

## **РЕЦЕНЗИЯ**

От проф. Искра Витанова Иванова дбн

на дисертационен труд на тема:

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

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”, в област 4: Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3: Биологически науки (научна специалност Микробиология)

на редовен докторант ***Йордан Методиев Стефанов***

**Научен ръководители: доц. д-р Соня Костадинова Трифонова**

Със Заповед № Р-33-6903 /13.12.2019 г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ съм определена за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” от докторант Йордан Методиев Стефанов.

### **1. АКТУАЛНОСТ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТВАНИЯ ПРОБЛЕМ**

Нуждата от индустриални биокатализатори постоянно се увеличава поради внедряването на устойчиви решения в производствата свързани с различни отрасли на промишлеността. Перспективите за създаване нови ензимни продукти и подобряване на характеристиките на съществуващите са насочени към микроорганизмите, като сред бактериите водеща роля имат видовете на род *Bacillus*, използвани като продуценти на редица ензими. Тези микроорганизми са предпочитани пред растителните и животински източници, тъй като производството на микробиални ензими е по-евтино, по-лесно контролируемо и надеждно. Бактериите от рода *Bacillus* са източник на ензими от настоящ индустриален интерес. Хидролазите, като амилази, протеази и липази, са основните ензими, консумирани в целия свят и имат приложение в широк спектър от продукти и индустриални процеси. Тези бактерии са отговорни за приблизително 50% от общия пазар на ензими, който се оценява на 1,6 милиарда долара. Едно от основните предимства на използването на тези видове за производството на ензими е, че те лесно се отглеждат и поддържат в лабораторията, защото се адаптират към промените в условията на отглеждане, които възпрепятстват развитието и ензимния синтез на други микроорганизми. Протеазите се

прилагат предимно в хранително-вкусовата, текстилната, фармацевтичната и детергентната промишленост. Някои микроорганизми произвеждат ниски количества от тези ензими, което нарушава индустриалното им приложение. Въпреки това, в повечето случаи чрез приемане на прости методи, като например използването на специфичен и оптимизиран носител, е възможно да се увеличат добивите от производството. Термостабилните протеази, произведени от *Bacillus spp.* са сред най-индустриално важните.

Липазите, тоест ензимите, които катализират хидролизата на триацилглицерола, се използват широко в органичната химия поради високата им специфичност и селективност. По този начин те са получили значително внимание поради потенциалното им използване в индустриалните процеси, особено като биокатализатори. Сред причините за огромния потенциал на тези ензими са високата им стабилност в органичните разтворители, неизискването за кофактори и широката субстратна специфичност. Интересът от научна и индустриална гледна точка към род *Bacillus* се дължи на добре развития им секреторен апарат, който им позволява да продуцират в средата голямо разнообразие от ензими. Необходимостта от ензимни препарати е ясно изразена в сектора с по-скоро техническа насоченост – производство на перилни препарати и детергенти, текстил, хартия, органичен синтез и производство на биогорива. Изключително конкурентни са продуктите, които показват добра активност при широки граници на температурна и киселинна толерантност.

Всичко това ми дава основание да оценя като актуална представената научна разработка, с потенциал за научни постижения, които да имат бърза практическа реализация.

## **2. ОБЕМ И СТРУКТУРА НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

Дисертацията е изложена на 157 стандартни страници текст. Спазена е общоприетата схема и препоръчителните съотношения между отделните части на труда, както следва:

- *Въведение* – 2 стр.;
- *Литературен обзор* - 41 стр.;
- *Цел и задачи* – 1 стр.;
- *Материали и методи* – 15 стр.;
- *Резултати и обсъждане* – 64 стр.;
- *Заключение* -2 стр.;
- *Изводи* – 2 стр.;
- *Приноси* - 1 стр.;
- *Литература* – 20 стр.

Отлично впечатление прави стегнатият научен стил използван при написването и подредбата на дисертацията. Получените резултати са илюстрирани с 46 фигури и 10 таблици. Отлично впечатление прави техническо оформление на дисертацията.

### **3. ЛИТЕРАТУРНА ОСВЕДОМЕНОСТ И ПОСТАНОВКА НА ЦЕЛТА И ЗАДАЧИТЕ.**

Настоящата дисертация е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантът е направил обстоен преглед на постиженията на други изследователи и е анализирал върху 41 страници в литературния обзор. Обзорът представя детайлно състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Разгледани са редица въпроси, свързани с продукцията на ензими от род *Bacillus*. От друга страна род *Bacillus* включва изключително адаптивни хемоорганотрофи, които лесно се поддържат и култивират, имат бързи темпове на растеж и реализират кратки ферментационни цикли. Според някои изследователи, *Bacillus* spp. могат да синтезират над 40 различни екзоензими. Достатъчно подробно са разгледани фосфолипазите и техните основни видове, а именно фосфолипаза А, В, С и D. Специално внимание е отделено на фосфолипаза С. В литературната справка авторът достатъчно подробно представя приложението на ензимите като детергенти, синтеза на пептиди, тексилната и кожарската промишленост, хранително-вкусовата промишленост, фармацевтичната промишленост, както и специфични микробните протеази използвани широко за диагностични и терапевтични цели. На вниманието на читателя се предлагат и някои нерешени проблеми. Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията.

Данните от справката са послужили за ясното и правилно определяне не само на целта, но и за формулировката на задачите. Основна цел на настоящия дисертационен труд е изследване на продукцията на екстрацелуларни ензими от видове на род *Bacillus* с потенциал за биотехнологично приложение, като са поставени за решаване пет добре обосновани 5 експериментални задачи.

Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с темата на дисертационния труд. Литературният списък включва внушителния, дори за голяма докторска дисертация брой от 376 заглавия на латиница. Това говори за отлична теоретична осведоменост на докторанта и с цел намиране на ново научно предизвикателство.

Високо оценявам идеята да се проучва продукцията на екстрацелуларни ензими от видове на род *Bacillus*, което несъмнено е с потенциал за последващо приложение.

#### **4. ОЦЕНКА НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ МЕТОДИ И МАТЕРИАЛИ.**

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експериментите. Те са съвременни и адекватни за реализацията на дисертационния труд. Описани са точно и подробно, като изцяло покриват многостранните области на работата: от класическите до модерните микробиологични изследвания, ензимни методи (ултрафилтрация, изсолване чрез амониев сулфат, утаяване с органични разтворители). Използвани са съвременни хроматографски техники за пречистване (гел филтрация, йонообменна хроматография, FPLC). Използвана е и тънкослойна хроматография за доказване на реакционни продукти, Електрофоретичните методи включват (денатурираща SDS-PAGE електрофореза, нативна PAGE електрофореза на протеази, зимография на протеази, зимография на фосфолипаза С) От молекулярно биологичните методи са представени :изолиране на хромозомна ДНК полимеразна верижна реакция (PCR) секвениране на изолирани ДНК фрагменти. Идентифицирането на получените секвенции е осъществено чрез онлайн инструмента BLAST (basic local alignment search tool). С помощта на софтуер Geneious™ (Biomatters, Нова Зеландия), създадената база данни на гени за фосфолипаза С чрез Genebank и секвенирания ген, кодиращ фосфолипаза С от щам *Bacillus thuringiensis* №17 е конструирано филогенетично дърво (дендрограма).

Докторантът е подбрал селективни хранителни среди, условия и правилните методични подходи за изпълнението на различните задачи.

В отделните етапи на работата докторанта съчетава умело основните микробиологични подходи, със съвременни молекулярно-генетични методи и биохимични методи. Всички това ми позволява да дам висока оценка на научното ниво и на отличната подготовка на докторанта, който успява правилно да съчетае многообразие от класически със съвременни методи за целите на дисертацията, успешно решавайки поставените експериментални задачи.

#### **5. ОЦЕНКА НА ПОЛУЧЕНИТЕ РЕЗУЛТАТИ.**

Раздел „*Резултати и обсъждане*“ е добре структуриран, подкрепен с табличен и графичен материал, с подходяща интерпретация на получени резултати от чужди научни колективи. Авторът последователно представя доказателствен материал по своята научна теза, като по този начин логически финализира експериментална работа. Извършена е голяма по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на комплексно микробиологично, биохимично и молекулярно-генетично изследване.

В резултат на скрининга на щамове от род *Bacillus* за продукцията на екстрацелуларни ензими докторанта Йордан Стефанов изследва 166 щамове от род *Bacillus*, 31% от които

проявяват амилолитична активност, 89% протеолитична и 87% фосфолипазна С активност. Установява положителна корелация между протеолитичната и фосфолипазната активности и оптимизира културалните условия за биосинтез на ензимите - състав на хранителните среди; ефект на микроелементи, време за култивиране, обем на посевния материал. На базата на първоначалния скрининг са селектирани щамове: *Bacillus cereus* №10, *Bacillus thuringiensis* № 14 и *Bacillus thuringiensis* №17, като продуценти на извънклетъчни амилази, протеази и фосфолипаза С. Оптимизирани по отношение на въглеродни източници, източници на азот, двувалентни йони са средите за продукция на ензимите и е определена динамиката на ензимната продукция. На оптимизирана среда щам *Bacillus cereus* №10 увеличава значително амилолитичната си активност. Ензимът се секретира в културалната среда през продължителен период от време и достига максимум на 36-я час. Анализирането на динамиката на ензимната продукция, дава основание да се предположи, че се секретират различни видове амилази в културалната среда по време на растежа. При щам *Bacillus thuringiensis* №14 е отчетена е протеолитична активност, като оптималният период за култивиране при продукция на протеолитични ензими е щам-специфично свойство и зависи от рН на културалната среда. Замяната на буферизиращата система в състава на средата довежда до над два пъти увеличение на протеолитичната активност в супернатантата. В резултат на проведените изследвания е оптимизиран състава на хранителната среда за култивиране на *B. thuringiensis* №14. Пречистването на протеазите от щам *B. thuringiensis* №14 е осъществено с двустепенна схема за пречистване, включваща ултрафилтрация и гел-филтрация на Sephadex G75. Колонната хроматография показва три пика на активност, което предполага продукцията на повече от един ензим с протеолитична активност и различна молекулна маса. Резултатите се потвърждават от проведената SDS-PAGE електрофореза, която доказва наличието на протеини с висока концентрация и с молекулна маса между 45 – 66 kDa. Тяхната протеолитична активност е доказана чрез нативна електрофореза и чрез зимография. Първоначалният скрининг за екзоензими, показва че преобладаваща част от анализираните щамове *Bacillus cereus* (94%) и *Bacillus thuringiensis* (86%) продуцират фосфолипаза С. Съставена е тристепенна схема, включваща ултрафилтрация, гел-филтрация и йонообменна-хроматография. Фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* щам №17 е пречистена до хомогенно състояние. Пречистената фосфолипаза С проявява активност при по-високи температури (50°C), но губи стабилност при продължително третиране в подобни условия. Хидролизната реакция протича оптимално при рН 7.0. Активността на ензима се стимулира от присъствието на цинкови, железни, магнезиеви и калциеви йони. Ензимът от *Bacillus thuringiensis* щам №17 е фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С и хидролизира фосфолипидите със следния ред – фосфотидилхолин, фосфатидилетаноламин и

фосфатидилсерин. Наблюдаваната по-широка субстратна специфичност е ценна при рафинирането на растителни масла и би могла да намери приложение в индустрията с растителни мазнини. След йонообменна хроматография на **HiPrep DEAE** е наличен един протеин молекулна маса между 25-30 kDa. Ензимът е с молекулна маса между 25 и 30 kDa. Сходството между изолираната и изследвана в настоящия дисертационен труд фосфолипаза С, с фосфолипазите от някои щамове *Bacillus anthracis*, което е видно и от извършения BLAST анализ, и от конструирана дендрограма може да се обясни с факта, че тези ензими са потенциални вирулентни фактори.

За да се изолира гена, кодиращ фосфатидилхолин специфична фосфолипаза С от *B. thuringiensis* първоначално са изследвани секвенциите на хомоложни ензими в различни организми. Чрез конструирани специфични праймери и полимеразна верижна реакция е изолиран ДНК продукт от геномна ДНК от *Bacillus thuringiensis* № 17 с големина между 800 - 900 bp, отговарящ по големина на гена за фосфолипаза С. Резултатите от секвенирането на изолирания фрагмент показват висока идентичност с гени, кодиращи фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С в *Bacillus cereus*, както и с гени за фосфолипази С на *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus anthracis*.

Всички резултати са представени и анализирани в отделните глави от раздела „Резултати и обсъждане”, които логично следват хода на решаването на поставените задачи. Те са обобщени и дискутирани в светлината на публикуваните данни. Висока оценка заслужават както идеята, така и обемът от изследвания проведен по изпълнението на тази задача и в целия труд. Направената дискусия по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, още веднъж подчертава качествата на докторанта и владенето на експерименталната теория. С това той доказва, че е овладял напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор.

## **6. ПРИНОСИ И ЗНАЧИМОСТ НА РАЗРАБОТКАТА ЗА НАУКАТА И ПРАКТИКАТА, ЗАБЕЛЕЖКИ И ВЪПРОСИ.**

Авторефератът отговаря напълно на целите, задачите и постигнатите резултати в дисертационния труд.

Приемам направените приноси, като считам, че най важни са:

- ✓ Изолирането и секвенирането на ген кодиращ фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* №17. Доказана е най-висока степен на хомология с гена, от *Bacillus cereus*, кодиращ фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С;

- ✓ Разработването на схема за пречистване на фосфолипаза С от щам *Bacillus thuringiensis* до хомогенно състояние и доказателствата за положителна корелация между продукцията на фосфолипаза С и протеази при щамове *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis*;
- ✓ Оптимизирането на културалните условия и постигната висока активност на фосфолипаза С (31 U/ml) в културалната среда на щам *Bacillus thuringiensis*;
- ✓ Замяната на карбонатната буферираща система с фосфатен буфер поддържаща необходимото рН за продукцията на протеолитични ензими от *Bacillus thuringiensis* щам №14.

Йордан Методиев Стефанов е водещ автор във всичките научни публикации, което показва творческата и изследователската му активност при изработването и оформянето им. Резултатите от дисертацията са публикувани в 2 публикации в списанията: *J. BioSci. Biotechnol* и *Ecologia Balkanika*. Списанието *Ecologia Balkanika* е индексирано в Scopus и Web of Science. Представени са и 3 участия в национални научни форуми където докторанта е водещ изследовател.

Към докторанта имам и следните забележки и въпроси:

- Успешното пречистване на ензимите би Ви дало възможност и за определяне на някои кинетични параметри. Защо не е определена константа на Михалис, при установената от вас фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С хидролизираща фосфолипидите със следния ред – фосфотидилхолин, фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин?
- Каква е ролята на фосфолипазните С изоензими и ролята им като сигнални протеини?
- Какви и колко са домените отговорни за каталитичната активност на фосфолипаза С?
- Как можете да обясните високия добив при пречистването на изследваните ензими?

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен. Темата е актуална, докторантът е усвоил съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Открояват се изключително оригинални научни и приложни приноси. Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Той отговаря на всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и на Правилника на ПУ “Паисий Хилендарски“. Поради гореизложеното, убедено даваме своята **положителна оценка** за

проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагаме 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, научна специалност **Микробиология**.

03.02.2020 г.

София

Рецензент:

Проф. Искра Иванова дбн