

# СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Илия Николов Илиев,

катедра „Биохимия и микробиология” при ПУ „Паисий Хилендарски” – Пловдив

**Относно:** дисертационен труд на тема *„Екзоензими, продуцирани от щамове на род *Bacillus* - микробиологични, молекулярно-генетични и биотехнологични аспекти“* представен от докторант **Йордан Методиев Стефанов** от катедра „Биохимия и микробиология” към ПУ „Паисий Хилендарски“ за придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР” по професионално направление по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; Докторска програма: Микробиология.

**Получени материали:** Дисертация, автореферат, списък с публикации по дисертацията, CD с материали по дисертацията.

Със заповед № Р-33-6903 /13.12.2019г. на Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ съм определен за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” от докторант Йордан Методиев Стефанов на тема *„Екзоензими, продуцирани от щамове на род *Bacillus* - микробиологични, молекулярно-генетични и биотехнологични аспекти“*. Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в катедра «Биохимия и микробиология» към ПУ „Паисий Хилендарски“. Ръководител на докторанта е доц. д-р Соня Костадинова, специалист, чиято основна научна тематика е в областта на фосфолипазните ензими. Дисертацията е оформена по стандартен за България модел, написана е на 157 стандартни машинописни страници и съдържа следните основни глави: 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., Литература – 20 стр., Приноси – 1стр. Впечатление прави използваният коректен научен стил при написването и подредбата на дисертацията. Получените резултати са илюстрирани с 46 фигури и 10 таблици.

Представеният дисертационен труд обхваща актуална тематика в областта на промишлената микробиология и биотехнология. Докторантът е избрал да се занимава с изучаване на фосфолипазните ензими от продуценти на род *Bacillus*. Към липолитичните ензими с микробиален произход се наблюдава засилващ се интерес тъй като те са много важна група от биокатализатори с биотехнологични приложения при производството на детергенти, аромати, фармацевтични продукти, финни химикали за биосензори, за биоремедиация, в козметиката и парфюмерията. В основата на този нестихващ интерес е, че този клас ензими катализират синтезата на енантиометрично чисти активни фармацевтични вещества без изпозването на кофактори. Те показват висока стабилност в присъствие на органични разтворители, което дава възможност да се модифицират субстрати, разтворими в органични разтворители при провеждане на хетерогенна ензимна катализа.

Липазите и в частност фосфолипазите катализират голям брой реакции, включващи хидролиза, естерификация, алкохолиза, ацидолиза, естерификация и хидролиза на аминокиселини. Биохимичната и молекулярно-биологичната характеристика на тези ензими от различни източници ще хвърли светлина върху тяхната хетерогенност, съотнесена към специфичността на реакцията и съпоставянето на аминокиселинната секвенция в активния център и каталитичните свойства. Всичко това доказва актуалността на темата, която е избрана от докторанта.

Докторант Йордан Стефанов е използвал достатъчно голям брой литературни източници общо 376 , публикувани през сравнително голям период от време. Бих препоръчал на докторанта в бъдещата си работа да акцентира вниманието си основно на литература от последните 10 години, което ще прецизира насоките на научните изследвания към момента.

В литературния обзор докторантът предоставя подробна информация за фосфолипазите, която е пряко свързана с темата на дисертацията, както и информация за амилази и протеази от род *Bacillus*. В литературния обзор е поместена подробна информация за приложението на ензимите, което считам за странична информация спрямо темата на дисертацията и би могло да бъде по-кратка.

В резултат на направения литературен обзор, авторът на дисертацията ясно формулира целта на изследването, която е постигната при решаването на пет добре обосновани задачи. Те стартират със скринингова програма и завършват с молекулярно-биологичен анализ на гени, кодиращи изучаваните ензими от селектираните шам-продуценти. По същество работата следва класически план на биотехнологично проучване за изучаване потенциалът за производство на определени ензими.

В раздел „Материали и методи“ са описани основните методи, които са прилагани при изпълнението на поставените задачи в дисертацията. По време на разработването на дисертационния труд докторант Стефанов е усвоил необходимия брой съвременни микробиологични, биохимични, ензимологични и молекулярно-биологични методи, което е основание да се счита че е придобил необходимия методичен опит при извеждане на научен експеримент.

При проведения първоначален скрининг на щамове от род *Bacillus* за продукция на екстрацелуларни ензими докторант Стефанов изследва 166 щамове от род *Bacillus*, 31% от които проявяват амилолитична активност, 89% протеолитична и 87% фосфолипазна С активност. Интересен подход на автора е да изследва корелацията на секрецията на протеолитични и фосфолипазни ензими и в следствие да оптимизира състава на хранителната среда за продуциране на ензимите. Във втория етап на изследването авторът е използвал щамове *Bacillus cereus* №10, *Bacillus thuringiensis* № 14 и *Bacillus thuringiensis* №17, като продуценти на извънклетъчни амилази, протеази и фосфолипаза С. В следващия етап на своето изследване авторът прилага тристепенна схема за пречистване на секретираните ензими, включваща ултрафилтрация, гел-филтрация и йонообменна-хроматография. Фосфолипаза С от *Bacillus thuringiensis* щам №17 е пречистена до хомогенно състояние. Авторът е установил, че активността на ензима се стимулира от присъствието на цинкови, желязни, магнезиеви и калциеви йони и е доказал, че ензимът от *Bacillus thuringiensis* щам №17 е фосфатидилхолин-специфична фосфолипаза С и хидролизира фосфолипидите със следния ред – фосфотидилхолин, фосфатидилетаноламин и фосфатидилсерин. След прилагане на йонообменна хроматография на носител HiPrep DEAE докторантът е детектирал един протеин, съответстващ на изследвания ензим с молекулна маса между 25-30 kDa. След проведените молекулярно-биологични експерименти 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*.

Докторантът оформя оригинални и потвърдителни приноси на дисертационния труд, с които съм съгласен. Бих искал да отбележа особено важните според мен оригинални приноси:

1. 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

2. 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*.

Дисертацията е написана на ясен и стегнат научен език. Авторефератът отговаря напълно на целите, задачите и постигнатите резултати в дисертационния труд.

Резултатите от дисертацията са публикувани в две научни публикации в международни реферирани списания : *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. В трите публикации докторантът е първи автор.

Към докторанта имам следния въпрос:

1. Как бихте оценили приложената от вас схема за пречистване на ензимите с оглед евентуално промишлено получаване и приложение?

#### **Заключение:**

**Оценката ми за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и научните приноси на докторант Йордан Методиев Стефанов е положителна. Въпреки направените забележки и препоръки, бих искал да отбележа още веднаж достойнствата й – една прецизно проведена изследователска работа, отговаряща напълно на изискванията за образователна и научна степен „Доктор“, съдържаща достатъчно количество резултати, правилно интерпретирани и правилно оформени изводи.**

Представената дисертация напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане. Постигнатите резултати ми дават основание да предложа да бъде присъдена образователна и научна степен „доктор“ на **Йордан Методиев Стефанов** по професионално направление по област на висше образование 4.Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; докторска програма: Микробиология

04.02.2020г.

Изготвил:

Пловдив

(проф. д-р Илия Илиев)