

До председателя на Научното жури  
доц. д-р Людмила Кабаиванова, назначено  
със заповед на Директора на ИМикБ - БАН

### РЕЦЕНЗИЯ

Дисертационен труд: „Молекулярно-биологични изследвания на нови бактериални гликозид-хидролази с промишлено приложение“ за присъждане на научната степен „Доктор на науките“ на доц. д-р Пенка Младенова Петрова, предложен за защита по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Микробиология“.  
**Рецензент:** проф. Годор Кантарджиев, дм, дн - НЦЗПБ

Нямам общи  
публикации или конфликт на интереси от друг  
характер по смисъла на ЗРАСРБ с кандидата

#### **Карьерно развитие на кандидата**

Кандидатът за научната степен "Доктор на науките" г-жа Пенка Младенова Петрова е завършила Биологически факултет на СУ "Св. Кл. Охридски" през 1994 г., със специалност "Биотехнологични процеси", профил "Генно и клетъчно инженерство". В периода 1995г – 2003 г. работи в началото като специалист, а последствие и асистент в Институтите по молекулярна биология и микробиология на БАН. През 2004 г.

получава ОНС "Доктор", а от 2011 г. е доцент в Секция "Микробна генетика" на Института по микробиология на БАН (ИМикБ). От 2013 г. ръководи лаборатория "Метагеномика и гена експресия", а от 2018 г. - Департамента по обща микробиология в ИМикБ.

### **Актуалност на разработваните в дисертационния труд научни проблеми**

Редица проблеми на съвременния човек, свързани с подобряване на качеството на живот, здраве и дълголетие могат да бъдат решени чрез развитие на модерните клонове на микробиологията. Нарастващите изисквания на европейския потребител към консумираните продукти неизменно водят към производството на функционални храни, съчетаващи пълноценност и полезност, като все по-актуални са научните изследвания, посветени на взаимоотношенията между макро- и микроорганизмите и опитите за проучвания върху човешкия микробиом. Модерните синбиотични препарати (синбиотици), задължително съдържат пробиотични млечнокисели бактерии в съчетание с техните субстрати инулин и фруктоолигозахариди. Изучаването на нови бактериални гликозид-хидролазни ензими, които стоят в основата на взаимодействията между пробиотиците и пребиотиците е част от актуалните направления в рецензираната дисертация.

Друго предизвикателство още в първите десетилетия на XXI век е изчерпването на енергийните фосилни ресурси и необходимостта да се търсят алтернативни пътища за синтез на органични съединения чрез модерни биотехнологии, основани на евтини и възобновяеми природни субстрати. Това налага нуждата от още по-задълбочено проучване на генетичната база и механизмите на действие на хидролазните ензими, отговорни за конверсията на биомаса в ценни органични продукти. Тъй като генетичното разнообразие определя както степента на адаптивност на видовете, така и възможните приложения на микроорганизмите в промишлеността и медицината, може да се отбележи, че предложеният дисертационен труд разглежда актуални тематики с доста неизяснени и интересни досега аспекти.

## **Общи данни за структурата и обема на дисертационния труд**

Дисертацията е структурирана по препоръките на NEMJ и съдържа кратко въведение (2 стр.), литературен обзор с акценти върху мотивите на проучванията (107 стр.), цел и задачи са представени точно, материали и методи са описани изчерпателно (28 стр.), резултати и обсъждане са представени ясно, като предпоставка за изводите (157 стр.), изводите са категорични на основата на научни доказателства, приноси са добре структурирани, представен е списък на използваните литературни източници и списък на публикации на авторката, по темата на дисертационния труд. Общият обем на дисертацията е 358 страници, а доказателствения материал е представен в 52 прегледни и поясняващи текста таблици и 140 фигури илюстриращи обсъжданото. Цитираните литературни източници са 625 източника, от които 3 с български букви, а 610 публикации са на латиница и 11 представляват бази данни в интернет. Над 80% от цитираната литература е публикувана след 2000 г., което говори за актуалност на проблематиката и добра литературна осведоменост на авторката. Дори част от цитираните статии са от 2019 г.

## **Оценка на литературния обзор, целта и задачите**

Литературният обзор е структуриран за по-голяма яснота в четири основни глави. Те са посветени на въглехидратите, също така на ензимите със субстрат въглехидрати, бактериалните продуценти на гликозид-хидролази и приложенията на хидролазните ензими в промишлеността и медицината. В първа глава на обзора са разгледани структурата и функциите на гликаните и тяхното значение в живата природа и като пребиотици. Представени са структурни формули на по-рядко срещаните в научната литература полизахариди и сиало-гликани. Следва подробна класификация на гликозид-хидролазните и гликозид-трансферазни ензими, а като голямо достойнство на работата може да се спомене включването на най-съвременните бази данни, напр. CAZy, която класифицира ензимите според техните аминокиселинни секвенции и дава

възможност за еволюционни проучвания на ензимните семейства и представлява едно от най-новите достижения на ензимологията.

Логично, във връзка с изследванията в дисертацията, най-голямо внимание и обем в литературния обзор е отделено на бактериалните гликозидази със субстрат нишесте: амилази, пулуланази, амилопулуланази, циклодекстрин-глюканотрансферази, гликозидази със субстрат фруктани, целулази, и др. За всички ензими е разгледана тяхната протеинова структура и кодиращите ги гени, което прави представеното много ценно и информативно. Много от ензимите са показани като триизмерни изображения с добро качество. Направена е съпоставка между ензимите, продуцирани от различни млечнокисели бактерии и бифидобактерии и техният пробиотичен потенциал, като в таблици са описани и съвременни пробиотични препарати на различни производители и микробния състав на съответните продукти.

Следващата глава от литературния обзор описва тип *Firmicutes*, към които принадлежат всички описани в раздел "Резултати и дискусия" видове, както и молекулярните подходи в идентификацията и типизирането на бактериите.

По-подробно са описани семейство *Bacillaceae* (като продуценти на гликозидази) и млечнокиселите бактерии (МКБ) - биохимични ферментационни пътища, сравнение на бактериалните геноми, продуцирани хидролазни ензими.

Последната глава от литературния обзор е посветена на приложението на МКБ в млечнокиселата ферментация на храни и напитки на зърнена основа.

Като цяло, литературният обзор е със съдържание, адекватно на последващите резултати и обсъждане, а съотношението между тези раздели е 1:1.5. На места обзорът е доста подробен, но това би могло да се оправдае от нуждата от по-детайлни обяснения на ензимните структури или генетични детерминанти.

Изводите от обзора очертават логиката в поставянето на целта на дисертационния труд: да бъдат характеризирани нови гликозид-хидролази и да бъдат създадени рекомбинантни ензими с подобрени свойства и приложение в индустрията и медицината. Задачите, в хода на които да се постигне целта, са четири, с шест подзадачи. Формулирани са ясно и дават възможност за проверка на тяхното постигане.

## Материали и методи

Методите, използвани в дисертацията са разделени на 1.микробиологични, 2.биохимични,3. аналитични и 4.молекулярно-биологични. Използвани са както класически методи за изолиране на бактериални щамове и биохимични тестове (за усвояване на захари, измерване на количеството на редуциращи захари и белтък, количествено определяне на ензимни активности: амилазна,  $\beta$ -фруктозидазна, ЦГТ-азна,  $\beta$ -глюкуронидазна и др., определяне на рН и температурен оптимум на ензими, влияние на различни метални йони и ЕДТА върху ензимната активност, определяне на субстратна специфичност на ензимите и т.н.), така и най-съвременни омикс-подходи (геномика и транскриптомика). Количественият анализ на получените галактоолигозахариди е извършен чрез течна хроматография, комбинирана с мас-спектрометрия (LC-MS).

Част от резултатите, свързани със секвениране на гени и геноми, както и филогенетичните анализи показват добри познания в областта на биоинформатиката.

## Резултати и обсъждане

Резултатите са комбинирани с обсъждане, поради големият обем на представения материал, като този вариант на изложение дава възможност за своевременно сравнение на получените резултати със световния опит в областта. Тази глава съдържа четири отделни раздела:

- (1) Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими при млечнокисели бактерии,
- (2) Гликозид-хидролазни ензими при род *Bacillus*,
- (3) Молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими със субстрат сиалова киселина
- (4) Молекулярни изследвания на  $\beta$ -глюкуронидаза.

В първия раздел са описани изолирането и молекулярно-генетичната идентификация на голяма група (115 щамове) млечнокисели бактерии. За идентифицирането на щамове от вида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* са приложени няколко молекулярни метода (ARDRA, пулсова електрофореза, мултилокусен секвенционен анализ), които се прилагат за първи път в такава комбинация и са принос на работата в областта. Приложен е генетичен метод за разграничаване на видовете *L. casei* и *L. paracasei*, успешно е и молекулярно-генетичното разграничаване на подвидовете на *Lc. lactis*.

Едни от най-значимите научни резултати в дисертацията са свързани с изследването на ензимите, участващи в усвояването на нишестето при амилолитични МКБ (аМКБ). Извършен е транскрипционен анализ на експресията на гени, кодиращи ензимите  $\alpha$ -амилаза, гликоген-фосфорилаза, (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -глюкан разклоняващ ензим,  $\alpha$ -глюкозидаза, олиго-1,6-глюкозидаза и неопулуланаза, като предварително са идентифицирани консервативните райони в гените, кодиращи нишестемодифициращите ензими. Наличието и експресията на гени е доказано при няколко филогенетично отдалечени групи МКБ - представители на род *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* и *Streptococcus*. Отделно е направено изследване на генната експресия при *Lactococcus lactis* щам В84. Тъй като изолираният в България щам е първият амилолитичен представител на вида, доказателството за експресията на гени, кодиращи клетъчно-свързана и цитоплазмена амилаза има принос към световната наука.

Друг тип гликозид-хидролазни ензими с голямо значение за прилагането на МКБ като пробиотици са ензимите със субстрат инулин и фрукто-олигозахариди. В дисертацията са показани резултати за клониране и секвениране на гени, кодиращи фруктан- $\beta$ -фруктозидаза при *L. paracasei*, пречистване на стенно-локализираните  $\beta$ -фруктозидазни ензими от същите щамове и е проследен контрола над генната експресия. В тази връзка, са разгледани и транспортните системи, свързани с усвояването на фруктоолигозахариди от *Pediococcus acidilactici*.

Молекулярното проучване на ензими с  $\beta$ -галактозидазна активност е проведено при вида *L. bulgaricus*. За първи път е доказан синтез на пребиотични галактоолигозахариди в кисело мляко и в лактозна среда. В дисертацията следва раздел

на изследване на пробиотични и технологични характеристики на МКБ, като е доказано, че те имат висока протеолитична активност и поради това - способност да синтезират пептиди с потенциално полезно действие.

Втората глава от дисертацията обхваща изследване на гликозид-хидролазни ензими при род *Bacillus*. Проучени са нови и рекомбинантни ензими циклодекстрин-глюканотрансферази и са изолирани бацилни продуценти на ензими, разграждащи целулоза и хемицелулоза. Изцяло е секвениран геном на щам *Bacillus velezensis* 5RB, а това е първият *de novo* секвениран бактериален геном от български учени.

Приложение в медицината биха намерили резултатите, представени в трета глава от дисертационния труд, посветени на молекулярно-биологичните изследвания на гена, кодиращ неураминидаза при *Vibrio cholerae*. Характеризирането на ензима при нетоксигенен щам от вида дава възможност за неговото безопасно промишлено производство за диагностични цели.

Последната (четвърта) глава от резултатите засяга изследвания на  $\beta$ -глюкуронидаза и нейната успешна експресия в дрожди от вида *O. polymorpha*.

Като главни постижения на дисертационния труд могат да се изтъкнат следните научни приноси:

1. За първи път в световната наука са идентифицирани гените, отговорни за хидролизата на  $\alpha$ -глюкани при видовете *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus paracasei*. Изолирани са първите в света амилолитични представители на вида *Lactobacillus sakei* и рода *Enterococcus*. Създаден е метод за бърз транскрипционен анализ на гени, отговорни за усвояването на нишесте от амилолитични млечнокисели бактерии. Създаден е нов PCR-базиран метод за детекция на къси термошокови гени в *Str. thermophilus*, което дава възможност за бърза селекция на щамове за влагане в стартерни култури. За първи път е демонстрирано съдържанието на пребиотичните въглехидрати ГОЗ, индол-3-пропионова киселина и циклични антимикуробни пептиди в българско кисело мляко.
2. Новост в науката е доказването са нови ензими фруктан- $\beta$ -фруктозидази при пробиотичния вид *Lactobacillus paracasei*.

3. Открити са нов за науката ген и нов ензим циклодекстрин глюканотрансфераза при *Bacillus pseudocalophilus*. За първи път в световната практика рекомбинантен ензим циклодекстрин глюканотрансфераза е имобилизиран в магнитно-модифицирани носители с цел получаване на циклодекстрини. Повторната употреба на ЦГТ-азен магнитен биокатализатор показват възможността за получаване на три до четири пъти по-голямо количество ЦД за 120 мин в сравнение с добива на еднократно използваните ензимни препарати.
4. Оригинална за науката е извършената хетероложна експресия на  $\beta$ -глюкуронидаза в диплоидни щамове дрожди *Ogataea polymorpha*.
5. За първи път в света *in vivo* е доказан синтез на ензими, хидролизиращи целулоза и хемицелулоза при видовете *B. safensis*, *B. toyonensis* и *B. velezensis*. Секвениран е пълния геном на *Bacillus velezensis* 5RB, способен да превръща лигноцелулозни субстрати в ценни продукти.
6. За първи път световната практика е осъществено детайлно молекулярно-биологично изследване на неураминидаза от нетоксигенен щам *Vibrio cholera nonO1*. Секвенирането и характеризирането на гена *nanH* и кодирания от него ензим дават възможност за разработване на безопасно производство на сиалидаза.

#### **Публикации свързани с дисертацията и оценка на наукометричните показатели**

Публикациите, свързани с темата на дисертацията са 33. От тях, две са глави от книги, 18 са журнални статии в списания с академична редколегия и с импакт фактор, една статия е в списание с SJR, а 4 публикации са доклади, публикувани от научния комитет на форума в сборници от международни конференции. В повечето от публикациите кандидатката е първи или кореспондиращ автор, което показва нейното методично участие и водеща роля при изготвянето им.



Публикациите по дисертацията са цитирани 281 пъти, доказателство, че авторката им е добре позната и положително оценена в научната област и има изграден авторитет.

### **Заключение**

В дисертационния труд са получени значими резултати, в актуална научна област и с потенциално приложение в сферата на хранителната промишленост, медицината и биотехнологиите. Повечето от тях са оригинални и публикувани в реномирани списания с импакт-фактор и многократно цитирани. Наукометричните показатели на кандидата надхвърлят както минималните национални изисквания на Правилника за приложение на ЗРАСРБ за присъждане на научната степен „Доктор на науките“, така и допълнителните критерии за израстване на академичния състав в ИМикБ. В заключение, подкрепям присъждането на научната степен „Доктор на науките“ на доц. Пенка Младенова Петрова по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Микробиология“.

Проф.Д-р Тодор Кантарджиев,дм,дмн

03.03.2020 г.