



## РЕЦЕНЗИЯ

Относно защита на дисертационен труд “Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте чрез рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31 – А”

за придобиване на образователната и научна степен „доктор“

по специалност 02.10.09. “Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология”

с кандидат **Флора Венциславова Цветанова**

Рецензент: Величка Гочева Гочева, д-р, доцент

### 1. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем

Разработваният в дисертационния труд проблем е актуален и значим в научно и научно-приложно отношение, тъй като третира поне две приложения на биотехнологиите при решаване на глобалните екологични и енергийни проблеми. В допълнение към известните приложения на 2,3-бутандиол при приготвянето на бои, разтворители, пластмаси и фармацевтични продукти, в последните години се отделя особено внимание за неговото използване в смеси от биогорива. Вторият важен аспект е директното използване на нишестето от отпадни растителни суровини за синтез на 2,3-бутандиола.

Считам, че актуалността на темата е добре очертана и обоснована във въведението на дисертацията и литературния обзор. Докторантката Цветанова е фокусирала усилията си към важен за биотехнологичната наука и промишленост проблем. Изследванията са навременни, а резултатите от тях са актуални и недвусмислено очертават възможността за приложение на рекомбинантни щамове на *Klebsiella pneumoniae* за разработване на технологии и биопродукти с висока добавена стойност.

### 2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Рецензираният от мен дисертационен труд обхваща 103 страници, а резултатите са обобщени и представени в 20 фигури и 19 таблици. Ще започна рецензията си с това, че дисертацията на Флора Цветанова прави впечатление с точния и лек за четене научен език, с творческото и логичното представяне на научната информация по темата, както и с богатата фактология, свързана с проведените изследвания. Дисертантката умело представя наличната по проблема информация, като критично обяснява необходимостта от изследване на разработване на рекомбинантни щамове продуценти на 2,3-бутандиол. Способността на микроорганизмите

да синтезират 2,3-бутандиол е позната от повече от 100 години, но едва в последните години интересът към тях видимо се засилва, свързано с кризата с фосилните горива. В допълнение, изследването на възможността за синтез на 2,3-бутандиол на база нишестесъдържащи суровини не е широко застъпено и понастоящем не са описани и документирани естествени продуценти. В тази връзка, съчетаването на биосинтетични и амилолитични свойства при рекомбинантния щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A дава потенциал за свръхсинтез на продукта в индустриални мащаби с използване на евтина суровинна база.

**Литературният обзор** обхваща 37 стр. и е базиран на единствено на източници на латиница (150), повечето от които са публикувани през последните 2 десетилетия. Изложеното показва, че информационните източници са съвременни и в достатъчен обем, за да очертаят и дискутират еднозначно и точно състоянието на проблема.

В литературния обзор авторката изчерпателно засяга същността на микроорганизмите, продуциращи 2,3-бутандиол, представя метаболитния път и механизмите за формиране на стереоизомери на 2,3-бутандиол, посочвайки и неговото приложение в промишлеността. Докторантката критично отбелязва в обзора, че естествените щам-продуценти не са подходящи за свръхсинтез от нишестесъдържащи суровини, с което насочва вниманието към използване на методите на ДНК-технологията за конструиране на рекомбинантни щамове. Немалко страници от обзора тя посвещава и на факторите, които оказват влияние върху получаването 2,3-бутандиол, както и на субстратите за култивиране на щам-продуцентите. След обстоен и аналитичен преглед на обемистата литература по въпроса, докторантката умело обобщава, че конструирането на рекомбинантен щам, способен директно в едностъпален процес да конвертира необработеното нишесте в 2,3-бутандиол би донесло ползи както за науката, така и за промишлеността, при което тя основателно и логично достига до целите и задачите на своята дисертация.

**Целта** на дисертацията е създаване на биотехнология за директно превръщане на сурово нишесте в 2,3-бутандиол чрез ферментация. На тази цел са подчинени ясно и точно формулирани задачи, целящи подбор на щам-продуцент, клониране и хетероложна експресия на ген за екстрацелуларна  $\alpha$ -амилаза в него, оптимизиране на условията за максимална експресия на гена и достигане на максимален добив на 2,3-бутандиол във високо концентрирани разтвори на нишесте.

В раздел „**Материали и методи**” са описани прецизно основните методи, които са прилагани при изпълнението на поставените задачи в дисертацията. Мащабността на заложения експеримент при разработването

на дисертационния труд изисква прилагането на голям брой класически и съвременни микробиологични, биохимични и молекулярни методи, които дисертантката е усвоила. Трябва специално да се отбележи прилагането на специфични молекулярни методи за охарактеризиране, клониране и пренос на гена *amyL* в *Klebsiella pneumoniae* G31, което придава висока научна стойност на получените резултати. Всичко това е основание да се счита, че Флора Цветанова е придобила необходимия методичен опит за извеждане на научен експеримент.

Разделът „Резултати” е основен за дисертацията, богато е илюстриран с таблици и фигури и може да бъде подразделен на четири основни части: а) Изследване на влиянието на компонентите на глюкозна хранителната среда върху синтез на 2,3-бутандиол на родителския щам; б) Конструирание на рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A; в) Изследване на влиянието на изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG),  $\text{Ca}^{2+}$  и глицин върху синтеза на 2,3-бутандиол и биосинтез на 2,3-бутандиол от рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A на нишестесъдържащи хранителни среди.

Изборът на подходящ състав на хранителната среда за синтез на 2,3-бутандиол от дивия щам се основава на обширно изследване на девет синтетични хранителни среди, които са умело подбрани от известните литературни източници. Докторантката доказва, че най-важният компонент на хранителната среда, който влияе положително на синтеза на 2,3-бутандиол е дрождевият екстракт, но поради високата му цена тя предлага замяната му с пептон. Друг важен резултат на този етап е дозателството, че  $\text{Zn}^{2+}$  повишава концентрацията на синтезирания 2,3-бутандиол (с 6%) и продуктивността на системата (с 11%).

Особено важен етап в дисертационния труд е конструиранието на рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A, за което докторантката създава и уникална схема за клониране на ген *amyL* от *Bacillus licheniformis* във вектор pJET1.2. След рестрикция на получения конструктор и гел-електрофоретично разделяне на фрагментите, този, съдържащ *amyL* гена е пречистен и клониран във вектор pCR2.1-ТОРО. Забележително е, че докторантката взема решение да използва този вектор, който съдържа *lac*-промотор от *E. coli*, но не носи гена *lacI*, кодиращ съответстващия му *lac*-репресор. В следващи експерименти за определяне на влиянието на индуктора IPTG върху синтеза на 2,3-бутандиол се доказва неговия положителен ефект при хидролиза на нишесте, дължащ се на увеличената експресия на *amyL* гена.

Докторантката правилно подбира глицина като един от факторите за подобряване на пропускливостта на клетъчната мембрана и убедително

доказва, че при концентрация от 0,5% се наблюдава повишена секреция на  $\alpha$ -амилазата в културалната среда.

Получените от докторантката резултати са ценни за науката и биотехнологичната промишленост, тъй като конструираният щам притежава уникални характеристики, все още не е системно изследван и притежава потенциал за промишлен свръхсинтез на 2,3-бутандиол.

Особено важен и перспективен дял от дисертацията на Флора Цветанова представлява изследването на конверсията на високо концентрирани разтвори на нишесте до 2,3-бутандиол чрез рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A. Изследвани са кинетиката на усвояване на субстрата и синтеза на диоли при култивиране в хранителни среди с концентрация на нишесте 100, 200 и 300 g/l. Проследени са концентрациите на редица други метаболите – оцетна, сукцинова и млечна киселина, етанол и ацетоин и е доказано, че щамът може да извърши едностъпална конверсия на нишесте с начална концентрация 200 g/l до 53.8 g/l 2,3-бутандиол при продължителност на процеса 90 часа.

Резултатите от всички тези експерименти са показани в информативни графики, таблици и снимков материал, което ги прави разбираеми и достъпни за приложение в практиката.

В раздел “Обсъждане на резултатите” получените научни данни са съпроводени от задълбочена и критична дискусия, подкрепена от последните разработки на водещи учени в областта. Имайки предвид сложността и мултидисциплинарността на материята, намирам за напълно целесъобразна формата на анализиране и тълкуване, представена от докторантката. Прави силно впечатление свободното боравене с материята, демонстрираната възможност за правилна интерпретация на резултатите и предпазливото формулиране на заключенията. При изложението на дисертационния труд докторантката изпъква като самостоятелен изследовател, способен да поставя експериментални постановки и да провежда независими научни изследвания.

### **3. Основни научни и научно-приложни приноси**

На базата на получените резултати са оформени два приноса. Първият, свързан със създаване на първа успешна биотехнология за директно получаване на 2,3-бутандиол от нишесте чрез рекомбинантен щам отнасям към научно-приложен, а вторият е научен – постигане на хетероложна експресия на  $\alpha$ -амилаза от рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A.

### **4. Описание и оценка на представените материали**

Резултати от дисертацията на Флора Цветанова са публикувани в две научни публикации, в които докторантката е първи автор. Общият импакт фактор на публикациите е 3,337. Част от резултатите са представени и на научна конференция.

#### **5. Отражение на научните публикации на кандидата в българската и чуждестранна литература.**

За краткото време след публикуването си, научните публикации са цитирани четири пъти от други автори, което е отличен атестат за оригиналния характер на проведеното изследване.

#### **6. Критични бележки и препоръки към научните трудове на кандидата**

Към дисертационния труд имам следната забележка: 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.

Запозната съм с автореферата и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и приносите на дисертацията.

#### **7. Лични впечатления на рецензента за кандидата**

От съвместната ни работа по научно-изследователски проект познавам Флора Цветанова като интелигентен, аналитичен и отдаден на работата си млад изследовател.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Докторантката Флора Венциславова Цветанова изпълнява напълно критериите на ЗРАСРБ, Правилника за прилагането му и Правилника на ИИХ за придобиване на научни степени.

Въз основа на направения анализ давам положителна оценка на разработения дисертационен труд и считам за основателно да предложа Флора Венциславова Цветанова да придобие образователната и научна степен „Доктор“ по специалност 02.10.09. “Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология”.

16.05.2016 г.

Рецензент



Доц. д-р Величка Гочева Гочева