подходящ вектор за индуцируема експресия под силния фагов T7-промотор и експресира в *E. Coli*, като този вектор за първи път е използван успешно в качеството му на експресионен, а не само на клониращ вектор.

Показана е способността на *P. acidilactici* PD3 да хидролизира ФОЗ, захароза и инулин *in vivo*. За идентифициране на гените и протеините, участващи в усвояването на ФОЗ е конструирана геномна библиотека на *P. acidilactici* PD3 и са селектирани два клона с повишена способност за усвояване на фруктоза или ФОЗ. Генното секвениране показва, че това са гени отговорни за транспорта на захари.

За първи път е направен анализ на образуването на ГОЗ от щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Резултатите показват, че няколко щамове спонтанно образуват тетразахариди и относително високи количества тризахариди, които са стабилни след 48-часова ферментация. Структурният анализ на ГОЗ, продуцирани от *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 43 чрез LC-MS доказва, че получените тризахариди съдържат β -(1 \rightarrow 4) и β -(1 \rightarrow 6) гликозидни връзки, като β -(1 \rightarrow 4) свързаната галактозна единица е в много необичайна позиция и се отчита в ГОЗ за първи път. Уникалната способност на българските щамове *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* да образува β -(1 \rightarrow 4) връзки между галактозилните остатъци и лактозата вероятно са свързани с нови функционални свойства на ГО.

Изследвана е и антимицробната активност на новоизолираните щамове МКБ. Три от щамовете, изолирани от боза (*L. paracasei* B41, *L. pentosus* N3 и *L. plantarum* Vom 816) се оказват амилолитични пробиотици, тъй като освен амилазната си активност, те демонстрират висока антибактериална активност срещу *Escherichia coli* HB101, *Vibrio cholerae* V13, *Klebsiella pneumoniae* G31 и *Bacillus subtilis* WB800N.

За първи път е показана способността за синтез на индол-3-пропионова киселина – мощен невропротективен антиоксидант, както и на L-цитрулин използван като лаксатив и като кръвно-плазмен маркер за синдрома на раздразненото черво на човека. Други доказани за първи път метаболити, произведени от МКБ са цикличните пептиди с антибактериално действие: циклофенилаланил-пролил и циклолевцил-пролил.

Показано е, че българските щамове МКБ притежават добри технологични характеристики и като най-перспективни за приложение в хранително-вкусовата

промишленост са щамове, синтезиращи екзополisahариди и устойчивите на термичен шок и алкохоли. Показано е, че хидрофобността на клетъчната повърхност е обратно пропорционална на степента на преживяемост на бактериите в среда с бутанол. Разработен е метод за бърза идентификация на щамове, притежаващи гени за Hsp. Открити са 5 щамове, които съдържат нови плазмиди с *hsp*-гени

Друго успешно разработено направление в работата е свързано с изолирането на нови ензими с циклодекстрин-глюканотрансферазна активност. Интересът към тези ензими е продиктуван от широкото приложение на техните продукти циклодекстрини в различни отрасли като средство за „капсулиране“, пренос и съхранение на биологично активни вещества. Представените в този раздел резултати имат значителен принос, тъй като са свързани със създаването на една от първите рекомбинантни ЦГТ-ази. Освен това, успешното имобилизиране на тези ензими в природни магнитномодифицирани носители и разработването на нов метод за многократно използване на биокатализаторите е довел до получаването на най-високите добиви на циклодекстрини в света, като продукцията им е многократно по-ефективна в сравнение с употребата на природни ензими. Нов ген, кодиращ ензим циклодекстрин-глюканотрансфераза при щам *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB е клониран и свърх-експресиран в гостоприемник *E. coli* BL21(DE3). Пречистеният рекомбинантен ензим е с молекулна маса 75.5 кДа, два рН оптимума (рН 6.0 и 8.0) и Т-оптимум 60°C. Имобилизиран в магнитно-модифицирани носители рекомбинантният ензим води до продукцията на 36 мг/мл циклодекстрини.

Бактериални щамове, които притежават гликозид-хидролази, способни да деградират целулоза и хемицелулоза, съчетани с превръщането на тези полисахариди в ценни продукти и горива са търсени и към тях има особено повишен интерес. Селекционирани са 57 нови щамове Грам (+), пръчковидни, каталазо-положителни бактерии, с морфология на колонии, типична за видовете, принадлежащи към 11 вида от род *Bacillus*. Българският изолат *B. velezensis* 5RB е причислен към вида едва след пълно геномно секвениране и *in silico* анализ на степента на ДНК-ДНК хибридизация с пълни геноми на всеки един от изброените видове. Някои от новооткритите видове бацили са нови за нашата страна и с нетипично местообитание. Българските изолати от род *Bacillus* имат потенциал за директна хидролиза на възобновяеми природни субстрати. Щамове продуцират ензими, разграждащи целулоза, арабиноксилан, ксилоглюкан, разклонен арабинан, ксилан, галактоманан, β -глюкан, амилоза, галактан и курдлан. В генома на *Bacillus velezensis* 5RB са налични 225 гена, отговорни за конверсията и транспорта на въглехидрати. Щам *B. velezensis* 5RB има генетичната база да конвертира целулоза, лигноцелулоза, нишесте и инулин директно в ценни нискомолекулни продукти. Присъстват и седем пълни клъстера за синтез на антибиотици (макролактин, бацилаен, дефицидин, фенгицин, бацилбактин, бацилисин и сърфактин).

Един от разделите в дисертацията е посветен на изследване на ген (*nanH*), кодиращ ензим неураминидаза. За първи път е осъществено детайлно молекулярно-биологично изследване на неураминидазата от нетоксигенен щам *Vibrio cholerae*. Секвенирането и характеризирането на гена *nanH* и кодиращия от него ензим дават възможност за разработване на безопасно производство на сиалидаза.

Последният раздел е свързан с използването на ψ -глюкуро니다зата като модел за оптимизиране на хетероложна генна експресия. В дрождева система за експресия с

гостоприемник *Ogataea polymorpha* успешно е въведен генът кодиращ β -глюкуронидаза. Доказани са повишени нива на експресия при диплоиди и мейотични сегреганти. Подходът за създаване на диплоидни щамове, носещи хетероложни гени, е обещаващ за подобряване на продуктивността на щамове от вида *O. polymorpha*, а получените положителни резултати позволяват да се създадат нови стратегии за повишаване нивата на хетероложната експресия в метилотрофните дрожди.

Въз основа на получените резултати и тяхното обсъждане са направени 18 извода. Приносите на дисертационния труд са групирани като научни и научно-приложни приноси. Отразяват най-съществените постижения на дисертационния труд и са ясно и точно формулирани.

Преценка на публикациите и личния принос на дисертанта

Приложен е списък на 33 научни публикации включени в дисертационния труд. От тях две са глави от книги, реферирани в Scopus, 18 са в списания с ИФ (общ ИФ 25.762), една в списание със SJR, 4 публикации са в сборници от международни конференции в пълен текст, 5 са в списания без импакт фактор и 3 са в сборници на национални конференции. В 16 публикации доц. Петрова е първи автор, а в 21 – кореспондиращ. Част от резултатите са представени на 37 международни и национални научни форуми.

Според квартилите, в които *Journal Citation Reports (JCR)* на *Web of Science* групира научните списания с импакт-фактор (ИФ) 3 от тях са с Q1; 13 са с Q2 и 3 са с Q3. По показател Г (публикации извън хабилицационния труд) от Таблица 1 на ППЗРАСРБ доц. Петрова събира 410 т. при изискван минимум от 100 т., а по показател Д (цитирания) 740 г. при минимум 100 т. Така при изискван минимум от общо **350 т.** съгласно ППЗРАСРБ доц. Петрова има **1300 т.**, с което надхвърля минималните национални изисквания. Съгласно допълнителните критерии за израстване на академичния състав в ИМикБ, за научната степен „Доктор на науките“ се изискват минимум **150** цитата, а забелязаните цитати, свързани с публикациите от дисертационния труд са 281. Приложен е подробен списък на автори и публикации, цитирали научни трудове.

Автореферат

Авторефератът е с обем 114 страници и отразява съдържанието на дисертационния труд, изводите, приносите и публикациите, свързани с него.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационния труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Наукометричните показатели на доц. Петрова надхвърлят многократно както минималните национални изисквания на ППЗРАСРБ за присъждане на научната степен „Доктор на науките“, така и допълнителните критерии за израстване на академичния състав в ИМикБ. Представените материали и дисертационни резултати

напълно съответстват на специфичните изисквания на правилника на ИМкБ-БАН за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че дисертантът Петя Петрова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност „Микробиология“ като демонстрира качества и умения за провеждане на изследвания с получаване на оригинални и значими научни приноси.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведените изследвания, постигнатите резултати и приноси, и предлагам на почитаемото научно жури да присъди научната степен „доктор на науките“ на Пенка Младенова Петрова в област на висше образование: професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Микробиология“.

29.02.2020 г.
Гр. София

Рецензент:
Проф.д-р Мариела Оджакова