

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Георги Тодоров Добрев
Университет по хранителни технологии, гр. Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
в област на висше образование **4. Природни науки, математика и информатика,**
професионално направление **4.3. Биологически науки,**
докторска програма по „Микробиология“

Автор: Йордан Методиев Стефанов

Тема: „Екзоензими, продуцирани от щамове на род *Bacillus* – микробиологични, молекулярно-генетични и биотехнологични аспекти“

Научен ръководител: доц. д-р Соня Костадинова, ПУ „Паисий Хилендарски“

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № РЗЗ-6903 от 13.12.2019 г. на Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ съм определен за член на научното жури по процедурата за защита на дисертационен труд на тема „**Екзоензими, продуцирани от щамове на род *Bacillus* – микробиологични, молекулярно-генетични и биотехнологични аспекти**“ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ от **Йордан Методиев Стефанов** – докторант в редовна форма на обучение към катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“ с научен ръководител доц. д-р Соня Костадинова.

Представеният от докторанта комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва всички изискуеми документи.

2. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Получаването и биохимичната характеристика на ензими е интензивно развиваща се област на биотехнологиите, поради широкото използване на биокатализаторите в различни отрасли на промишлеността. Предвижда се през 2020 г. пазарният дял на промишлено получаваните ензими да достигне около \$ 6.2 млрд. в световен мащаб. Постоянно увеличаващото се търсене на ензими се определя в най-голяма степен от разширяване на областите на тяхното приложение. Използването на ензими дава възможност за разработване на по-ефективни екотехнологии, усвояване на отпадни индустриални продукти, намаляване на емисиите от въглероден диоксид и използването на вредни за околната среда химикали, както и за създаване на нови суровинни, материали и източници на енергия.

Постоянно се увеличава и пазарния дял на ензимите намиращи приложение в медицината, фармацията, органичния синтез и аналитичните методи.

Дълбочинното и повърхностното култивиране на бактерии и плесенни гъби е най-разпространеният метод за промишлено получаване на ензими.

Водещите производители предлагат не само ензими, а готови технологични решения, което е възможно само при задълбочено познаване на специфичните характеристики на предлаганите ензими. Ето защо сериозен изследователски интерес е насочен към изолиране и систематизирано изучаване на ензими, което е определящо за тяхното правилно и рационално приложение.

Рецензираният дисертационен труд е насочен към изследване на биосинтеза на извънклетъчни ензими от щамове на р. *Bacillus*, изолиране и характеристика на продуцираните ензими.

Хипотезата, която е в основата на дисертационния труд е, че микроорганизмите от р. *Bacillus* продуцират голям набор извънклетъчни ензими с потенциал за приложение в различни области.

За да докаже изградената хипотеза, докторантът формулира 5 научноизследователски задачи, които съответстват на целта. Те са насочени към първоначален скрининг на щамове от р. *Bacillus* продуциращи извънклетъчни ензими, оптимизиране на състава на хранителната среда и условията за тяхното култивиране с цел получаване на висока ензимна активност, пречистване и характеристика на продуцираните ензими и молекулярно-биологични изследвания на гените кодиращи тяхната биосинтеза.

3. Познаване на проблема

В раздел литературен обзор от дисертационния труд, докторантът се е опитал да обобщи наличната информация за продуцираните извънклетъчни ензими от щамове на р. *Bacillus*. Това е една доста обширна задача, защото щамове от р. *Bacillus* са известни продуценти на множество ензими.

Техническите ензими заемат около 75% от световния пазар и в голямата си част се синтезират от щамове на р. *Bacillus*. Повечето протеинази и амилази намиращи приложение при производството на детергенти се получават от щамове на р. *Bacillus*. Използването на амилази от р. *Bacillus* в текстилната промишленост е първото индустриално приложение на техническите ензими. Ето защо и основните усилия при анализа на известната литература са насочени към обобщаване на информацията за амилази, протеинази и фосфолипази синтезирани от щамове на р. *Bacillus*.

Литературният обзор продължава с представяне на задълбочена информация за биосинтеза, изолирането и пречистване на бактериални фосфолипази С. Представени са известните и приложени до момента схеми за изолиране и пречистване на фосфолипази. Обобщена е информацията за специфичните характеристики на изолираните до момента бактериални фосфолипази С.

Освен за фосфолипазите докторантът е представил детайлна информация и за амилазите като ензими продуцирани от бактерии от р. *Bacillus*. Основно място е заела информацията за класификацията и механизма на действие на ензимите от амилазния комплекс.

Последната група ензими, която представлява интерес за докторанта това са протеиназите. Представената информация се отнася до тяхната класификация и механизъм на действие.

Заключителната част от литературния обзор е посветена на приложението на ензимите в различни отрасли от промишлеността. Потенциалните възможности за приложение на ензимите са важен аргумент за подчертаване на необходимостта за провеждане на научни изследвания насочени към селекция на нови щамове продуценти на ензими, изолиране и характеристика на нови ензими с цел изучаване на механизма на тяхното каталитично действие и разкриване на нови области за тяхното приложение.

От направения литературен обзор става ясно, че щамове от р. *Bacillus* са потенциални продуценти на ензими намиращи широко приложение в различни отрасли от промишлеността. Бактериите от р. *Bacillus* са подходящи за реализиране на биотехнологични процеси за получаване на ензими поради бързия темп на растеж и способността им да продуцират извънклетъчни ензими. Направеното заключение е позволило да се формулира целта на дисертационния труд – Изследване на продукцията на екстрацелуларни ензими от видове на р. *Bacillus*.

4. Методика на изследването

При разработването на дисертационния труд, докторантът е използвал голям брой микробиологични, химични, ензимни и инструментални методи за анализ. Трябва да се отбележи овладяването на съвременни молекулярно-генетични методи и свързаните биоинформационни софтуерни продукти. Овладял е разнообразни методи за определяне на ензимна активност и електрофоретични методи. Докторантът е придобил нужните практически опит и знания за провеждане на научни изследвания на съвременно ниво. Използваните методи и постановката на експериментите съответстват на поставените цел и задачи в дисертационния труд.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 149 страници. Съдържанието е правилно структурирано в следните раздели: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (41 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (16 стр.), Резултати и дискусия (62 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (1 стр.), Литература (20 стр.).

Извършена е целенасочена експериментална работа, която е отразена коректно. Опитните резултати са онагледени с 9 таблици и 45 фигури и са аргументирано дискутирани и критично сравнени с резултатите от достъпната литература.

Получените опитни резултати са обобщени в 4 основни направления.

Първо направление „Скрининг на щамове *Bacillus* за продукция на екзоензими”. Изследвани са 166 щама от р. *Bacillus*. Проведен е скрининг спрямо биосинтеза на фосфолипаза С, протеази, амилази, липази и целулази.

От получените резултати става ясно, че около 80 % от изследваните щамове секретират извънклетъчни фосфолипаза С и протеази, около 30% от щамове биосинтезират амилази и липази и само 4% биосинтезират целулази. След статистически анализ, докторантът установява положителна корелация между фосфолипазната и протеазна активност.

По-нататъшната работа е насочена към изследване на биосинтеза на амилази, протеинази и фосфолипази С при дълбочинно култивиране на селектираните продуценти.

Второ направление „Амилολитични ензими“: Най-висока амилолитична активност 3.14 U/ml проявява *Bacillus cereus* №10 на 36^{-я} час от култивирането. Установено е, че внасянето в хранителната среда на 0.1 % рибоза и глюкоза значително повишава амилазната активност в културалната среда. Най-висока активност (57% увеличение спрямо контролата) се наблюдава при 0.1% рибоза. По-високите концентрации на рибоза значително понижават активността, като при концентрация 1.0% относителната активност спрямо контролата е едва около 30%. Получените резултати потвърждават факта, че лесноусвоимите нискомолекулни монозахариди оказват катаболитна репресия върху биосинтеза на амилази. Замяната на пептон с дрождев екстракт увеличава активността с около 20 %.

При изследване на влиянието на металните йони е установено, че 1 mM CaCl₂ в хранителната среда повишава амилазната активност с 30%. В резултат на направената оптимизация е постигната 4.29 U/ml амилазна активност.

Трето направление „Протеолитични ензими“: Установено е, че при дълбочинното култивиране на селектирания *Bacillus thuringiensis* №14 е постигната най-висока протеазна активност 9.2 U/ml. Пикът на ензимна активност се установява на 16^{-я} час от култивирането.

Според докторанта използваният 0.5 % CaCO₃ не буферира културалната средата, но от фиг. 13 се вижда, че в процеса на култивиране рН се запазва постоянно в сравнително тесни граници около рН 7-8. При култивирането в 50 mM фосфатен буфер се постига 2.2 пъти повишаване на протеазната активност в културалната среда. В направената дискусия се оформя мнението, че това се дължи на по-добрите буферизиращи свойства на фосфатния буфер. Не трябва да се подминава фактът, че в посочената основна среда за биосинтеза на протеолитични ензими не се съдържа източник на фосфор. При използването на фосфатен буфер се внася допълнително фосфор в състава на хранителната среда, а е известно, че концентрацията му оказва значителен ефект върху биосинтеза на ензими.

Замяната на глюкозата с други монозахариди значително понижава протеазната активност. Внасянето на Mg²⁺ йони под форма на 1 mM MgSO₄ повишава протеазната активност с около 15 % в сравнение с контролата. След оптимизиране на условията за

дълбочинно култивиране и състава на хранителната среда е постигната активност от 15.76 U/ml.

Изследванията върху биосинтезираните извънклетъчни протеази продължава с частично пречистване на ензимите чрез последователни ултрафилтрация и молекулно-ситова хроматография със Sephadex G75. При проведената ултрафилтрация с мембрана от регенерирана целулоза и размер на порите 10 kDa се наблюдава значителна загуба на активност от около 50 %. Въпреки това е постигната степен на пречистване 1.74 пъти, което показва, че голяма част от съпътстващите протеини са отстранени от културалната течност. При последвалата молекулно-ситова хроматография със Sephadex G75 се наблюдават 3 близки пика на ензимна активност. При този етап на пречистване почти не се регистрира загуба на ензимна активност. В резултат на проведената SDS-PAGE електрофореза на трите активни пика е установено значително пречистване от съпътстващи белтъци. Представената зимограма на фиг. 22 (а) ясно показва неочветени зони, които са доказателство за съществуването на няколко множествени форми на протеинази в изходната културална течност и в концентрацията след ултрафилтрация. Резултатите от фиг. 22 (б) са трудно обясними и вероятно става въпрос за някаква техническа грешка защото не се наблюдават безцветни зони, а оцветени бандове.

Четвъртото направление „Фосфолипаза С“: При дълбочинното култивиране на изследваните щамове е установено, че най-висока фосфолипазна активност се продуцира от селектираните *Bacillus thuringiensis* №17 и *Bacillus cereus* №87. Поради по-слабо изучената фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* №17 по-нататъшните изследвания са проведени именно с този щам. Специфичността на действие на продуцираната фосфолипаза С върху фосфатидилхолин е доказана чрез тънкослойна хроматография. Максимална фосфолипазна активност се регистрира в края на експоненциалната и началото на стационарната фаза на развитие около 8^я час от култивирането. Замяната на глюкозата в състава на хранителната среда с други монозахариди понижава фосфолипазната активност. Най-висока ензимна активност се наблюдава при 0.4% глюкоза като въглероден източник и при 1% дрождев екстракт. Внасянето в хранителната среда на Zn²⁺ повишава фосфолипазната активност с 1.8 пъти. Количеството на посевния материал 1-10 % не оказва значително влияние върху фосфолипазната активност. Проведено е и дълбочинно култивиране в лабораторен биореактор и са проследени динамиките на изменение на рН, клетъчната плътност и фосфолипазната активност. В резултат на проведените изследвания е постигната 31 U/ml активност, която е с 67 % по-висока в сравнение с изходната активност.

Приложени са различни методи за концентриране и частично пречистване на фосфолипазата от културалната течност на продуцента. При утаяването чрез изсолване с (NH₄)₂SO₄ със степен на насищане 70 % е постигнат добив на активност 64.25%, а при утаяване с 2.5 обема ацетон добивът е 57.74 %. Най-висок добив на активност 85.83% и степен на пречистване 5.76 пъти са постигнати при проведената ултрафилтрация с

нитроцелулозна мембрана 10 kDa. При последвалата молекулно-ситова хроматография със Sephadex G75 е регистриран само един пик на фосфолипазна активност. Добивът след хроматографията е 50.73 %, а степента на пречистване е 30.77 пъти. За допълнително пречистване на ензима докторантът е приложил и йонообменна хроматография с DEAE-Cellulose и DEAE-Sephrose. Резултатите от проведената йонообменна хроматография с DEAE-Cellulose не предполагат допълнително пречистване на ензима. Постигнатата степен на пречистване 33.27 пъти е съпоставима със степента на пречистване след Sephadex G75 30.77 пъти. При йонообменната хроматография с DEAE-Sephrose се наблюдава добре открит единичен пик на фосфолипазна активност при елуиране на свързаните с колоната белтъци. Постигнатата степен на пречистване е 54.45 пъти. След проследяване на пречистването на фосфолипазата чрез SDS-PAGE се наблюдава единична белтъчна ивица в пробата с молекулна маса около 25-30 kDa. Молекулната маса на пречистената фосфолипаза С определена чрез молекулно-ситова хроматография е 25-26 kDa.

Получаването на високо пречистен ензим е дало възможност на дисертанта да определи някои негови характеристики, които определят до голяма степен възможността за приложението му. Температурният оптимум на действие на изолираната фосфолипаза С е при 50 °С като ензимът проявява значителна стабилност и при 40 °С. Фосфолипазата проявява максимална активност в интервала на рН 7 – 8, но значителна активност над 50 % от максималната се отчита и при рН 6 и 9. Широкият интервал на рН, в който ензимът проявява каталитична активност е важна характеристика, която значително разширява потенциалните области за неговото приложение.

Присъствието на Zn^{2+} йони оказва най-значим активиращ ефект върху активността на изолираната фосфолипаза С.

Не са представени опитни резултати от изследването на субстратната специфичност на ензима, но от проведената дискусия става ясно, че изолираната фосфолипаза С проявява най-висока активност спрямо фосфатидилхолин, последвана от активността спрямо фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин.

Докторантът е провел молекулярно-генетични изследвания и е получил интересни резултати относно гена кодиращ биосинтеза на фосфолипаза С в изследвания *Bacillus thuringiensis*.

Чрез конструирани специфични праймери е амплифициран участък от ДНК на изследвания *Bacillus thuringiensis*, който се предполага, че кодира информацията за биосинтеза на фосфолипаза С. Изолираният фрагмент геномна ДНК е секвениран и е получен компютърно транслиран ORF с 278 аминокиселини.

Чрез локален алайнмънт (**BLAST**) е установена 99% идентичност на изолирания фрагмент със секвенции в генома на *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus anthracis*. Това е позволило да се състави библиотека от 19 гена, кодиращи фосфолипаза С при различни видове от р. *Bacillus*. От построената дендрограма става ясно, че най-високо сродство на гена за фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* N17 има

с гена за фосфолипаза С и сфингомиелиназа от *Bacillus cereus* и с гени от *Bacillus anthracis*, което дава основание да се предположи, че тези ензими са потенциални вирулентни фактори.

Основните приноси на дисертационния труд са:

1. Селектирани са щамове от р. *Bacillus* продуценти на амилази, протеази и фосфолипаза С.
2. Изолирана е до хомогенен вид и са определени основните биохимични характеристики на фосфолипаза С продуцирана от щам *Bacillus thuringiensis* №17.
3. Секвениран е генът кодиращ фосфолипаза С при *Bacillus thuringiensis* N17 и е установена най-висока хомоложност с гена на фосфатидил-специфична фосфолипаза С от *Bacillus cereus*.

7. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Част от резултатите от дисертационния труд са публикувани в 2 научни статии на английски език. Едната публикация е в списание *Ecologia balkanica* (индексирана в Scopus), а другата в списание *Journal of Bioscience and Biotechnology*. И на двете публикации докторантът е първи автор. С посочените 2 публикации докторантът покрива минималните критерии на Биологически факултет към ПУ „Паисий Хилендарски” в направление 4.3 Биологически науки, докторска програма по „Микробиология”. Докторантът е участвал в три национални научни конференции с международно участие, където е представил 3 постера.

8. Автореферат

Авторефератът е оформен според изискванията на правилниците на ПУ „Паисий Хилендарски” и коректно отразява структурата и съдържанието на дисертационния труд.

9. Критични забележки и препоръки

Критичните препоръки имат за цел да подобрят бъдещата работа на докторанта, а поставените въпроси да дадат възможност за провеждане на дискусия, в която дисертантът да покаже своята компетентност и да открие ключови резултати от дисертационния труд.

Като критична забележка трябва да отбележа, че не е необходимо включването на данни от контрола при изследване на температурния и рН оптимум на ензимите (фиг. 38 и 40). Това не носи никаква допълнителна информация, а затруднява интерпретирането на резултатите като например получаване на относителни активности над 100 % при оптималните условия.

При проследяване на продуктите на PCR реакцията чрез електрофореза (фиг. 43) са представени два амплифицирани фрагмента, но не става ясно дали това са фрагментите от двата използвани праймера?

Имам следните въпроси към докторанта:

1. В коментара към проведената SDS-PAGE (фиг. 20) на фракциите проявяващи протеазна активност след молекулно-ситова хроматография със Sephadex G75 установявате по-ниско молекулен белтък във фракция № 19 в сравнение с фракции № 27 и 28. Възможно ли е това и какъв трябва да бъде коментарът?
2. Какъв е потенциала на селектираните продуценти за реализиране на индустриално получаване на изследваните ензими?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и съответния правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Биологическия факултет, приети във връзка с правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантът притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Микробиология“ като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на **Йордан Методиев Стефанов** в област на висше образование: **4.** Природни науки, математика и информатика, професионално направление **4.3.** Биологически науки, докторска програма по „Микробиология“.

27.01.2020 г.

Рецензент:

/доц. д-р Георги Добрев/