

РЕЦЕНЗИЯ

Относно: Научната продукция на **гл. ас., д-р Надя Стойчева Радченкова** за участие в конкурс за присъждане на академичната длъжност „Доцент” за нуждите на лаборатория „Екстремофилни бактерии“, Департамент „Общамикробиология“, ИМикБ-БАН по професионално направление 4.3 Биологически науки. Конкурсът е обявен в ДВ бр.29 от 09.04.2021 г.

от доц. д-р Златка Милчева Алексиева Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН

Д-р Надя Стойчева Радченкова, гл. ас. в лаборатория „Екстремофилни бактерии“ към Департамент „Обща микробиология“ в И-т по микробиология, БАН е единственият кандидат, подал документи по обявения конкурс. Документите по конкурса отговарят на изискванията на ЗРАСРБ и съответните към него Правилници.

ПРОФЕСИОНАЛНА БИОГРАФИЯ

Надя Стойчева Радченкова е магистър-инженер и е завършила висше образование със специалност „Информационни и управляващи технологии” през 1999 г. в ХТМУ-София. От 1995 г. е на работа в ИМикБ, БАН, от 1999 г. е специалист, а от 2008 г. е асистент в лабораторията по Екстремофилни бактерии, отдел Приложна микробиология (сега към Департамент „Обща микробиология“). От началото на 2013 г. е докторант на самостоятелна подготовка в ИМикБ, БАН. През 2014 г. защитава дисертация на тема: „Продукция и характеристика на екзополisahарид (и), синтезиран(и) от термофилен щам *Aeribacillus pallidus* 418” и получава образователната и научна степен „Доктор“. От 2014 г., след проведен конкурс, д-р Надя Радченкова заема академичната длъжност „Гл. асистент” в ИМикБ-БАН.

Предмет на нейните научни интереси са екзополisahаридите, изолирането на продуктивни щамове, определянето на морфологични, физиологични, биохимични свойства на микроорганизми, пречистването и характеризирането на новоизолирани полимери.

ОСНОВНИ НАУКОМЕТРИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ, СВЪРЗАНИ С КОНКУРСА

Анализът на данните, отнасящи се към показателите по Националните минимални изисквания от Правилника за приложение на ЗРАСРБ, показва следното: За притежаването на ОНС „Доктор“ са определени 50 т. По показатели от група В са представени 10 публикации: 2 с Q1; 2 - с Q2; и 6 - други, което приведено в точки дава сума от 126 т. По показателите от група Г, в рамките на показател 7 са представени

11 публикации, от които 6 - с Q1; 1 публикация с Q2; и 4 публикации са с Q3. По показател 8 са включени 2 глави от книги. Тези данни дават общо сумата от 260 т. по показатели Г. От показателя за цитирания на публикациите в световно известни бази данни с научна информация (Web of Science и Scopus) или общо за показатели Д, са представени 320 цитирания без автоцитати, както и 10 в други публикации, с които се набират 650 т. Общият брой точки, включени в група показатели Е за участието в международни и национални научно-изследователски проекти е 150.

Общият брой точки от данните попълнени в Талицата за минималните национални изисквания е 1236 при минимално необходими 430 т.

Изводът е, че д-р Надя Радченкова преизпълнява изискванията по всяка една от групите показатели, необходими за заемане на научната длъжност „Доцент“ и като цяло набира неколкостранно повече точки от задължителния национален минимум.

Относно „Допълнителни критерии за изграждане на академичния състав в ИМикБ“ също може да се отбележи, че критериите са преизпълнени. За конкурса, д-р Надя Радченкова е приложила общо 23 научни труда, от които 21 научни публикации (15 реферирани в WoS/Scopus и 6 в други реферирани списания) и 2 глави от книги, които са извън дисертацията, както и 9 научноизследователски проекти. Импакт факторът на публикациите, представени за настоящия конкурс е 30,732.

НАУЧНИ ПРИНОСИ

Представените за конкурса научни трудове са разработки в областта на биоразнообразието сред екстремофилните микроорганизми (бактерии и археи) и синтеза на ценни биологично активни вещества (микробните полизахариди екстремозими), което води до получаването на нови оригинални научни приноси. Обект на специално внимание са термофилите, обитаващи български термални извори и халофилите от ниши, свързани с черноморските солници. В резултатите от тези изследвания са основните приноси в научната дейност на гл. ас. д-р Надя Радченкова.

За първи път е проведено проучване и са изолирани халофилни бактерии в два черноморски солника (Поморийски и Бургаски). Резултатите показват високо таксономично и метаболитно бактериално разнообразие. Установено е, че всички изолати (20 различни умерено халофилни и два халотолерантни щамове, групирани в 8 рода), са алкалотолерантни и 41% от тях са психротолерантни. Повече от половината от щамовете проявяват антимикробна активност, а девет от тях, продуцират екзополisahариди (ЕПЗ). Най-високото ниво на ЕПЗ е наблюдавано при щам 28

Chromohalobacter canadensis. За първи път при халофилни бактерии са открити ксантан лиаза, гелан-лиаза, арабиназа и фитаза. Показано е, че изследваната зона е с висок ресурс от халофилни бактерии с биотехнологичен потенциал (Boyadzhieva et al, 2018 – Г7).

Детайлно е изследвано бактериалното съобщество в Р18, най-голямото солено езеро в Поморийските солници (34% соленост). Получени са оригинални резултати, които демонстрират голямо разнообразие с доминиране на различни родове, които не са докладвани преди като доминиращи. Идентифицирани са нови 16S рРНК секвенции, някои от които образуват отделни клонове с подобие по-малко от 85%. Секвенциите са отнесени към 15 бактериални рода от четиритипа и един-кандидат тип. Преобладават представителите на типа Firmicutes (47,5%) (Kambourova et al, 2017 – Г7).

За първи път е описана халофилна бактерия *Chromohalobacter canadensis* 28 (Поморийски солници), синтезираща полимер, съдържащ полиглутаминова киселина (PGA). Оптималната температура за синтеза на биополимера е 30°C и рН 7,3 при концентрация 15% NaCl. Изследван е дисперсията и характеристиката на моделни емулсии, съдържащи слънчогледово масло и различни концентрации на биополимер, синтезиран от халофилен шам *Chromohalobacter canadensis*. Д-р Радченкова има съществен принос за разработване на инженерните аспекти на ферментационните процеси за ЕП синтез. За ефективно мащабиране на биореакторите с цел точна оценка за преноса на кислород са пределени параметрите на масообмен и най-ниските стойности на K_{La} (коефициент на масопренасяне), подходящи за ферментацията с най-висок синтез. Установено е, че непрекъснатият режим на култивиране с ниски скорости на разреждане. Оптимизирането на културалната среда и физикохимичните условия за култивиране е довело до двукратно увеличение на продукцията на извънклетъчната полимерна субстанция от щама и допълнително увеличение до 3,08 мг/мл в присъствието на повърхностноактивни вещества. Функционалният анализ на свойствата на продуцираният полимер, ясно очертава потенциала му за приложение в козметичната индустрия. (Radchenkova et al, 2018 - Б; Radchenkova et al, 2020 – Б; Kisov et al, 2018; - Б).

Биотехнологичният интерес стимулира изследванията на термофилни микроорганизми. Екзополисахаридите (ЕПЗ) от термофилни микроорганизми представляват специален интерес поради предимствата на термофилните процеси и непатогенната природа на полимерните молекули. Промисленото им приложение обаче е възпрепятствано от сравнително ниската биомаса и съответно нисък добив на ЕПЗ.

Няколко термофилни продуцента на ЕПЗ са изолирани от български горещи извори и три от тях, принадлежащи към различни родове, са избрани за по-детайлни изследвания: *Geobacillus tepidamans* V264, *Aeribacillus pallidus* 418 и *Brevibacillus thermoruber* 423. Добивът на ЕПЗ за щам *B. thermoruber* 423 е сравним с този от мезофилни бактерии. Изследванията на техните молекули показват непознат състав, високо молекулно тегло и термостабилност. ЕПЗ от *G. tepidamans* V264 демонстрира биологична активност срещу цитотоксични съединения, докато този от *B. thermoruber* 423 показва добра съвместимост с фибробластни клетъчни линии от маймуни. Установените функционални свойства и биологична активност определяха възможността за тяхното бъдещо приложение в козметиката и медицината (Kambourova et al, 2018 - Б).

Изследвана е способността на щам *Aeribacillus pallidus* 418 да синтезира по-висока продукция ЕПЗ в непрекъснат режим на култивиране в сравнение с периодични култури, като при това се елиминират времето за почистване и стерилизация на съда. Синтезираният ЕПЗ проявява не-Нютоновото псевдопластично и тиксотропно поведение, което определя ценните му физико-химични свойства и търговски предимства. Предложеният непрекъснат подход за екзополимерен синтез може да има огромен икономически потенциал за индустриално производство на термофилни полизахариди.

Създаден е оригинален математически модел на процеса на синтеза на екзополisahариди (ЕПЗ) на базата на експериментални данни с *Aeribacillus pallidus* 418, получени от процеса на периодична ферментация и идеи за моделиране, заимствани от ензимната кинетика. Основна особеност на предложените реакционни схеми, респ. модели, е предположението, че клетъчната биомаса се състои от две динамично взаимодействащи клетъчни фракции. Приложеният математически модел позволява да се направят изводи за основните биологични механизми, формулирайки последните под формата на прости стъпки на биохимична реакция. (Radchenkova et al, 2014 - Б; Radchenkova et al, 2015 - Б).

Чрез сравнителен анализ на секвенциите на гени за 16S рРНК и гликозилхидролаза от сем 57 (GH-57) е определено археалното и бактериално разнообразие в два Български горещи извора, от различен тектоничен произход и различни температури на водата (извор Левуново - 82°C и извор Ветрен Дол - 68°C). Анализът на гена GH – 57 позволява повишена резолюция на оценка на биологичното разнообразие и задълбочен анализ на специфични таксономични

групи. Филогенетичните анализи разкриват, че повече от 1/3 от археалните и 1/2 от бактериалните секвенции показват по-малко от 97% степен на подобие с други познати секвенции. Анализът на създадените клонови библиотеки от извор Левуново показват принадлежност на секвенциите към пет археални групи от Crenarchaeota и Euryarchaeota, а повечето от извор Ветрен Дол са отнесени към топловодна група Crenarchaeotic. Предполага се формирането на термофилна група в Mesanarchaeales (Stefanova et al, 2015 – Г).

При проведен скрининг за термофилни продуценти на екзополisahариди е изолиран високопродуктивен щам *Brevibacillus thermoruber* 423. Тази бактерия е сред ограничен брой на докладваните термофилни продуценти на ЕПЗ и показва най-високо ниво на полимерен синтез. За първи път е анализиран целият бактериален геном на термофилния вид *Brevibacillus*. Идентифицирани са основни гени, свързани с биосинтезата на ЕПЗ и в съчетание с експериментални доказателства е създаден хипотетичен механизъм за биосинтеза на ЕПЗ.

Изследванията в различни условия на култивиране са показали оптималните условия за синтез. Установени са химическата, реологичната и биологичната характеристика на ЕПЗ. Установено е, че в биореактор се постигат два пъти по-високи добиви и три пъти по-висок синтез от описаните до сега в научната литература.

B. thermoruber 423 има много потенциални приложения в биотехнологиите и промишлеността поради способността му да използва ксиланоза и да синтезира ЕПЗ, изопреноиди, етанол / бутанол, липази, протеази, целулази и глюкоамилазни ензими, както и неговата устойчивост на арсен. Щамът съчетава предимството да е непатогенен с бърз синтез и е с потенциал на моделен микроорганизъм за синтез на ЕПЗ (Yasar Yildiz et al, 2014– Г; Yildiz et al, 2015– Г).

Изследванията са принос към установяването на биологичните механизми и цялостната геномна организация на термофилните продуценти на ЕПЗ и дават възможност за разработване на рационални стратегии за генетична и метаболитна оптимизация на производството на биополимери.

Извънклетъчните бактериални липази са обещаващи биокатализатори за промишлеността, тъй като те са стабилни и активни ензими от лесно достъпни източници.

Д-р Радченкова участва в процеса на около 20-кратно пречистване на термостабилен ензим, продуциран от щам *Bacillus stearothermophilus* MC 7. Определено е молекулното тегло на ензима, условията за максимална активност, основни

кинетични параметри (K_m и V_{max}) и сродство към субстрати. На базата на тези изследвания, ензимът е класифициран като липаза, проявяваща и естеразна активност. Проучено е влиянието на нейонните повърхностноактивни вещества върху ензима. Най-висока активност (до 2,3-кратно увеличение) е измерена при въздействието на PEG6000. Препаратите от липаза запазват повече от 60% от активността си след 30-минутна инкубация при 75 ° C в присъствието на Tween 60 или PEG4000. Изследваната термостабилната липаза показва потенциал за синтез на структурни липиди, като диолеоилпалмитоилглицерол, използван при здравословни храни. Имобилизираният ензим показва добра оперативна термостабилност (полуживот 50 дни при 60 °C) и висока степен на конверсия (50% след 48 часа в система без разтворители. Подтисната е хидролизата, като страничната реакция в тези експерименти (Kambourova, M. et al, 2003; Guncheva, M. et al, 2007; Guncheva, M. et al, 2008 - Г).

Липаза от *Bacillus stearothermophilus* MC7 е била имобилизирана върху четири полимерни носителя чрез физическа адсорбция: хитозан, DEAE-целулоза, полипропилен и полиуретан. Чрез контролната реакция на ацидолиза на триолеин с каприлова киселина е доказано, че и четирите носители са подходящи за приложение. Най-високата степен на конверсия на първоначалния триолеин беше постигната в присъствието на препарат PP-MC7. Чрез реакция на селективно монозаместване в глицероловия скелет е постигнат синтез на целевия ди-заместен продукт (дикаприлоил-олеоилглицерол) (Guncheva M . et al, 2009).

В заключение може да се обобщи, че изследваната термостабилна липаза от щам *Bacillus stearothermophilus* MC 7 е една от най- стабилните от описаните в литературата и със значим биотехнологичен потенциал.

Като обобщение, подчертаните в този раздел научни приноси на д-р Н. Радченкова се отличават с оригиналност и значимост, а представените научни разработки изцяло съответстват на научната област и научно направление на настоящия конкурс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Научните и научно-приложни приноси на гл. ас. д-р Радченкова са обединени освен с търсената пряка връзка между фундаментални и приложни изследвания и с умелото прилагане и логично комбиниране на редица най-съвременни изследователски методологични подходи.

При експерименталната си дейност, д-р Радченкова използва богат арсенал от класически и съвременни аналитични, микробиологични, биотехнологични и молекулярно-генетични методи: генетична идентификация чрез изолиране на хромозомна ДНК и секвенционен анализ на 16S рРНК ген на ЕПЗ продуценти; класически методи за фенотипно характеризиране; TLC метод, GC-MS анализи, определяне на ¹H-NMR спектър, IR-спектроскопски методи; сканираща електронна микроскопия; хроматографски методи за пречистване, термогравиметрия и др.

Получените резултати разкриват възможности и перспектива за нови изследвания по актуални проблеми, насочени към потребностите на реалните биотехнологични производства.

Постиженията на д-р Надя Радченкова са публикувани в авторитетни научни списания и са намерили широк положителен отзвук в научната общност, намерили са отражение във финансирането на редица международни и национални научно-изследователски проекти, което ясно потвърждава значимостта на разработваните задачи и приложимостта на получените резултати.

Наукометричните данни на д-р Надя Стойчева Радченкова значително надвишават минималните национални и допълнителните изисквания на ЗРАС РБ, и съответния Правилник на ИМикБ за заемане на академичната длъжност „Доцент” в Професионалното направление 4.3 Биологически науки.

Всичко това ми дава основание да подкрепя кандидатката и убедено да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да оценят положително и да предложат на НС на ИМикБ да присъди на гл. ас. д-р Надя Стойчева Радченкова, академичната длъжност „Доцент”.

София, 11.08.2021 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:

(доц. д-р Златка Алексиева)