

ПРОТОКОЛ №

За второ заседание на научно жури за защита на дисертационен труд на Флора Цветанова, редовен докторант в Институт по инженерна химия - БАН

Днес, 23.06.2016 г. (четвъртък) се проведе второто заседание на научното жури за защита на дисертационен труд на Флора Цветанова, редовен докторант в Институт по инженерна химия, сформирано със заповед РД № 15-75 / 29.02.2016 г. на Директора на ИИХ, БАН.

Състав на научното жури:

Проф. д-р Драгомир Янков, ИИХ, БАН
Доц. д-р Величка Гочева, УХТ, Пловдив
Доц. д-н Маргарита Камбурова, ИМикБ, БАН
Доц. д-р Златка Алексиева, ИМикБ, БАН
Проф. д-р Калоян Петров, ИИХ, БАН

На заседанието присъстваха всички членове на научното жури, а също така и следните хабилитирани лица:

Проф. д-р Румяна Статева, Проф. д-р Ирен Цибранска, Доц. д-р Татяна Петрова, Доц. д-р Даниела Джонова-Атанасова, Доц. д-р Мария Дойчинова, главни асистенти, асистенти и гости.

Председателят, проф. К. Петров откри заседанието и представи докторанта. Ф. Цветанова представи кратко експозе на дисертационния си труд на тема „Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте чрез рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A”.

Проф. Петров даде думата на членовете на научното жури да представят двете рецензии и трите становища относно дисертационния труд. Рецензиите и становищата са приложени към документите по защитата.

Докторант Флора Цветанова благодари за направените препоръки и забележки в рецензиите и становищата на членовете на научното жури и отговори последователно на поставените въпроси и критични бележки.

Забележки и препоръки:

Проф. д-р Драгомир Янков:

Би било добре в литературния обзор да се даде кратко описание на техниките за изолиране и пречистване на ДНК, на PCR метода и техниките за генна модификация, с оглед на това, че дисертацията е представена за получаване на степен по специалността „Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология“ и публиката не е достатъчно добре запозната с тях.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Изолиране и пречистване на ДНК: може да се раздели на няколко стъпки:

1. Отглеждане на бактериалната култура
2. Отделяне на клетките от хранителната среда, разрушаване на клетките и освобождаване на клетъчното съдържимо - най-често с помощта на химични агенти (лизозим, ЕДТА, SDS); следва центрофугиране
3. Обработване на клетъчния екстракт за отстраняване на всички компоненти с изключение на ДНК-обикновено има РНК и белтък. За утаяване на белтъците може да се използва фенол или смес от фенол и хлороформ 1:1 и след това-центрофугиране. Белтъците се отделят като коагулирала бяла маса в междинен пласт между водния и органичния слой. Водният слой на нуклеиновите киселини може да бъде отделен с

пипета. Ако белт. съд. е прекалено високо, може да се третира с протеиназа К или протеаза - полипептидите се разграждат до по-малки олигопептиди, които са по-лесно отстранявани с фенол. За отстраняването на РНК се използва рибонуклеаза, която разгражда до рибонуклеотидни мономери. Концентриране на получения ДНК разтвор-етанолно утаяване и преутаяване, в присъствието на соли (Na^+) при температура $20\text{ }^\circ\text{C}$ или по-ниска. Етанолът преципитира високомолекулни НК. В разтвора се поставя стъклена пръчка, а ДНК се увива около нея.

В нашия случай бяха използвани китове за изолиране на ДНК. Те съдържат химикали с търговски имена (буфери Т, А, В), чиито точен състав е търговска тайна на производителя, но по същество съдържат смеси на горе описаните съединения.

PCR-полимеразна верижна реакция. По същество, това е метод за размножаване на нужния ген или фрагмент ДНК. Необходимо е да се направи смес, която съдържа: 1. ДНК съдържаща нужния ни фрагмент (ген), 2. праймери (измислени от нас последователности от нуклеотиди, комплементарни на краищата на фрагмента), 3. ензим полимераза и 4. разтвор от отделни нуклеотиди, които полимеразата да лепи комплементарно по едноверижни ДНК вериги. PCR реакцията се осъществява в апарат, поддържащ поне 3 различни температури за определено време. Първата стъпка е разделянето на двойноверижната ДНК при $94\text{ }^\circ\text{C}$ за няколко минути, после температурата се намалява за да се прикрепят праймерите (анилират) към едноверижните ДНК-матрици. През третият етап (елонгация) температурата се повишава до около $72\text{ }^\circ\text{C}$ и под действието на ензима полимераза се създават нови комплементарни вериги (един PCR цикъл). Следва втори цикъл, съдържащ трите стъпки на нагряване, анилинг и елонгация, трети и т.н., като след всеки цикъл броят на молекулите расте в геометрична прогресия. Цикълът денатурация-хибридизация-синтез се повтаря обикновено 25-30 пъти, в резултат на което могат да се получат няколко стотици милиона копия от амплифицирания ДНК фрагмент.

Проф. д-р Драгомир Янков:

Трябва да се отбележи, че изследвания концентрационен диапазон (3-55 ppm) не е много удачно избран, т.к. от литературата е известно, че за стабилизиране и активиране на различните амилази са необходими от 10 до 70 ppm.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Максималната добавяне конц. на CaCl_2 е 0.2 g/L , което съответства на 55 ppm Са. 70 ppm Са биха отговаряли на 0.25 g/L CaCl_2 . Добавянето на такава конц. Са въпреки, че би увеличило амилазната активност не би довело до увеличаване на крайната конц. на 2,3-БД, както се вижда от табл.

Проф. д-р Драгомир Янков:

По мое мнение експериментите са прекратени преждевременно, защото от фиг. 17 и 19 е видно, че концентрацията на 2,3-БД продължава да се покачва дълго време след изчерпването на субстрата.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Дори и на 120 час да не е достигната максималната конц. 2,3-БД (g/L), продуктивността (g/Lh) намалява значително, т.е. след 120 час процесът би бил икономически неефективен и поради това, не е продължен.

Проф. д-р Драгомир Янков:

В литературния обзор е отбелязана двойната роля на разтворения кислород във ферментационната среда. Поради какви причини е решено да не се изследва влиянието му?

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Определено влиянието на разтворения кислород във ферментационната среда е от голямо значение за получаването на 2,3-БД. Това би могло да се установи чрез експерименти, проведени във ферментатор, които за съжаление не сме провели.

Проф. д-р Драгомир Янков:

Защо не са представени данни за плазмидната стабилност на рекомбинантния щам? Има ли данни за генерирането и размножаването на Р- клетки?

Отговор на докторант Флора Цветанова:

В условия на селективен натиск, т.е. 75 $\mu\text{g/mL}$ Km трансформантите са стабилни. Не са проведени опити с рекомбинантния щам в среда без канамицин, поради което стабилността му в условия без селективен натиск не е установена.

Проф. д-р Драгомир Янков:

На стр. 62 поради печатна грешка не е ясно за коя таблица става въпрос.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Става въпрос за табл. 5.

Доц. д-р Величка Гочева:

Смятам, че качеството на дисертационната работа би се повишило, ако се използват статистически методи за обработка на експерименталните данни. Това е предпоставка за убедителност на получените резултати и базираните на тях изводи.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Съгласна съм с направената забележка. В нашият случай статистическите методи за обработка наистина биха могли да се приложат при оптимизирането на хранителните среди с глюкоза при култивирането на дивия щам.

Доц. д-р Златка Алексиева:

Добре е да се отбележи както в дисертацията, така и в автореферата професионалното направление, което в дадения случай е 5.10. Химични технологии.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Пропуснато е. Всъщност професионалното направление е 4.2. Химични науки, а научната специалност е Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология

Доц. д-р Златка Алексиева:

В литературния обзор, при изброяването на естествените микробни продуценти на 2,3-бутандиол са представени микробни видове, а не таксономични групи, което предполага по-голямо систематично обобщение. Би било добре да се дадат примерите за шамове, способни напълно да конвертират пирувата до 2,3-бутан диол и да бъдат разграничени от тези, способни да го конвертират до междинни съединения.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

До момента не са известни шамове, които да ферментират пирувата изцяло в 2,3-БД; винаги се образуват и странични продукти на ферментацията. Всички те – млечна, сукцинова, оцетна к-на, и етанол са крайни продукти на ферментацията и се получават чрез метаболизиране на пирувата чрез различни ензимни системи. Единствено ацетоина се явява междинно съединение при метаболизирането на пирувата до 2,3-БД. В нашия случай концентрацията на копродуктите е сведена до минимум, като два от тях – сукцинова и млечна киселина липсват напълно, а концентрациите на оцетна к-на, ацетоин и етанол са сведени до минимум.

Доц. д-р Златка Алексиева:

По отношение на частта „Използвана литература“: Не е прието в списъка на литературата към дисертационната разработка да се включват публикуваните в течение на разработката □ материали. - (Tsvetanova, F., Petrova, P., Petrov, K. 2014.. 2,3-butanediol production from starch by engineered *Klebsiella pneumoniae* G31-A. Appl Microbiol Biotechnol, 98: 2441-2451.)

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Напълно съм съгласна с направената забележка.

Доц. дбн Маргарита Камбурова:

Чрез определяне на сухо тегло да се установи какво количество биомаса съответства на 1 OD и биомасата да се изразява в г/мл.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Поради това, че неразтвореното нишесте се отразява върху мътноста на пробата, измерването на биомаса чрез оптична плътност на взетите проби не би било коректно.

Доц. дбн Маргарита Камбурова:

Да бъде проверена културалната течност на дивия щам *Klebsiella* за наличие на екзоензими (бета-амилаза и глюкоамилаза).

Отговор на докторант Флора Цветанова:

До момента не е известен щам *Klebsiella*, който да секретира екстрацелуларни амилолитични ензими. В нашия случай, в супернатанта от културалната течност на дивия щам също не се наблюдава амилазна активност. Дивият щам не продуцира от нишесте никакви количества 2,3-БД, както и не е детектирано понижение на съдържанието на нишесте в културалната течност. В този смисъл, ако дивият щам притежава екстрацелуларни глюкоамилази или бета-амилази, то те са с изключително слаба активност. Вероятно, дивият щам притежава интрацелуларни амилазни ензими, като това би могло да се потвърди при посяването му на среда с малтоза. Такъв опит не е провеждан. При всички положения, един такъв опит би обогатил изследването, но не би променил крайните изводи на дисертацията.

Доц. дбн Маргарита Камбурова:

В раздел Материали и методи подробно да се опише съдържанието на използваните разтвори; как са били конструирани праймерите amyF и amyR

Отговор на докторант Флора Цветанова:

Праймерите са конструирани от фирма Biomers, като нуклеотидната им последователност е подредена съобразно гените за алфа амилаза на типови щамове *V. licheniformis*, достъпни от световните бази данни.

Доц. дбн Маргарита Камбурова:

Във Фиг. 12 не се обяснява какви са колонииите на Петриевата паничка и дали е включена контрола сред тях, съдържа ли агаровата среда някакъв антибиотик?

Отговор на докторант Флора Цветанова:

На показаното петри се наблюдават две колонии със зони около тях, говорещи за успешна трансформация и две колонии, около които не се формират зони, показващи неуспешната трансформация. Те могат да играят ролята на негативна контрола.

Агаровата среда включва канамицин.

На същата среда без канамицин, дивият щам не формира зони.

Доц. дбн Маргарита Камбурова:

Във Фиг. 13 не е означена дължината на ДНК фрагментите отговарящи на двете ивици, фрагментите в маркера на каква дължина отговарят и т.н.

Отговор на докторант Флора Цветанова:

На фиг. 13 се наблюдават три ивици – около 1500, отговаряща на фрагмента amy1, втора малко под 5000, отговаряща на отворения вектор pCR-TOPO, и една малко над 5000, отговаряща на недорестрицирания вектор pCRamyBL (вероятно рестрициран само с Xho или само с Xba).

Докторант Флора Цветанова отправи благодарности към научното жури за техните препоръки и забележки и за положителното им мнение. Флора Цветанова

изрази и своята благодарност към научния си ръководител проф. Калоян Петров, за научните и практичните умения придобите под негово ръководство.

Проф. Петров даде думата на членовете на научното жури да изкажат своята оценка за докторанта и да дадат отговор поименно поддържат ли изказаните си мнения в написаните рецензии и становища.

Членовете на научното жури: проф. д-р Драгомир Янков, доц. д-р Величка Гочева, доц. д-р Златка Алексиева, доц. д-рн Маргарита Камбурова, проф. д-р Калоян Петров гласуваха за присъждане на образователната и научна степен „доктор“:

за – 5;

против – няма;

въздържали се – няма.

РЕШЕНИЕ:

Научното жури единодушно присъжда образователната и научна степен „доктор“ на Флора Венциславова Цветанова.

23.06.2016 г.

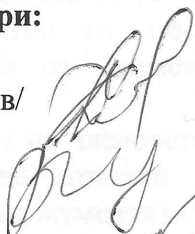
Председател на научното жури:

/проф. д-р Калоян Петров/

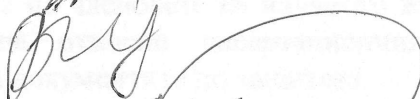


Членове на научното жури:

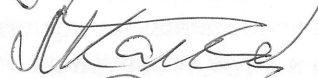
/проф. д-р Драгомир Янков/



/доц. д-р Величка Гочева/



/доц. д-рн Маргарита Камбурова/



/доц. д-р Златка Алексиева/

