

РЕЦЕНЗИЯ

НА ДИСЕРТАЦИЯ НА ТЕМА:

„КАТАЛАЗА ОТ АНТАРКТИЧЕСКИ ГЪБИ: РОЛЯ В АНТИОКСИДАНТНАТА ЗАЩИТА, РЕГУЛАЦИЯ И СВОЙСТВА“

Професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология)

Автор: Владислава Георгиева Дишлийска

Научен ръководител: доц. д-р Екатерина Крумова

Рецензент: доц. д-р Златка Алексиева

Докторант Владислава Дишлийска придобива степен „Магистър“ в Биологически факултет – СУ „Св. Климент Охридски“ през 2001 г. по специалност „Биотехнологични процеси“, със специализация „Индустриални биотехнологии“. Тя постъпва на работа в Институт по микробиология – БАН през 2005 г., в края на 2007 г. е назначена като асистент в секция „Микология“, където работи и до днес. За докторант на свободна подготовка е зачислена на 27.04.2022 г.

Тема на настоящия проект на дисертационен труд е проучването на ролята на ензими с каталазна активност в щамове филаментозни гъби, принадлежащи към различни температурни класове в морфологичните, метаболитни и генетични механизми на адаптация при нискотемпературен стрес.

Представеният дисертационен труд е структуриран според установената практика, в рамките на 117 стандартни страници, от които цитираната литература заема 27 страници и включва 306 цитата. Представената разработка е много добре илюстрирана с 12 таблици и 30 фигури.

Микроорганизмите обитаващи райони с екстремни климатични условия са в центъра на вниманието на световната наука. Все повече нараства интересът и базата данни за живота и биоразнообразието в Антарктида, който е един от най-добре запазените и чисти райони на планетата, но с много сурови условия на живот. Способността на антарктическите микроорганизми да съществуват в някои от най-суровите климатични условия, познати на земята, е причина за увеличаване интереса към техния метаболизъм. Проучването и характеризирането на видовото разнообразие в този регион, както и на метаболитните им способности могат да осигурят нови знания и решения за индустрията и опазването на околната среда.

Фунгите са сред най-разпространените в тези райони микроорганизми, поради богатия си ензимен апарат, който им позволява висока адаптивност в условията на липса на стандартни хранителни вещества, ниски температури, засушаване и др.

Едни от най-интересните и актуални проучвания в този контекст са свързани с механизмите на антиоксидантна защита. Тези механизми са все още слабо и недостатъчно проучени при филаментозни гъби, особено в условия на ниски температури, близки до отрицателните.

Оксидативният стрес се причинява от дисбаланс между производството и натрупването на т. нар. свободни кислородни радикали (ROS) в клетките и тъканите на аеробните организми и способността на съответната биологична система да детоксикира тези реактивни продукти. Известно е, че ROS обикновено се генерират като странични продукти от метаболизма на кислорода и играят важна физиологична роля. Освен отдавна доказаните фактори на околната среда, предизвикващи значително увеличаване на производството на ROS, доказано е, че ниските температури също предизвикват появата на повече свободни кислородни радикали, увредени белтъчни молекули, резервни въглехидрати, окислени липиди, увредени нуклеинови киселини, в следствие поява на оксидативен стрес.

За да се предпазят от ROS-индуцирано клетъчно увреждане, клетките разполагат с антиоксидантна защитна система, базирана главно на ензими, като супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GPx). Едни от важните индикатори за наличието на оксидативен стрес е повишаването на активността на тези ензими, както и натрупването на резервни въглехидрати трехалоза и гликоген.

Литературният обзор съдържа както исторически преглед, така и нова и интересна информация, свързана с разглежданата тема. Показва отлично познаване на научните постижения и разработки в областта на темата на дисертацията. Много ясно са описани компонентите и механизмите на антиоксидантна защита. Централно внимание е отделено на характеристиките и жизненоважната роля на известните групи каталазни ензими. Фокус е поставен върху особеностите на температурно-чувствителните каталази. Важно място е отделено и на филаментозните гъби, открити на Антарктида.

Формулираните в края на обзора нерешени проблеми свързани с темата на разработваната дисертация, насочват към желанието на автора да допринесе към решението им.

Целта отразява ясно същността на дисертационната разработка. За изпълнението и са дефинирани 7 основни изследователски задачи, третата от които има три подточки. Добре е очертан конкретният ход на изследванията.

В глава „Материали и методи“ са подробно описани използваните в научното изследване класически и най-съвременни подходи за анализ, обхващащи култивационни методи, електронно-микроскопски (ТЕМ и СЕМ), спектрофотометричен анализ при определяне на специфична ензимна активност на антиоксидантни ензими и определяне на продукцията на H_2O_2 , изолиране на ДНК и РНК, Полимеразна верижна реакция (PCR), количествена РТ PCR амплификация, ДНК секвенционен анализ и биоинформатичен анализ на секвенираните олигонуклеотиди, пречистване на температурно чувствителна каталаза и др.

В началните части на глава „Резултати и обсъждане“ са представени данни, получени в резултат на т.нар. „рутинна“ микробиологична работа, която обаче изисква много опит, усилия и търпение. В резултат на проведените изследвания за влиянието на различни температури върху растежа и развитието на 61 щамове антарктически филаментозни гъби е определена принадлежността им към различни термални класове. Чрез ензимни проучвания е определена способността на всеки от изследваните щамове да синтезира вътреклетъчна и/или извънклетъчна каталаза. Определена е и съответната ензимна активност. Представени са данните за 31 от проучените щамове.

В резултат на сравнителен анализ на резултатите от тези проучвания, за следващи изследвания, са избрани два моделни щамове, принадлежащи към различни температурни класове - психротолерантния *Penicillium griseofulvum* P29 и мезофилния *Penicillium chrysogenum* P27.

На този етап, са изследвани промените в растежа, развитието и спорулирането им, нивата на генерирани СОР, на оксидативно увредените белтъчни молекули, на резервните въглехидрати, както и степента на мембранныя интегритет под въздействието на ниски температури. Установена е и активността на СОД и КАТ ензимите от антиоксидантната защита на двата щамове. Резултатите доказват, че натрупването на СОР е по-високо при щам *P. chrysogenum* P27. Щам *P. griseofulvum* P29 показва по-ниска степен на оксидативното увреждане на белтъци и липиди.

Разлика между двата щамове се наблюдава и по отношение активирането на изследваните ензими. Резултатите очертават по-силно изразено повишаване на СОД за мезофилния щам, докато активирането на антиоксидантната ензимна защита при психротолерантния се дължи в по-голяма степен на повишената КАТ активност.

На базата на всички тези резултати, докторант Владислава Дишлийска стига до извода, че щам *P. griseofulvum* P29 е не само по - добър продуцент на ензима каталаза, но е потенциален продуцент на термочувствителни ензими. Следващите задълбочени проучвания са фокусирани върху него.

От изключителен интерес са резултатите, получени чрез проведените електронно микроскопски анализи (Сканираща електронна микроскопия и Трансмисионна електронна микроскопия). Проследени са ултраструктурните промени в клетките на щам *P. griseofulvum* P29 при прилагане на 6 часа стрес при 15°C и при 6°C. И при двете температури се наблюдават алтерации в различните клетъчни органели. Наблюдава се нарушена плътност на клетъчната стена, локализация на ейзозомоподобните структури, промени в повърхността и размера на хифите и др. Обемът на дегенеративни нарушения е много по-изразен при по-ниската температура.

Уникална информация за генетичния потенциал, на щам *P. griseofulvum* P29, като продуцент на каталаза, дават следващите молекулярни анализи за идентифициране и секвениране на гените, кодиращи белтъци с каталазна активност при моделния щам. Филогенетичните анализи на фунгални каталази показват, че броят на ензимите варира при всеки вид. Сравнителният анализ на полученият пълен геномен сиквенс на щам *P. griseofulvum* P29 е показал възможното наличие на 5 различни каталазни гени, които са идентифицирани, секвенирани и характеризирани по отношение на функционалността на кодираните от тях протеини. Проследяването на експресията на тези гени в условията на два температурни режима (10°C и 25°C), с помощта на RT-qPCR е доказано повишаването и при по-ниската температура. Най-силно е повишението на експресията на ген *cat1*, кодиращ ензима каталазо-пероксидаза, което предполага важната му роля в адаптационните процеси и оцеляването на клетките в условията на нискотемпературен оксидативен стрес.

Следващите експерименти са насочени към създаване на условия за максимална експресия и продукция на температурно чмувствителна каталаза. Установени са оптималните стойности на глюкозата, като въглероден източник, концентрация на инокулома, температурата, продължителността на култивиране. Установено е, че най-голяма въздействие има процента на разтворен кислород в средата. С увеличаване нивото на РК до 40%, ензимната активност се повишава до максималната – 77.5 Е/мг, постигната след 84-96 часа култивиране. Това е важен етап в разработката, тъй като такива проучвания, особено за влияние на РК, практически не са представени в научната литература. Информацията за синтеза и свойствата на СА КАТ са много

оскъдни. Има известни проучвания при някои видове бактерии, а при гъби проучванията практически отсъстват. В заключение на изследванията може да се твърди, че антарктическият щам *P. griseofulvum* P29 е оригинален ефективен фунгален продуцент на СА КАТ. Демонстрирана е способността на щам *P. griseofulvum* P29 в биореактор при висок работен обем. Щамът синтезира вътре- и извънклетъчна каталази в съотношение 8:1.

Последващото прилагане на ефективен протокол за пречистване на КАТ води до повишаване на специфичната активност до 12 пъти до 538 Е/мг б, като добивът намалява около 11 пъти. С пречистения каталазен ензим са проведени изследвания за определяне на условията (температура, рН) за оптимална активност и стабилност на полученият ензимен препарат. Получените резултати имат важно значение, както за продължаване на фундаменталните изследвания с температурно чувствителни фунгални каталази, така и за развитие на различни индустриални процеси, като неутрализиране на остатъчните избелващи химикали в текстилната промишленост, за повишаване качеството на хранителни продукти и опаковъчни материали, чрез отстраняване на H_2O_2 , като потенциална съставка на фармакологични формули и др.

В резултат на получените данни, Владислава Дишлийска формулира 9 изводи и 4 приноси, адекватно отразяващи получените при разработката на дисертационния труд резултати. Поставените задачи са изцяло изпълнени. Тук е мястото да се подчертае компетентността на научния ръководител, доц. Крумова, както и на целия колектив на департамент „Микология“, които от години успешно работят по теми, тясно свързани с механизмите на оксидативния стрес.

Към представената за защита разработка нямам забележки, тъй като направените на вътрешната защита препоръки са отразени в представения за рецензиране вариант.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проучванията относно температурно чувствителните каталази са от изключително значение за изясняване на метаболизма на психрофилни и психротолерантни микроорганизми. Тъй като фунгите са еукариоти, получените на тяхна база изводи, могат да бъдат от общобиологично значение.

Поставените проблеми в представената разработка са оригинални, актуални и значими, основно за областта на фундаменталните изследвания, но също така и с

отношение към съответни научно-приложни разработки. Формулираните изводи и приносите са добре аргументирани, с оригинален характер и научна значимост.

За времето на разработка на настоящия дисертационен труд Владислава Дишлийска е набрала 272 кредита, което е значително по-висок резултат от изисквания минимум. Част от резултатите, включени в докторската разработка са публикувани в 2 статии в престижни международни издания, с общ ИФ – 5.532. По темата на дисертацията са изнесени два доклада на 2 научни форума.

Докторант Владислава Дишлийска е използвала богат арсенал от класически и съвременни аналитични, биохимични, микробиологични и молекулярно-генетични методи, което я е изградило като високо квалифициран, методологично подготвен специалист.

Представената дисертация на тема „Каталаза от антарктически гъби: роля в антиоксидантната защита, регулация и свойства“, напълно съответства по обем и значимост на експерименталната дейност и получени резултати на научните и законови изисквания в България. Оценката ми за представеният дисертационен труд е изцяло положителна и ми дава пълно основание да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват за присъждане на докторант Владислава Дишлийска на научната степен „Доктор“ в областта на Професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология).

24.09.2024 г.

Изготвил рецензията:

/доц. д-р Златка Алексиева/