

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационния труд на доц. д-р Пенка Младенова Петрова на тема „Молекулярно-биологични изследвания на нови бактериални гликозид-хидролази с промишлено приложение“ за присъждане на научната степен „Доктор на науките“, предложен за предварителна защита по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Микробиология“

**Рецензент:** проф. д-р Румяна Миронова – ИМБ „Акад. Румен Цанев“ - БАН

Хидролазите стоят в основата на катаболизма на живите организми. Макар че са една от най-добре изучените групи ензими като механизъм на действие, развитието на съвременните омикс-технологии дава възможност за разширяване на познанието ни за тяхната структура и генетично разнообразие. Гликозид-хидролазите, продуцирани от бактериите, са причина за широкия субстратен спектър на тези микроорганизми и отгук, за разпространението им във всички известни местообитания. Актуалността на изследванията е свързана с приложенията на щамове-продуценти и на самите ензими в различни клонове на хранително-вкусовата промишленост (при производството на хляб, месо и колбаси, пиво, вино, млечни продукти, модификация на хранителни протеини, избистряне на сокове и преработката на плодове и зеленчуци), както и при разработването на биотехнологии за получаване на метаболити от евтини и възобновяеми природни източници.

### ДАНИИ ЗА 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. Общият обем на дисертацията е 358 стр., а документалните материали включва 52 таблици и 140 фигури. Списъкът на цитираната литература обхваща 625 източника, от които само 3 на кирилица. Въпреки големия обем дисертацията се чете лесно благодарение на изключително добрия езиков и научен стил и пренебрежимо малкия брой печатни и правописни грешки.

### ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературният обзор е подробен, задълбочен и изчерпателен. Първата глава от него разглежда структурата и функциите на въглехидратите: моно-, ди-, полизахариди и сиалоглигани. Втората част от обзора е посветена на преглед на структурата и функциите на ензимите със субстрат въглехидрати – хидролази и трансферази, като по-подробно са разгледани класовете ензими, предмет на изследване в дисертационния труд: амилази, амилопулуланизи, ЦГТ-ази, фруктозидази, неураминидази и бактериалните гликозидази със субстрат целулоза и хемицелулоза. В обзора освен общата характеристика на ензимите са представени тяхната структура, кодиращите ги гени и биоинформатични данни за консервативните райони и каталитичния център на ензимите. Трета глава от литературния обзор описва бактериалните продуценти на гликозид-хидролазни ензими, молекулярните подходи за идентификация и типизиране

на бактериите и е направен преглед на главните таксономични групи, включени по-късно в изложението: млечнокиселите бактерии и род *Bacillus* като продуценти на ензими. Тъй като в дисертацията са търсени нови ензими с амилазна активност при млечнокиселите бактерии, последната част от литературния обзор е посветена на приложението на МКБ при ферментацията на храни и напитки на зърнена основа с претенции за функционалност и са обсъдени пробиотичните свойства на МКБ. Литературният обзор завършва с обобщение на съвременното състояние на проучванията и от него логично следва поставената цел – 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 набелязани четири основни задачи и шест подзадачи, които са ясно формулирани и адекватни на поставената цел.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Разделът включва три подраздела. В първия подраздел „Микробиологични методи“ са описани с необходимата подробност 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, кинетични константи, методики за пречистване на ензимни препарати и др. Молекулярно-биологичните методи описват процедурите за пречистване на нуклеинови киселини, методите за клониране и анализ на рекомбинантни клонове, секвениране и филогенетични анализи. За анализа и идентификацията на метаболити е прилагана високо-разделителна мас-спектрометрия в комбинация с течна хроматография. Използваните методи са съвременни и адекватни на планираните изследвания.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Близко век след откриването на *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* изследването на доц. Петрова е първото, което включва цялостно изследване на микрофлората на традиционни български храни. Като цяло тази глава описва изолирането на нови бактериални щамове-продуценти на гликозид-хидролази, принадлежащи към 14 различни ензимни семейства като два от изследваните ензими, освен хидролазна, проявяват и трансферазна активност. Получените резултати са докладвани и обсъдени в 5 отделни точки, в т. ч. кратко заключение.

**ПЪРВА ТОЧКА** от глава „Резултати и обсъждане“ е най-обемната и представя данни за гликозид-хидролазни ензими със субстрати  $\alpha$ -глюкани и  $\beta$ -фруктани, продуцирани от млечнокисели бактерии. Тя включва изолирането, идентификацията и изследването на метаболизма на въглехидрати в млечно-кисели бактерии (МКБ). Създадена е уникална колекция от 115 щамове, изолирани от 97 ферментирани млечни и зърнени продукти, събрани от над 40 района в цялата страна. Щамовете принадлежат към 18 вида МКБ като най-много (42) са представителите на типичния за страната ни *L. d. bulgaricus*. За видовата и подвидова идентификация на щамовете доц. Петрова е приложила разнообразие от молекулярно-генетични методи. За разграничаването на

единствения представител на *Lc. lactis* подвид *lactis* от подвид *cremoris* е приложен ARDRA-анализ. Резултатът е потвърден чрез независим метод – видово специфичен PCR на гена за глутаматдекарбоксилаза. По подобен начин за разграничаване на вида *L. paracasei* от *L. casei* са приложени ARDRA и друг независим метод – RAPD. За голямата част от щамовете обаче тези методи се оказват не достатъчно дискриминативни за видовото им определяне, поради което е секвениран генът за 16S рРНК. В частта, отнасяща се до идентификацията на щамовете, доц. Петрова отделя по-специално внимание на 12 от новоизолираните щамове *L. d. bulgaricus* като ги сравнява с изолати от киселите млека Домлян и „На баба“ на Данон. Тя прилага комбинация от три метода, RAPD, MLST и PFGE, за да демонстрира уникалността на тези 12 щама и тяхното различие от стартерните култури на едни от най-популярните кисели млека в търговската ни мрежа. Други по-интересни изводи от видовата характеристика на изолатите са: 1. Най-голямо разнообразие от МКБ се наблюдава в киселите млека от Родопите, които съдържат по няколко вида МКБ; 2. За първи път са изолирани видовете *L. paracasei* и *L. rhamnosus* като съпътстваща микрофлора в кисело малко и 3. Класическият „симбиотичен“ партньор на *L. d. bulgaricus* в българското кисело мляко *Str. thermophilus* днес е до голяма степен изместен от по-малко претенциозния, но не по-малко полезен *Pediococcus acidilactici*.

Обединяваща характеристика на всички МКБ е тяхната способност да образуват млечна киселина от глюкоза. Глюкозата обаче може да бъде краен продукт от разграждането на различни ди- три- и полизахариди и доц. Петрова изследва новоизолираните щамове за способността им да усвояват 15 различни въглеhidрати. Тя намира, че всички те усвояват лактоза, глюкоза и галактоза и почти всички - фруктоза и целобиоза, **наблюдение, което има потвърдителен характер**. При изследване на метаболитите от разграждането на лактоза е установено, че 25 от щамовете образуват триглицериди, което доказва проявата на рядката трансферазна активност на  $\beta$ -галактозидазата и натрупване на пребиотика галакто-олигозахарид. Понататък вниманието на доц. Петрова е фокусирано върху щамовете, които са способни да усвояват нишесте (амилолитични МКБ, аМКБ). Те са 37 от всички 115 и са представители основно на родовете *Lactobacillus*, *Pediococcus* и *Enterococcus*. Щамовете са изследвани за амилазна активност – вътреклетъчна, клетъчно-свързана и извънклетъчна като **получените данни за лактобацилите потвърждават наблюденията** на други автори. Доц. Петрова **изолира първите в света амилолитични представители на вида *L. sakei* и рода *Enterococcus***. Най-висока извънклетъчна амилазна активност е измерена за български шам *L. paracasei* B41, изолиран от боза „Бомакс“.

Съгласно японската база данни KEGG в геномите на аМКБ присъстват седем гена, кодиращи амилолитични ензими [ $(\alpha$ -амилаза (*amy1*), гликоген-фосфорилаза (*glgP*), (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -глюкан разклоняващ ензим (*glgB*),  $\alpha$ -глюкозидаза (*agl*), олиго-1,6-глюкозидаза (*malL*) и неопулуланаза (*dexC*)]. За да изследва експресията на тези гени в новоизолираните български аМКБ, доц. Петрова генерира специфични праймери, с които амплифицира 7-те гена и ги използва като ДНК-сонди за хибридизация на тотална РНК. В повечето случаи е намерена добра корелация между вида и силата на

експресия на гените, нивата на амилазна активност и нейната клетъчна компартиментализация. Намерено е, че всички щамове лактобацили експресират седемте анализирани гена с изключение на *L. sakei* 3/30, който експресира само 3 от тях. В тази връзка е отбелязано, че не само в този конкретен случай, но като цяло голяма част от гликозид-хидролазите при лактобацилите са все още неизучени, което подчертава актуалността и значението на дисертационния труд.

От аМКБ способни да усвояват нишесте по-специално внимание е отделено на единствения представител на лактококите *Lc. lactis ssp. lactis* B84. Доц. Петрова си поставя за цел да открие хромозомните детерминанти, отговорни за амилолитичните свойства на този щам. Интересното в случая е, че за създаване на праймери за PCR на 4 амилолитични гена [(цитоплазмена (*amyL*) и извънклетъчна (*amyY*)  $\alpha$ -амилази, амилопупуланаза (*apu*) и гликоген-фосфорилаза (*glgP*)] са използвани геномите на два щамове от подвидовете *lactis* и *cremoris*, които не проявяват амилазна активност. Впоследствие специално за подвида *lactis* е показано, че той наистина притежава 4-те анализирани гена, но експресира само един от тях (*apu*). Чрез PCR е доказано наличието на всички тези гени в генома на българския щам B84. Чрез обратна транскрипция (RT-PCR) е изследвана и експресията на 4-те гена при култивиране на щамове в среда с глюкоза или нишесте. Установена е транскрипция само на двата  $\alpha$ -амилазни гена при растеж само върху нишесте. От този резултат са направени два важни извода, а именно, че гликоген-фосфорилазата и амилопупуланазата нямат отношение към хидролизата на нишесте от *Lc. lactis* и че в присъствието на глюкоза  $\alpha$ -амилазните гени не се експресират поради явлението катаболитна репресия. Докато вторият извод има основно **потвърдителен характер**, то разкриването на генетичните основи на амилазната активност **допринася за разбирането на процеса на хидролиза на нишесте при лактококите**.

Специално внимание е отделено на щам *L. paracasei* B41, който е интересен с това, че измежду изследваните аМКБ проявява най-висока извънклетъчна амилазна активност. Доц. Петрова описва клонирането и хетероложната експресия на ген (*amy41*), кодиращ амилопупуланаза в изолирания от нея щам *L. paracasei* B41. Генът е секвениран и неговият биоинформатичен анализ разкрива присъствието на консенсусен *cre*-елемент в промоторната област, отговорен за явлението катаболитна репресия. Наличието на този елемент добре се съгласува с наблюдаваната липса на транскрипция на гена, когато щам B41 се култивира в среда с глюкоза. В следващи експерименти генът е клониран в подходящ вектор за индуцируема експресия под силния фагов T7-промотор и експесиран в *E. coli*. **Подчертано е, че в настоящата дисертация този вектор за първи път е използван успешно в качеството му на експресионен, а не само на клониращ вектор**. След оптимизиране на ферментационните условия е постигната максимална ензимна активност в културалната среда над три пъти по-висока от тази на изходния щам B41. Биоинформатичните анализи разкриват най-голямо подобие на гена *amy41* с транслирани протеини на други щамове *L. paracasei*, както и на такива от видовете *L. casei* и *L. rhamnosus* (до 99% идентичност). Интересното е, че въпреки високата хомология никой от тези щамове лактобацили не проявява амилолитични свойства.

Към направения по този повод коментар имам следната **Забележка: По-вероятно е не „мутации с положителен знак в гена на *amy41*” (стр. 187) да са довели до синтезата на активен ензим, а обратното, мутации в белтък-кодиращите последователности на останалите лактобацили да са „инактивирали“ ензимите.**

Първа точка от глава „Резултати и обсъждане“ разглежда още гликозид-хидролази със субстрат  $\beta$ -фруктани. В колекцията новоизолирани МКБ са открити 4, за които е установено че разграждат дълговерижен инулин. Интересът към тези щамове е продиктуван от факта, че инулинът е пребиотик, щамовете имат пробиотично действие, а механизмите за усвояване на инулин и фруктоолигозахариди (ФОЗ) не са докрай изяснени. Гените, кодиращи  $\beta$ -фруктозидазите на щамове *L. paracasei* B41 и LC1 са секвенирани и проведеният биоинформатичен анализ дава основание на доц. Петрова да причисли ензимите към клетъчно-свързаните  $\beta$ -фруктозидази, а от наличието на аминокиселинна замяна в активния им център да заключи, че те представляват **нови, неописани досега ензими. В литературата липсва информация за пречистени  $\beta$ -фруктозидази от *L. paracasei* и тази ниша е запълнена от доц. Петрова, която предприема тяхното пречистване.** Изолирането на клетъчно-свързани белтъци е проблемно, както и тяхната експресия в *E. coli*, поради което ензимите са пречистени от техните природни продуценти. Поради проблемното пречистване на белтъка, закотвен в клетъчната стена, доц. Петрова заключава, че е перспективно използването на цели клетки с инулиназна активност като „микробни фабрики“ за продукцията на метаболити от инулин. Изследвана е субстратната специфичност на двата ензима и е намерено, че инулиназата на щам B41 проявява еднакво висок афинитет към късоверижен ФОЗ и бактериален леван, по-слаб към инулин и изключително слаб към захароза. Инулиназата на другия щам LC1 е с най-висок афинитет към левана, следван от този към инулина и ФОЗ и не свързва захароза, **което потвърждава наблюденията на други изследователи за субстратната специфичност на  $\beta$ -фруктозидазни ензими от други видове лактобацили. Забележка: На стр. 206 по повод разликите в субстратната специфичност на двете инулинази е коментирано, че те се дължат на „разликите в секвенциите на кодиращите ги гени“.** По-точно е да се напише, че тези разлики да се дължат на разлики в аминокиселинните последователности на двата ензима и да се посочи какви са тези разлики. Двата щама продуценти на инулиназа проявяват и амилазна активност. Поради тази причина доц. Петрова изследва транскрипцията на гените за инулиназа и амилопулуланаза, когато щамовете растат в среда с инулин и нишесте. Тя стига до заключението, че двата гена се намират под общ контрол, най-вероятно осъществяван от *cis*-разположения в тях *cre*-елемент. Това се потвърждава от факта, че и двата гена не се експресират в присъствието на глюкоза в средата. **Получените резултати са първото съобщение за едновременна хидролиза на смесени субстрати от МКБ.**

Много рядко явление е способността на представили от род *Pediococcus* да ферментират пребиотици и до момента липсват данни за усвояването на ФОЗ или инулин от *P. acidilactici*. Поради тази причина доц. Петрова фокусира вниманието си върху изолирания от нея щам PD3 от този вид, който усвоява ФОЗ. Предприети са изследвания за идентифициране на гените и белтъците, участващи в усвояването на

ФОЗ. След създаването на геномна библиотека в *E. coli* и нейното скриниране са получени 2 клона с повишена способност да усвояват ФОЗ. Тяхното секвениране показва, че това не са гени за хидролазни ензими, а такива, отговорни за транспорта на захари, което хвърля светлина върху механизма на усвояване на ФОЗ от *P. acidilactici*. Важно е да се подчертае, че поради способността му да ферментира изцяло фруктозата този щам е перспективен за прилагането му като пробиотик в случаи на фруктозна малабсорбция, водеща до синдром на раздразненото черво.

Бета-галактозидазите са ензими, които разграждат млечната захар до глюкоза и галактоза. Интересът на доц. Петрова обаче е насочен към друга проявявана от тези ензими активност, а именно транс-гликозилазна, водеща до синтезата на галактоолигозахариди (ГОЗ) с ценни пробиотични свойства. Тя анализира крайните метаболити от действието на  $\beta$ -галактозидазите на 10 щамове *L. d. bulgaricus*, които образуват ГОЗ при култивиране в мляко и/или в лактозна среда. Синтезата на ГОЗ и тяхната структура са доказани чрез високо-разделителна мас-спектрометрия предшествана от течна хроматография. Анализиранияте проби са от кисело мляко след 48 ч. ферментация. Резултатът показва, че синтезираните от щам 43 ГОЗ са три- и тетразахариди, като последният галактозен остатък е свързан с молекула лактоза. **Отчетена е синтезата на пет пъти по-голямо количество ГОЗ от докладвани в литературата данни за ГОЗ в испански йогурт. Това е и първото съобщение за образуване на ГОЗ от щамове *L. d. bulgaricus*. За първи път е регистрирана и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) свързана галактозна единица в ГОЗ.**

В края на първа точка от глава „Резултати и обсъждане“ са разгледани някои пробиотични и технологични характеристики на МКБ. Тези характеристики са важни за практическото приложение на новооткритите от доц. Петрова МКБ, тъй като голяма част от тях притежават потенциал за внедряване в промишлеността. Тя изследва безклетъчни супернатанти от хранителна среда, в която са култивирани МКБ, за антимикробно действие и потвърждава факта, че българските щамове МКБ, изолирани от боза имат пробиотично действие, а щамовете МКБ от кисели млека показват впечатляваща активност срещу Грам-(-) патогени. Показано е още, че голяма част от лактобацилите и повечето млечнокисели коки секретират извънклетъчни протеази с висока протеолитична активност. Изследвана е синтезата на аминокиселини и циклични антимикробни пептиди от МКБ. **За първи път е показана синтезата на индол-3-пропионова киселина от МКБ, която е мощен невро-протектор, както и присъствието на две анти-микробни съединения в киселото мляко, циклофенилаланил-пролил и циклолевцил-пролил.** Продукцията на екзополисахариди (ЕПЗ) от МКБ е желано качество, тъй като придава по-висок вискозитет и по-плътна текстура на продуктите. Щамовете *L. d. bulgaricus* са оценени като много добри продуценти на ЕПЗ, а като най-добри – щамове от съпътстващата микрофлора (*L. fermentum/Leuc. mesenteroides*). Друга важна технологична характеристика е устойчивостта на щамовете в закваските към индустриален стрес. Като модел е използван *Str. thermophilus*, който при промишленото производство бива подлаган на термична обработка до 50°C-70°C. Като маркерни са използвани белтъците на топлинния шок (Hsp). Разработен е метод за бърза идентификация на

щамове, притежаващи гени за Hsp, който би позволил бърз скрининг на големи промишлени колекции. Чрез колониен PCR за наличие на *hsp*-гени са проверени 49 щама от вида. **Открити са 5 щама, които съдържат нови плазмиди с *hsp*-гени.** Единият от щамовете е изследван за преживяемост в условия на топлинен шок и е показана по-високата устойчивост на щама, съдържащ плазмид. Проведено е още проучване за устойчивост към стрес, причинен от органични разтворители и е **показано за първи път, че хидрофобността на клетъчната повърхност е обратно пропорционална на степента на преживяемост на бактериите в среда с бутанол.**

**ВТОРА ТОЧКА** от глава „Резултати и обсъждане“ се отнася до гликозид-хидролазни ензими, продуцирани от род *Bacillus*. Като представители на хидролазите, разграждащи  $\alpha$ -глюкани, са разгледани циклодекстрин-глюканотрасферазите (ЦГТ-ази). Както показва името на тези ензими, освен хидролазна, те притежават и трансгликозилазна активност, водеща до синтезата на циклодекстрини (ЦД) с множество промишлени приложения. Чрез секвениране на фрагмент от гена за 16S рРНК на два алкалофилни щама от род *Bacillus*, които секретират високи нива ЦГТ-аза, щамовете са отнесени към вид *B. pseudocaliphilus*. Ензимът на единия от щамовете (8SB), пречистен от културална среда, е с висока специфична активност, което го прави ценен продуцент предимно на  $\gamma$ -декстрин. Генът за ЦГТ-азата (*cgt*) на щам 8SB е секвениран и изведената аминокиселинна последователност на ензима е сравнена с тази на ЦГТ-ази от други видове *Bacillus*. Поради ниската степен на хомология е направено заключението, **че *cgt*-генът на щам 8SB кодира нов, неописан досега ензим.** Осъществена е секретирема експресия на гена в *E. coli* и след оптимизиране на ферментационните условия са постигнати над десетократно по-високи ензимни активности от първоначалните, като специално  $\beta$ -ЦГТ-азна активност е 1275 U/ml. **За първи път в литературата са описани такива високи стойности за този ензим, което прави селектираният клон *E. coli* перспективен за промишлена продукция на  $\beta$ -декстрин.** Рекомбинантният ензим е пречистен чрез комбинация от ултрафилтруване, адсорбция върху нишесте и гел-филтрация. Имобилизацията е подход, който позволява многократно използване на ензимите като биокатализатори и доц. Петрова предприема имобилизация на ензима върху различни носители, натоварени с ферофлуидни наночастици. Най-добри резултати за конверсията на нишесте в ЦД под действие на имобилизирания ензим са получени при използването на халоизид като наноносител, който има и това предимство, че ензимът попада във вътрешността на носителя. Проведени са още експерименти за многократно употреба на имобилизираната ЦГТ-аза в хода на 6 последователни 20-мин реакции като е демонстрирана възможността за 3 до 4 пъти по-високи добиви ЦД за 120 мин в сравнение с добива на еднократно използваните ензими. Най-добри резултати са получени с ензим, имобилизирана върху магнитно-модифицирани промити водорасли, като в крайния продукт не се съдържа  $\alpha$ -ЦД.

Като представители на гликозид-хидролазите, продуцирани от род *Bacillus*, са изследвани още ензими със субстрат  $\beta$ -глюкани и по-конкретно такива, разграждащи целулоза и хемицелулоза. Тази част от изследванията е обоснована с ключовото място на биотехнологиите в световната икономика, насочена към алтернативни суровинни

източници за производството на ценни продукти и горива. Триците и зародишите напр. са зърнени отпадъци в мелничарската индустрия, които са богат и възобновяем източник на полизахариди, подходящи за производството на ферментативни продукти. Изследванията на доц. Петрова са фокусирани по-конкретно върху способността на щамове от род *Bacillus* да разграждат лигноцелулозен субстрат. За тази цел тя създава колекция от 57 щамове, принадлежащи към 11 вида от рода. Определянето до вид е извършено чрез секвениране на гена за 16S р РНК, а в случаите, когато този подход се оказва недискриминативен – чрез методите на полифазната таксономия. Единият от щамове е определен до вид като *B. velesensis* само след пълно геномно секвениране. **Някои от идентифицираните видове бацили са новооткрити за страната ни като например *B. safensis***, който досега е бил изолиран единствено от космическия кораб Одисей и от пустиня в Гуджарат, а у нас е открит в Софийската пречиствателна станция. Щамове са изследвани за способността им да секретират 12 различни хидролазни активности. За 15 от щамове е показано, че проявяват целулазна активност. Установени са и щамове, които разграждат хемицелулозни субстрати. След секвениране в генома на *B. velesensis* 5RB са открити 9 гена за ензими, хидролизиращи и модифициращи целулоза и 8 гена за ензими, свързани с конверсията на хемицелулоза. Подобни гени са открити и в други щамове *B. velesensis* като резултатите имат **потвърдителен характер. Биоинформатичният анализ на генома показва още наличието на пълен набор гени от метаболитния път за синтеза на бутандиол и е първото съобщение за наличието на такъв метаболитен път във вида *B. velesensis***. Открити са още 7 оперона за продукция на антибиотици и доц. Петрова акцентира, че това би позволило промишлено приложение на щамове за провеждане на ферментации в нестерилни условия.

**ТРЕТА ТОЧКА** на глава „Резултати и обсъждане“ представя изследвания на гликозид-хидролазни ензими (сиалидази или неураминидази) със субстрат сиалова киселина. Тези ензими са добре известен фактор на вирулентността на някои вируси и патогенни бактерии и намират широко приложение в биохимичните и медицински изследвания. Промисленото изолиране на ензима от патогенни микроорганизми обаче крие определен здравен риск за участниците в производството. Доц. Петрова вижда единствена алтернатива в използването на непатогенни щамове, но до началото на нейното изследване липсва информация за неураминидаза от непатогенен източник. Тя използва като такъв български изолат на *Vibrio cholerae* (non-O1/13) с интактен ген за неураминидаза (*nanH*) и пречиства ензима от културална среда. Полученият препарат е обогатен около 500 пъти на ензимна активност. Освен това генът за неураминидазата е секвениран и в изведената аминокиселинна последователност на ензима са открити всички необходими за ензимното действие аминокиселинни остатъци. **В тази част от дисертацията доц. Петрова докладва резултати от първото в света молекулярно-биологично проучване на неураминидаза от непатогенен *Vibrio cholerae*.**

**ЧЕТВЪРТА ТОЧКА** на глава „Резултати и обсъждане“ докладва резултати, свързани с използването на гликозид-хидролазния ензим  $\beta$ -глюкуронидаза като моделен за оптимизиране на хетероложната генна експресия в метилотрофни дрожди от вида *Ogataea polymorpha*, предпочитан гостоприемник за производството на различни рекомбиантни белтъци в индустриален мащаб. До момента за тази цел се



използват хаплоидни щамове на вида и се избягват диплоидните. Според доц. Петрова това се дължи на погрешното схващане, че диплоидната фаза на този вид е много кратка и нестабилна. Ето защо тя си поставя за цел да изследва влияенето на пloidността на дрождите върху експресията на кодирана от *E. coli*  $\beta$ -глюкуронидаза. За целта като гостоприемници са използвани различни акусотрофни мутанти на типов щам *O. polymorpha*. В изследванията доц. Петрова използва плазмид с клониран ген за  $\beta$ -глюкуронидазата, предоставен ѝ от други изследователи. След трансформиране на плазмидата в дрожди тя селектира трансформант с повишена  $\beta$ -глюкуронидазна активност, който кръстосва с друг хаплоиден щам за получаването на диплоид. Анализът на мейотичните сегреганти на този диплоид показва стабилна интеграция на бактериалния ген в дрожения геном. Четири от мейотичните сегреганти с високи ензимни активности са кръстосани помежду си във всички възможни комбинации и от потомството са отбрани три хибридни диплоидни щама. **Намерено е, че диплоидите показват до десетократно по-високи ензимни активности, което показва, че подходът за създаване на диплоидни дрождени щамове е обещаващ за повишаване ефективността на хетероложната генна експресия.**

В глава V и VI на дисертацията доц. Петрова е формулирала съответно 18 извода и 12 научни и научно приложни-приноса, върху които аз акцентирах по време на анализа на глава „Резултати и обсъждане“. Тук ще отбележа само, че изводите имат солидна експериментална основа, а приносите са прецизно формулирани. Авторефератът отговаря на изискванията и в компактна форма от 188 стр. отразява основното съдържание на дисертацията.

## НАУКОМЕТРИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ

Броят на авторските публикации в пълен текст по дисертацията е 33. От тях две са глави от книги, реферирани в Scopus, 18 публикации са в списания с IF, 1 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 от публикациите доц. Петрова е първи автор, а в 21 – кореспондиращ. Статиите, свързани с дисертацията са с общ IF 25.762 и са цитирани общо 281 пъти. По показател Г (публикации извън хабилитационния 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 събира **1300 т.**, с което надхвърля близо 4 пъти минималните национални изисквания. Съгласно допълнителните критерии за израстване на академичния състав в ИМикБ, за научната степен „Доктор на науките“ се изискват минимум **150** цитата. Както вече посочих само статиите по темата на дисертацията са цитирани 281 пъти , а съгласно справка на доц. Петрова и в други бази данни те са общо **693**. Общият IF на доц. Петрова за цялата и научна кариера е **47.875** при изискван минимум от правилника на ИМикБ - **25**.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Доц. Петрова ни представя едно монолитно, мащабно и задълбочено изследване, проведено с най-съвременни микробиологични и молекулярно-генетични методи. Получени са голям брой резултати с оригинален характер, значими от научна и практическа гледна точка. По-голямата част от изследванията са публикувани в реферирани и реномирани международни издания с IF и са намерили широк отзвук сред научната общност, което е видно от броя цитати, над 200, на статиите по темата на дисертацията. Наукометричните показатели на доц. Петрова надхвърлят 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. Всичко това ми дава основание убедено да дам своя положителен вот присъждане на научната степен „Доктор на науките“ на доц. Пенка Младенова Петрова по професионално направление 4.3. Биологически науки, специалност „Микробиология“.

28.02.2020 г.

гр. София

Рецензент:

/проф. Р. Миронова/