

С Т А Н О В И Щ Е

относно защита на дисертационен труд: „Молекулярно-биологични изследвания на нови бактериални гликозид-хидролази с промишлено приложение“ за присъждане на научната степен “Доктор на науките” по Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Кандидат: доц. д-р Пенка Петрова

Изготвил становището: доц. д-р Людмила Кабаиванова, ИМикБ „Стефан Ангелов“ - БАН

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси и научната дейност на дисертанта

Кандидатката Пенка Петрова е понастоящем доцент в Института по микробиология - БАН и Ръководител на департамент „Обща микробиология“. От 2020 г. тя е Директор на Института по микробиология „Стефан Ангелов“- БАН.

Научно-изследователската и дейност е в областта на микробиологията, биотехнологията, молекулярната биология, генно и клетъчно инженерство и биоинформатика. Научната и квалификация обхваща изолиране, таксономия и идентификация на бактерии, морфологични, биохимични, физиологични, генетични изследвания на микроорганизми, метагеномни изследвания на съобщества, секвениране на прокариотни геноми, както и изолиране на нови и разработване на рекомбинантни щамове-продуценти с целеви ензимни активности и прилагането им в биотехнологични процеси.

Научната дейност на доц. Петрова може да бъде оценена високо, базирайки се на високите и наукометрични показатели: Общ брой публикации - 65 (с общ IF 47.875); Глави от книги: 3; Цитати: 669; h-индекс: 12; Патент - 1 бр., от 2014 г. Значително е и участието и в проекти – 23, ръководител е на двама успешно защитили докторанти.

2. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем

Днес, човечеството все повече се нуждае от изследвания, свързани с взаимоотношенията между макро- и микро-организмите, а главна задача пред науката е получаването на знания, които да доведат до подобряване на качеството на живот, здраве и дълголетие чрез контрол над микробиома. Гликозид-хидролазите са ензимите, които

стоят в основата на катаболизма, а тяхното разнообразие определя степента на адаптивност на видовете към тяхното местообитание и обуславя множеството приложения на микроорганизмите. Гликозид-хидролазите са ензими с важно значение за хранителната промишленост, фармацевтиката и медицината. Нов фокус върху изследванията на гликозид-хидролазите през последното десетилетие дават иновативните тенденции в медицината, диетологията, екологията и валоризацията на отпадъците. Съвременното производство на хранителни продукти, в това число на хляб и тестени изделия, месо и колбаси, пиво, вино, получаването на разнообразна гама от млечни продукти, модификацията на хранителни протеини, избистрянето на сокове и преработката на плодове и зеленчуци изискват добавката на огромни количества ензими от семейството на гликозид-хидролазите. Настоящата дисертация разглежда богатия спектър от бактериални гликозид-хидролазни ензими, изучени с похватите на съвременните омикс-технологии. Най-обширни в нея са изследванията на ензимите, отговорни за разграждането или синтезата на пребиотичните въглехидрати (инулин, фруктоолигозахариди, галактоолигозахариди и нишесте) от млечнокисели бактерии. Ето защо темата на дисертацията е особено актуална.

3. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Дисертационният труд представя в завършен вид резултатите от задълбочени изследвания. Дисертационният труд съдържа разделите въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, заключение, изводи, приноси, списък на използваните литературни източници и списък на авторските публикации по темата дисертацията. Обемът му е 358 страници, включва 52 таблици и 140 фигури. Списъкът на цитираната литература наброява 625 източника.

Литературният обзор е много конкретен и целенасочен. Анализирани и обобщени са голям обем научна информация по темата.

Описаните изследвания в дисертационния труд са съсредоточени върху иновативни изследвания на биохимичните пътища и механизмите на пребиотичната микробна хидролиза. Изяснени са генетичните предпоставки, на които се основават взаимоотношенията между бактериалните видове и пребиотиците. Разкрити са нови биоинформатични данни, свързани с гените и ензимите, участващи в хидролизата на въглехидратите от млечно-кисели бактерии. Данните за хетероложната експресия и регулацията на генната активност при млечно-кисели бактерии разкриват сложни механизми, чието познаване открива нови възможности за индустриални приложения. Друго

успешно 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 имобилизиране, пренос, съхранение и освобождаване на биологично активни вещества и лекарствени средства. Важно за отбелязване е създаването на една от първите рекомбинантни циклодекстрин-глюканотрансферази. Един от разделите в дисертацията е посветен на първото в света изследване на ген *panH*, кодиращ ензим неураминидаза при нетоксигенен щам *Vibrio cholerae*. Тези резултати дават възможност за първото промишлено производство на сиалидаза от безвреден бактериален продуцент. В настоящата работа е изследван биохимичният и генетичен потенциал на нови бацилни продуценти на ензими, разграждащи целулоза и лигноцелулоза за получаване на ценни продукти от възобновяеми природни ресурси. В настоящата работа е описано изолирането и идентифицирането на десетки бактериални щамове продуценти на гликозид-хидролазни ензими, които са анализирани с подходите на геномиката, транскриптомиката, ензимологията и биоинформатиката. По-задълбочено е изследването на ензимите, продуцирани от две групи Грам-положителни бактерии: групата на млечнокиселите бактерии и тази на представителите на род *Bacillus*. Резултатите са задълбочено дискутирани и са изведени съответните изводи.

4. Основни научни и научно-приложни приноси

Дисертационният труд има приносен характер, като всички приноси са оригинални. Разделени са на научни и научно-приложни, като и двете групи намирам за значими.

Научни приноси

1. За първи път са идентифицирани гените, отговорни за хидролизата на α -глюкани при видовете *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus paracasei*. Изолирани са първите в света амилолитични представители на вида *Lactobacillus sakei* и рода *Enterococcus*.

2. За първи път са пречистени клетъчно-свързани фруктан- β -фруктозидази на *Lactobacillus paracasei*. Нуклеотидната последователност на кодиращите ги гени доказва, че ензимите са нови, с аминокиселинна замяна в съседство с каталитичната триада на активния център.

3. Идентифицирани са нов ген *sgt* и ензим циклодекстрин глюканотрансфераза при *Bacillus pseudocalophilus*, като хомологията на аминокиселинната секвенция с досега известните ензими е под 87%.

4. За първи път е извършена хетероложна експресия на β -глюкуронидаза в диплоидни щамове дрожди *Ogataea polymorpha*.

5. Секвениран е пълен геном на *Bacillus velezensis* 5RB, а анализът на гените разкрива възможностите на щама да конвертира лигноцелулозни субстрати в ценни продукти.

6. За първи път е доказана връзката между хидрофобността на клетъчната повърхност и устойчивостта към органични разтворители.

Научно-приложни приноси

1. Създаден е метод за бърз транскрипционен анализ на гени, отговорни за усвояването на нишесте от амилолитични млечнокисели бактерии.

2. За първи път рекомбинантен ензим циклодекстрин глюканотрансфераза е имобилизиран в магнитно-модифицирани носители с цел получаване на циклодекстрини. Повторната употреба на циклодекстрин глюканотрансферазен магнитен биокатализатор показват възможността за получаване на три до четири пъти по-голямо количество циклодекстрин за 120 мин в сравнение с добива на еднократно използваните ензимни препарати.

3. За първи път е осъществено детайлно молекулярно-биологично изследване на неураминидаза от нетоксигенен щам *Vibrio cholerae*. Секвенирането и характеризирането на гена panH и кодирания от него ензим дават възможност за разработване на безопасно производство на сиалидаза.

4. За първи път *in vivo* е доказан синтез на ензими, хидролизиращи целулоза и хемицелулоза при видовете *B. safensis*, *B. toyonensis* и *B. velezensis*.

5. Създаден е нов PCR-базиран метод за детекция на къси термошокови гени в *Streptococcus. thermophilus*, което дава възможност за бърза селекция на щамове за влагане в стартерни култури.

6. За първи път е демонстрирано съдържанието на пребиотичните въглехидрати галактоолигозахариди, индол-3-пропионова киселина и циклични антимикробни пептиди в българско кисело мляко. Визирайки всички приноси, се разкрива възможността за приложение на достигнатите научните постижения в практиката с реализиране на икономически ефект, и от там и тяхната социална значимост.

5. Описание и оценка на представените материали:

Публикациите, свързани с темата на дисертацията са 33. От тях, две са глави от книги, 18 са статии в списания с импакт фактор, една статия е в списание с SJR, а 4 публикации са доклади, публикувани в сборници от международни конференции. Публикациите по дисертацията са цитирани 268 пъти, което показва силното отражение на научните публикации на кандидата в световната литература.

Авторефератът се състои от 118 страници и добре и напълно отразява дисертационния труд.

Кандидатът удовлетворява и надхвърля многократно минималните национални изисквания по групи показатели за придобиване на научната степен.

6. Лични впечатления на рецензента за кандидата

Познавам доц. Петрова от съвместната ни работа в Института по Микробиология като утвърден учен и специалист. Дейностите на кандидатката в областта на съвременните молекулярно-биологични методи, които са в основата на генетичния анализ, идентификацията на микробни видове и гените, отговорни за специфичен микробен отговор и биосинтез, изучаването на тяхната експресия и регулация, приложение в молекулярната таксономия, включително за доказване на нови микробни видове са впечатляващи. Удовлетворена съм от обема на научните изследвания и получените резултати, тяхната стойност, умелото им представяне в дисертационния труд и задълбоченото им дискутиране.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на запознаването ми с представените дисертация, автореферат и научни трудове, след оценка на тяхната значимост, съдържащите се в тях научни и научноприложни приноси, намирам за основателно да заявя, че становището ми, относно придобиването на научната степен „Доктор на науките“ в Професионално направление: 4.3. Биологически науки от доц. д-р Пенка Петрова е положително. Представените резултати и постигнатите приноси, заедно с наукометричните данни, отговарят на законовите изисквания според ЗРАСРБ и на Правилника за прилагането му, както и на условията и реда за придобиване на научни звания и заемане на академични длъжности в БАН.

Дата 11.02.2020 г.

Изготвил становището:

/доц. д-р Людмила Кабаиванова/