

СТАНОВИЩЕ

от доц.д-р Соня Костадинова Трифонова
катедра „Биохимия и микробиология“
Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

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 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 Трифонова – ПУ „Паисий Хилендарски“

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № РЗЗ-6903 от 13.12.2019 г. на Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура 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“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3 Биологически науки, докторска програма Микробиология.

Автор на дисертационния труд е Йордан Методиев Стефанов – редовен докторант в катедра „Биохимия и микробиология“ с научен ръководител доц. д-р Соня Костадинова Трифонова от ПУ „Паисий Хилендарски“.

Представеният от Йордан Стефанов комплект документи на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

1. Молба по образец до Ректора за откриване на процедура;
2. Автобиография по европейски формат;
3. Протокол от предварителното обсъждане в катедрата;
4. Автореферат;
5. Декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;

6. Справка за спазване на специфичните изисквания на Биологическия факултет;
7. Списък на публикациите;
8. Дисертационен труд;
9. Копия на публикациите по темата на дисертацията.

Йордан Стефанов е възпитаник на Биологическия факултет на ПУ „П. Хилендарски“; завършил е ОКС „бакалавър“, специалност „Биоинформатика“ през 2013 г. и ОКС „магистър“, специалност „Биотехнологична микробиология“ през 2015 г. В периода м. Септември 2014 – м. Октомври 2015 г. работи като химик в Хрансервизинженеринг АД, Велико Търново. От 01.03.2016 г. е редовен докторант в катедра „Биохимия и микробиология“, докторска програма „Микробиология“.

2. Актуалност на тематиката

Ензимно катализираните реакции имат редица предимства пред химичните процеси, като селективност, високо качество на получения продукт и преди всичко, по-слабо замърсяване на околната среда. Микроорганизмите като продуценти на ензими са предпочитани пред растенията и животните поради високата пластичност на метаболизма си, относителната независимост от условията на външната среда и възможността за бързо натрупване на биомаса. Поради това, получаването на ензимни препарати от микроорганизми е в основата на разработването на редица индустриални технологии, а сред бактериите видовете от род *Bacillus* са водещи и с големи перспективи.

Протеолитичните ензими намират приложение в различни отрасли на хранителната индустрия; в текстилната и кожарската промишленост, замествайки конвенционалните физико-химични методи, а също така при синтеза на пептиди, влагани в храни и лекарства. Производството на детергенти е един от най-големите консуматори на ензими. Детергентите използват протеази, липази и амилази за елиминиране на замърсявания, които съдържат протеини, пигменти и липиди.

Фосфолипазите намират приложение в млечната промишленост; при производството на функционални храни, обогатени с фосфатидилсерин; при производството на сосове и майонези; за обезслизяване на растителни масла. От друга страна фосфолипазите тип С са най-детайлно изучените бактериални фосфолипази, поради факта, че някои от тях са фактори на патогенност идентични с хемолизини и токсини. Действието им върху мембранните фосфолипиди се използва за изучаване на фосфолипидния състав на мембраните и за наподобяване действието на еукариотните фосфолипази С върху клетъчния метаболизъм. При ензимната обработка на фосфолипидите се получават липидни медиатори или вторични посредници (като арахидонова киселина и диацилглицерол), които играят ключова роля в мембрания транспорт, сигналната трансдукция, клетъчна пролиферация и апоптоза.

В този аспект, тематиката на дисертационния труд е актуална с конкретно научно-приложно значение.

3. Познаване на проблема

Литературният обзор, оформен на базата на 376 литературни източници на латиница показва много добра теоретична осведоменост по темата на дисертацията. Обзорът представя систематизирана информация за екстрацелуларната ензимна продукция при видове от род *Bacillus*. Логично, акцентът е поставен върху 3 групи ензими – амилази, протеази и фосфолипази, които са обект на изследване в дисертационния труд. За тези ензими е направена изчерпателна литературна справка по отношение на микроорганизмите-продуценти и условия на синтез, пречистване на протеините, молекулни и ензимни свойства, физиологични ефекти.

Представена е информация за приложението на микробиалните ензими в различни биотехнологични процеси.

4. Методика на изследването

При изпълнението на поставените в дисертационния труд задачи, докторантът Йордан Стефанов е усвоил и прилага голям брой класически и съвременни микробиологични, биохимични, молекулярно-биологични и биоинформатични методи. Методите са описани изчерпателно и точно, което дава възможност да бъдат възпроизведени. Адекватно приложените методи показват, че докторантът Йордан Стефанов е придобил необходимия методичен опит за провеждане на научен експеримент.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е написан на 155 страници. Съдържанието е правилно структурирано в раздели, между които са спазени оптимални съотношения: Въведение – 2 стр., Литературен обзор - 40 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 16 стр., Резултати и обсъждане – 64 стр., Изводи – 2 стр., Приноси – 1 стр., Литература – 21 стр..

Целта и задачите са правилно формулирани. За реализацията им е извършена сериозна по обем работа, с необходимия брой повторения за всеки експеримент. Резултатите са онагледени с 45 фигури и 9 таблици.

В дисертацията са анализирани 167 щама от род *Bacillus* за продукция екстрацелуларни ензими и са подбрани продуценти на амилолитични, протеолитични и фосфолипазни ензими. Резултатите от дисертационния труд могат да бъдат систематизирани в три основни раздела.

Първият раздел включва работата по определяне на културалните условия за продукция на амилолитични ензими от щам *Bacillus cereus* No 10. Оптимизиран е състава на хранителната среда чрез вариране на допълнителни въглеродни източници, източници на азот, метални йони и е установена екстрацелуларна продукция за продължителен период от време с пик на 36 час

от култивирането. В резултат на съставената оптимизирана среда, амилолитичната активност е повишена с 53%.

Във втория раздел е определена протеолитичната активност на 15 щама *Bacillus* и е подбран *Bacillus thuringiensis* No 14, с изходна активност 9.2 U/ml като продуцент. Проследена е протеолитичната продукция по време на растежа и са оптимизирани културалните условия за ензимната продукция. В резултат е постигнато увеличение на екстрацелуларната протеазна активност до 15 U/ml, за което основно значение има замяната на буферизиращия агент в състава на средата. Молекулноситовата хроматография на концентриран чрез ултрафилтрация ензимен препарат доказва няколко пика с протеолитична активност. Проведената SDS-електрофореза и зимография дават основание на докторанта да направи предположение, че щамът продуцира няколко протеолитични ензима.

Третият раздел фокусира работата върху фосфолипаза С. Селектираният щам-продуцент *B.thuringiensis* е с висока изходна активност, която е повишена с 67% в резултат на оптимизирането на културалните условия. Фосфолипаза С се продуцира в културалната среда в края на експоненциалната фаза на растеж (максимум на 8-я час), което наред с високата изходна активност прави щамът *B.thuringiensis* 14 подходящ кандидат за биотехнологично приложение. Приложени са различни методи за пречистване на фосфолипаза С и ензимът е получен в хомогенно състояние. Анализирани са ензимни и молекулни свойства на пречистения ензим.

Конструирани са специфични праймери и е изолиран гена, кодиращ фосфолипаза С при *Bacillus thuringiensis* щам № 17. Резултатите от секвенирането показват висока идентичност с аналогични гени при *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. anthracis*.

Резултати са обсъдени и съпоставени с литературните данни. Изводите са логично следствие от поставените задачи и отразяват вярно получените резултати. Формулираните приноси имат научно и научно-приложно значение.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Докторантът е представил 2 статии във връзка с дисертацията. Статиите са на английски език, едната е публикувана в списание с импакт ранг – *Ecologia Balkanica*, а втората статия – в *Journal of BioScience and Biotechnology*. В двете публикации Йордан Стефанов е първи автор.

Личните ми впечатления от докторанта и неговата работа са отлични. Йордан Стефанов е интелигентен, работоспособен и инициативен млад човек, с голям потенциал за усвояване на знания. За периода от 3 години Йордан Стефанов не само успя да изпълни поставените в дисертацията задачи, но също така надгради теоретичната си подготовка в областта на микробиологията и биохимията, усъвършенства практическите си умения и

способността за аналитично мислене. Категорично, представеният дисертационен труд е резултат от работата на докторанта.

7. Автореферат

Авторефератът е направен според изискванията и вярно отразява основните резултати на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Дисертационният труд показва, че **Йордан Методиев Стефанов притежава теоретични знания и професионални умения по научна специалност Микробиология**. В процеса на обучение докторантът е усвоил широк набор от умения и методи, способности самостоятелно да провежда експерименти, правилно да представя и интерпретира получените резултати.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено в 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 **Микробиология**.

06.02.2020 г.

Изготвил становището:

Доц.д-р Соня Костадинова