

## СТАНОВИЩЕ

от проф. Пенка Ангелова Мончева, д-р, Софийски университет „Св. Кл. Охридски“, Биологически факултет

на дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № I-127/23.12.2019 г. на Директора на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при Българска академия на науките за получаване на научна степен „доктор науките“

в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика“, професионално направление 4.3. Биологически науки

**Автор на дисертационния труд:** доц. д-р Пенка Младенова Петрова

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

Представеният дисертационен труд е фокусиран върху молекулярно-биологични изследвания на гликозид-хидролазни ензими от бактериален произход. Могат да се диференцират три основни линии, по които тези изследвания са провеждани. Едната от тях, която е основната, обхваща изучаването на ензими, отговорни за разграждането или синтезата на пребиотични въглехидрати от млечнокисели бактерии, които имат голямо приложение в хранителната промишленост и медицината. Разработването на синбиотици заема важно място в системата за лечение и превенция на проблеми, свързани с гастроинтестиналния тракт при човека и отразява съвременните тенденции в медицината, диетологията и нутрициологията. Разработването на такива препарати изисква изолирането на щамове млечнокисели бактерии, притежаващи такива активности. Друга линия на изследванията, включени в тази дисертация е свързана с изолирането на ензими с циклодекстрин-трансферазна активност при представители от род *Bacillus*. Интересът към тези ензими се базира на широкото приложение на техните продукти – циклодекстрините, в различни отрасли на човешката дейност. Трета линия на изследванията са свързани с първото по рода си изследване на ген *nanH*, кодиращ неураминидаза при нетоксичен щам *Vibrio cholerae*, чрез които се разкриват възможности за първото промишлено производство на сиалидаза от безопасен продуцент. Дисертацията третира и въпроси, свързани с изучаване на биохимичния и генетичен потенциал на новоизолирани щамове на бактерии от род *Bacillus* за синтеза на ензими, разграждащи целулоза и лигноцелулоза за получаване на важни продукти от възобновяеми природни ресурси. Считаю, че изследванията в дисертацията са актуални в научно и приложно отношение.

Дисертационният труд е структуриран класически в седем раздела – Литературен обзор, предшестван от въведение, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Изводи, Приноси, Литературни източници. Към нея е включен списък с публикациите на автора, свързани с дисертационния труд. Считаю, че разделът „Литературен обзор“ е информативен, целенасочен, адекватен на третираните проблеми в дисертацията и представя автора като учен с висока теоретична компетентност в научната област на дисертационния труд. Литературният обзор е фокусиран върху разглеждането на четири основни въпроса: Структура, функция и приложение на гликаните; Ензими, имащи за субстрат гликани – класификация и обща характеристика; Бактерии-продуценти на гликозид-хидролазни ензими; Приложение на млечнокиселите бактерии в млечнокиселата ферментация на храни и напитки на зърнена основа; Изводи от литературния обзор. Цитирани са 625 литературни източници, 44% от които от последните десет години. Дисертационният труд има за цел молекулярно-биологично характеризирание на нови гликозид-хидролази и създаването на рекомбинантни ензими с подобрени свойства и приложение в индустрията и медицината. За реализиране на целта са поставени 4 основни задачи, като две от тях се състоят от няколко подзадачи. Считаю, че подзадачите са твърде обширно дефинирани и биха могли да се диференцират. При разработването на дисертационния труд са използвани разнообразни методи, които се отнасят към три категории – микробиологични, аналитико-биохимични и молекулярно биологични методи. Впечатляващ е огромният набор от методи, който включва както класически, така и най-съвременни аналитични и молекулярно-биологични методи. Този раздел демонстрира високото методично ниво, на което са изпълнени поставените задачи, което осигурява получаването на достоверни и възпроизводими резултати. Разделът „Резултатите и обсъждане“ съдържа получените резултати и тяхното обсъждане. Разделът е илюстриран със 109 фигури и 31 таблици. Представени са резултати от всички предварително поставени задачи. Изследванията по първата формулирана задача заемат основно място в дисертационния труд. Задачата е комплексна и в резултат на нейното изпълнение са представени резултати за идентификацията на новоизолирани щамове МКБ, продуценти на различни гликозид-хидролазни ензими. Идентифицирането на бактериите е извършено с богат набор от молекулярно-

биологични методи, позволяващи разграничаването на близкородствени видове, на подвидове, както и за установяване на шамови различия в рамките на вид. Идентифицирани до вид и подвид са 75 шاما МКБ с пръчковидна и 40 – с коковидна форма на клетките. Щамовете са характеризирани по ферментационен профил, начин на конверсия на лактоза с определяне на вида на метаболитите от нейното разграждане. Представени са резултати от изследване на ензимите, свързани с усвояването на нишесте при щамовете, проявили амилолитична активност като е направен транскрипционен анализ на усвояването по родове – за представители на род *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* и *Streptococcus* и при шамове на вида *Lactococcus lactis*. На базата на установената висока извънклетъчна амилазна активност на един шам на вида *L. paracasej*, subsp. *paracasei* - B41, е идентифициран и секвениран ген *amy41*, отговорен за амилазната активност на шاما, чиято секвенция е депозирана в базата данни на NCBI. С оглед установяване на условията за експресията на този ген е проучено влиянието на различни въглехидрати. Извършено е клониране и експресия на гена в шам *E. coli*. Проведени са изследвания на гликозид-хидролазни ензими при МКБ при субстрат инулин и фруктоолигозахариди. Постигнато е клониране и секвениране на гени, кодиращи фруктан- $\beta$ -фруктозидаза при *L. paracasei* B41, продукция и пречистване на  $\beta$ -фруктозидазни ензими от шамове на вида *L. paracasei*. Изследвани са биохимични свойства на клетъчносвързани  $\beta$ -фруктозидази при шамове на същия вид. Представени са резултати от изследвания на ензими от МКБ с  $\beta$ -галактозидазна активност, с оглед на тяхното приложение в реакции на транс-гликозиране на лактоза за синтезиране на галактолигозахариди, които са пробиотични олигозахариди. За седем шاما на вида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* е доказана способност да синтезират ГОЗ в мляко или лактозна среда, като при три от тях е установено най-голямо количеството на ГОЗ. Изследвани са пробиотични характеристики на 33 шاما от род *Lactobacillus* и на 24 шاما МКБ със сферична форма на клетките, при което се установява, че почти всички те имат антибактериално действие по отношение на три вида Грам-отрицателни бактерии, при изпитване на нативни супернатанти, дължащо се преди всичко на синтезираната млечна киселина и 10 шاما имат активност при изпитване на неутрализиранни супернатанти срещу три или по-малко тест-бактерии, което предполага синтезирането на други вещества с антибактериална активност. Освен това е изследвана протеолитичната активност на щамовете, както и синтезата на индол-3-пропионова киселина, триптофан и цитрулин и някои други метаболити с благотворен за човешкото здраве ефект. За няколко шاما, принадлежащи към различни видове е установена висока активност по отношение на синтезата на едно или друго от споменатите по-горе вещества. Освен пробиотични характеристики са изследвани и някои технологични характеристики на шамове МКБ с оглед на потенциално приложение, като биосинтеза на екзопилизахариди, синтеза на стресови протеини в условия на индустриален стрес, стрес към органични разтворители и по-специално към бутанол. Без да омаловажавам изследванията, свързани с изследване на пробиотични и технологични характеристики на МКБ, считам че те стоят малко извън основния фокус на дисертационния труд. Друга част от дисертационния труд обединява изследвания върху гликозид-хидролазни ензими при бактерии от род *Bacillus*. Представени са резултати за нови и рекомбинантни циклодекстринглюкантрансферази, под действието на които се получават циклодекстрини, които имат различни промишлени приложения. И тук се стартира с идентифициране на два шاما от род *Bacillus*, продуценти на ЦГТ, след което се представят данни за биохимични характеристики на ЦГТ от един от щамовете - *B. pseudocaliphilus* 8SB, като молекулна маса на пречистения ензим, температурен и рН оптимум и стабилност. Генът, кодиращ ЦГТ в шاما е секвениран, а секвенциите са депозираны в ген-банката на NCBI под съответния номер. Генът е клониран в *E. coli* DH5 $\alpha$  и е постигната хетероложна експресия, а рекомбинантният ензим е частично пречистен. Към тази част от дисертационния труд са включени и резултати с по-технологичен характер във връзка с перспектива за многократно използване на ензимите като биокатализатори, а именно имобилизирането им върху магнитно-модифицирани частици от различни наноносители. В тези експерименти са използвани ензимни препарати с различна степен на чистота. Най-голямо количество на циклодекстрини е получено при използването на пречистена рекомбинантна ЦГТ, имобилизирана върху промити алги. Новоизолирани и идентифицирани бактерии от род *Bacillus* са анализирани за гликозид-хидролазни ензими за разграждане на лигноцелулозни субстрати. Геномът на най-перспективния шам *Bacillus velezensis* 5RB е секвениран, а в него са открити гени за широк набор от ензими, свързани с въглехидратния метаболизъм, което разкрива потенциала на шاما за приложение. Третата основна част в на дисертацията представя резултатите от молекулярно-биологични изследвания на гликозидхидролазни ензими със субстрат сиалова киселина (неураминидази, сиалидази). В това изследване е получена неураминидаза от непатогенен шам на *Vibrio cholerae*, която е пречистена и характеризирана. Изолиран и секвениран е генът *nanH* на шاما-продуцент, като е извършено сравнение с гените на токсигенни шамове на вида. Пълната нуклеотидна секвенция на гена на българския шам е

депозирана в NCBI ген-банката. В дисертационния труд са включени молекулярни изследвания на  $\beta$ -глюкуро니다за от *E. coli*. Осъществена е хетероложна експресия на гена за ензима в дрожди *O. polymorpha*. Дисертацията завършва със Заключение, в което се прави оценка на постигнатото във връзка с бъдещо приложение на шамовете в различни сфери. Въз основа на получените резултати са направени 18 извода. Повечето от тях са формулирани добре и произтичат логично от получените резултати. Бих си позволила да отбележа, че извод 1 и 2 звучат по-скоро като обобщени резултати, отколкото като изводи. Дисертационният труд представлява принос в областта на молекулярнобиологичното характеризиране на гликозид-хидролази с бактериален произход, като една част от резултатите се съобщават за първи път, което придава оригиналност на изследването. Като най-важни бих открила научни приноси от 1 до 5 и от научно-приложните от 1 до 3 и 5.

Доц. Петрова има 33 научни труда, свързани с дисертационния труд, от които 2 глави в книги, 18 публикации в списания с импакт фактор, 1 – в списание с импакт ранг, 4 научни доклада от участия в международни научни форуми, отпечатани в пълен текст и 8 публикации в списания без импакт фактор/импакт ранг. Общият импакт фактор на тези трудове е 25.762 и са цитирани общо 281 пъти в различни бази данни. Наукометричните показатели на доц. Петрова са в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и тези на Института по микробиология към БАН за научната степен „доктор на науките“, като надхвърлят значително някои от тях.

#### **Заключение:**

Представената докторска дисертация обединява резултати от изследвания обхващащи период от 15-тина години, които са тематично свързани с изучаването на гликозид-хидролазни ензими от различни продуценти със съвременни молекулярно-генетични методи. Темата на дисертацията е актуална. Изследването е мащабно и е проведено на много високо методично ниво. Въпреки хетерогенността на изследванията по отношение на продуценти и синтезирани от тях ензими, доц. Петрова много умело ги е обединила, което е възможно благодарение на устойчивостта на нейната научна тематика, задълбочено разработвана през този немалък период от време. Дисертационният труд представя доц. Пенка Петрова като ерудиран учен в областта на микробиологията и молекулярната биология при изучаването на микробните гликозид-хидролазни ензими. Резултатите от тези изследвания са публикувани в 33 научни труда в авторитетни научни списания и са получили признание от научната общност чрез получените цитати. Трудът има приносен характер, съдържа оригиналност и иновативност.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академичния състав в Република България и този на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН считам, че представеният труд отговаря на изискванията за докторска дисертация, оценявам го положително и убедено препоръчвам на Научното жури да присъди научната степен „доктор на науките“ по професионално направление 4.3. Биологически науки на доц. д-р Пенка Младенова Петрова.

04.03.2020 г.

София

Подпис:

(проф. д-р Пенка Мончева)