



РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен
"доктор"

Автор на дисертационния труд: Флора Венциславова Цветанова

Тема на дисертационния труд: "Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте чрез
рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A"

Рецензент: проф. д-р Драгомир Симеонов Янков

Флора Венциславова Цветанова завършва висшето си образование в ХТМУ през 2010 г с придобита степен магистър със специалност „Биотехнологии“. От 2010 до 2012 г. работи като химик в лаборатория „Химични и биохимични реактори“ на ИИХ-БАН, а от 2012 заема длъжност асистент. На 01.02.2013 г. Флора Цветанова е зачислена като редовен докторант в ИИХ. Научните интереси на асистент Цветанова са в областта на микробиологията и биотехнологията. Тя е автор и съавтор на 7 публикации, 3 от които в списания с ИФ, 2 в списания без ИФ и 2 са в пълен текст в материали от конференции. Гл. асистент Цветанова е участвала в 3 научно-изследователски проекта, финансирани от ФНИ. През 2013 г. ас. Цветанова е удостоена с награда за най-добра работа на млад български микробиолог.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд на докторант Цветанова е написан на 103 страници. Съдържа 20 фигури и 9 таблици. Цитирани са 162 литературни източници.

Дисертационният труд е посветен на изследване на възможностите за получаване по ферментационен път на 2,3-бутандиол от нишесте с помощта на генетично модифициран щам-продуцент. Като изходен щам е използван *Klebsiella pneumoniae* G31, който не е способен да усвоява нишесте като субстрат. За изолиране на ген, носещ амилазна активност е използвана култура от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G. С помощта на подходящи търговски китове, най-напред е отделена тоталната ДНК от щама, след което е изолирана плазмидна ДНК. Посредством PCR техника и подходящи праймери е амплифициран генът *amyL*, отговарящ за продукцията на α -амилаза. Следващите стъпки са пречистване, клониране, рестрициране и повторно клониране на *amyL*. Получените плаزمиди са мултиплицирани с помощта на щам-гостоприемник *E. coli* DH5 α , след което

щамът *Klebsiella pneumoniae* G31 се трансформира с помощта на вектора pCRamyIBL.

Генът *amyI* е секвениран и е определена нуклеотидната му последователност, определена е предполагаемата белтъчна структура и нуклеотидната последователност е депозирана в базата данни на NCBI GenBank.

Подробно е изследвано влиянието на различни компоненти на хранителната среда върху продукцията на 2,3-бутандиол от дивия щам с основен въглероден източник глюкоза и е определена най-подходящата среда за постигане на максимален добив. Изследвани са също така активността и формирането на продуктите от родителския и рекомбинантния щам при ферментацията на нишесте. И двата щам се развиват върху субстрат нишесте, но изходния щам не произвежда целевия продукт поради липса на амилазна активност.

Изследвано е влиянието на различни добавки IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид), калциеви йони, глицин върху продукцията на 2,3-бутандиол, като са определени оптималните концентрации за всеки компонент.

Накрая е изследвано влиянието на началната концентрация на нишесте върху количеството на получения 2,3-бутандиол. Установено е, че рекомбинантния щам може да метаболизира високи концентрации на субстрат (до 300 г/л) с получаването на около 60 г/л диоли, основно 2,3-бутандиол.

Търсенето на нови, по-ефективни методи за осъществяване на добре познати процеси за получаване на ценни биопродукти с използване на нови субстрати или продуценти е в основата на изследванията в биотехнологията през последните години. От тази гледна точка темата на дисертационния труд е новаторска и актуална.

В резултат на изследванията в дисертационния труд е разработена схема за директно получаване на 2,3-бутандиол от нишесте с помощта на генно-модифициран щам на *Klebsiella pneumoniae*. Представеният автореферат (44 стр., 14 фигури и 7 таблици) по съдържание напълно съответства на резултатите в дисертационния труд.

Дисертационният труд е структуриран както следва: въведение – 2 стр., литературен обзор – 40 стр., обобщение на литературния обзор – 3 стр., цел и

задачи – 1 стр., материали и методи – 10 стр., резултати – 25 стр., обсъждане на резултатите – 6 стр., изводи и приноси - по 1 стр. и списък на използваната литература – 11 стр.

Във въведението накратко е разгледана историята на получаването на 2,3-бутандиол, различните способи за синтезирането му, като е обърнато специално внимание на последните изследвания върху ферментационното му получаване.

В литературния обзор подробно се коментират физичните свойства на 2,3-бутандиола, значението и приложението му, както и различните стереоизомерни форми. Разгледани са различните микроорганизми продуценти на 2,3-бутандиол, както естествени такива, така и генно-модифицирани. Специално внимание е отделено и на различните субстрати, които могат да се усвояват от тези микроорганизми. Даден е метаболитният път на получаване на целевия продукт, а също така и механизмите на образуване на различните стереоизомери. Разгледани са и най-важните фактори, влияещи върху получаването на 2,3-бутандиол – състав и киселинност на средата, температура и количество на разтворения кислород. Разгледани са и основните амилолитични ензими, участващи в хидролизата на нишестето. Според мен би било добре в литературния обзор да се даде кратко описание на техниките за изолиране и пречистване на ДНК, на PCR метода и на 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.

Въпреки това, литературният обзор е достатъчно обширен (40 стр.) и доказва, че дисертантът е много добре запознат с проблема и най новите изследвания в областта. Измежду цитирани 162 литературни източници 48 (почти 1/3) са публикувани след 2005 г., а 20 след 2010 г.

Въз основа на направените изводи от литературния обзор дисертантът си е поставил за цел:

Създаване на биотехнология за директно превръщане на сурово нишесте в 2,3-бутандиол чрез ферментация.

За постигането на тази цел са очертани пет задачи, които са:

- избор на щам-продуцент на 2,3-бутандиол;
- намиране на оптималните условия за получаването на 2,3-бутандиол от глюкоза;
- клониране и хетероложна експресия на ген за екстрацелуларна α -амилаза;
- оптимизиране на условията за максимална експресия на гена;
- метаболизиране на високо-концентрирани разтвори на нишесте за максимален добив на 2,3-бутандиол.

В съгласие с така поставените цели, глава “Резултати” може да се раздели условно на три части.

Първата част е посветена на изследване на получаването на 2,3-бутандиол от субстрат глюкоза с помощта на родителския щам *Klebsiella pneumoniae* G31.

Изследвани са общо 9 хранителни среди с различен състав. Три от тях (M3, M4 и M7) са взети от литературата, като най-подходящи за щама, а останалите са различни комбинации от тях. Показано е, че най-висок добив на 2,3-бутандиол се постига при среда M7 и нейните варианти M7c и M7d (около 30 г/л), като най-висока степен на превръщане е постигната на среда M7d. Не е установена значителна разлика в концентрациите на другите продукти на ферментационния процес – етанол, млечна и оцетна киселини.

Във втората част е посветена на генетичното манипулиране на дивия щам. Най-напред е клониран генът *amyL* от *Bacillus licheniformis* 44 MB82/G, отговорен за продуцирането на α -амилаза. Направеният секвенционен анализ е установил, че генът съдържа 1539 двойки бази и е запазена типичната за амилази доменна структура. Определени са вида и позициите на аминокиселинните остатъци формиращи активният център на ензима. С цел избор на вектор, осигуряващ експресията на гена е изследвана резистентността на щама *Klebsiella pneumoniae* G31 към различни антибиотици. Установено е, че щамът е резистентен към ампицилин (до 200 мг/мл), тетрациклин (до 50 мг/мл) и еритромицин (до 45 мг/мл). Щамът *Klebsiella pneumoniae* G31 е чувствителен към хлорамфеникол в

концентрации над 50 мг/мл и силно чувствителен към канамицин, поради което този антибиотик е използван като селективен маркер. В резултат на горните изследвания е подбран вектор pCR2.1-TOPO. Полученият конструкт е рестрициран и пречистен с гел-електрофореза, а фрагментът съдържащ *amyL* е клониран в избрания вектор. С получения вектор pCR α myBL е извършена трансформация на *E. coli* DH5 α . От получените трансформанти на *E. coli* е изолирана плазмидна ДНК, след което е извършена трансформация на *Klebsiella pneumoniae* G31. Получените рекомбинантни клетки са посети в петри на твърда среда, съдържаща нишесте и е подбран рекомбинантния щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A, който показва най-голяма активност при разграждането на нишесте. В серия от периодични ферментационни процеси е изследвана амилазната активност и формирането на продуктите от дивия и рекомбинантния щам. Родителският щам се развива върху среда с нишесте, но не формира 2,3-бутандиол, докато рекомбинантният е способен да усвои 35 г/л нишесте за 48 часа, като продуцира около 7 г/л целеви продукт. Освен целевия продукт рекомбинантният щам продуцира в забележими количества янтарна и оцетна киселини, както и етанол. Като следваща стъпка е изследвано влиянието на някои добавки към ферментационната среда върху продукцията на 2,3-бутаниол. Изследвани са по 3 концентрации на изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) и калциеви йони и 5 концентрации на глицин. Установено е, че повишаването на концентрацията на IPTG оказва положително влияние върху хидролизата на нишестето, поради увеличаване на експресията на гена *amyI*, но концентрации на 1 mM не оказват влияние върху получаването на продукта. Влиянието на концентрацията на Ca²⁺ йони е противоречиво. От една страна повишаването на тяхната концентрация води до повишаване на амилазната активност, но от друга страна до намаляване на количеството на получените продукти. Това е обяснено с натрупването в средата на олигозахариди DP3-DP5, които не могат да бъдат метаболизирани. Трябва да се отбележи, че изследваният концентрационен диапазон (3-55 ppm) не е много удачно избран, тъй като от литературата е известно, че за стабилизиране и активиране на различните амилази са необходими от 10 до 70 ppm. С това могат да се обяснят част от получените резултати. Това обаче е без значение поради факта посочен по-горе,

че повишаването на амилазната активност води до намаляване на крайните продукти. С цел увеличаване на пропускливостта на клетъчната стена е добавян глицин в концентрации $0,1 \pm 0,7\%$, като е следена амилазната активност и количеството на продукт. Установено е, че оптималната концентрация е $0,5\%$.

Третата част е посветена на изследване на възможностите на рекомбинантния щам да метаболизира високи концентрации на нишесте - от 100 до 300 г/л. Експериментите са извършени при намерените вече оптимални условия. Показано е, че най висок добив на диоли по отношение на началната концентрация на нишесте се достига при 200 г/л (0,305 г/г), а количеството на получените диоли е почти еднакво при 200 и 300 г/л – по около 61 г/л. По мое мнение експериментите са прекратени преждевременно, защото от фиг. 17 и 19 е видно, че концентрацията на 2,3-бутандиол продължава да се покачва дълго време след изчерпването на субстрата. Очевидно във ферментационната среда има натрупани захариди, които могат да бъдат превърнати в краен продукт. Интересно би било да се изследва и концентрация от 400 г/л, защото е известно, че амилазите могат да разграждат нишесте с такава концентрация с достатъчно висока скорост.

Получените в дисертационния труд резултати могат да се отнесат към категорията нови резултати, обогатяващи съвременен метод за получаване на ценен биопродукт с широко приложение..

Резултатите от дисертационния труд са публикувани както следва: една статия в международно списание – *Applied Microbiology and Biotechnology* с ИФ-3.34 , като до момента са забелязани 4 цитата.; една в международно списание без ИФ – *Journal of International Scientific Publications – Ecology and Safety*. Резултати от дисертационния труд са представени и на една международна конференция.

Основните приноси на дисертационния труд:

- Разработени е биотехнологична схема за директно получаване на 2,3-бутандиол от нишесте.;

- За първи път е постигната хетероложна експресия на α -амилаза, с цел получаване на 2,3-бутандиол.

В дисертационния труд са представени резултати от много голяма по обем експериментална работа, която е много добре планирана, изпълнена и удачно коментирана. Овладени са и са използвани техники за генетична манипулация на микроорганизми, които до сега не са използвани в ИИХ. Не трябва да се подминава и факта, че експериментите за отделяне на ДНК, пречистването ѝ, клонирането и останалите генетични манипулации са с голяма продължителност. В оформянето на дисертацията има сравнително малко правописни, граматични и стилистични грешки, както и терминологични неточности. Добро впечатление прави стегнатия стил на писане, както и ясно дефинираните важност, значение и приложение на изследвания процес.

Към представения ми дисертационен труд имам следните забележки, препоръки и въпроси:

- Навсякъде в работата се използва названието сукцинова киселина. Утвърденото тривиално име в българската химическа литература е янтарна киселина, солите ѝ са сукцинати, а официалното наименование според класификацията на IUPAC е бутандиова киселина.
- В литературния обзор е отбелязана двойната роля на разтворения кислород във ферментационната среда. Поради какви причини е решено да не се изследва влиянието му?
- Защо не са представени данни за плазмидната стабилност на рекомбинантния щам? Има ли данни за генерирането и размножаването на P^- клетки?
- Добре би било стереоизомерите на стр. 11 да са наименовани съгласно препоръките на IUPAC в R,S системата.
- На стр. 62 поради печатна грешка не е ясно за коя таблица става въпрос – вероятно за табл. 5.
- На стр. 87 погрешно е цитирана фиг. 18. Става въпрос за фиг. 20.
- Не е представен списък на публикациите по дисертацията. Той е наличен само в автореферата.

Направените забележки в никакъв случай не намаляват много доброто ми впечатление от дисертационния труд.

Личните ми наблюдения върху работата на асистент Флора Цветанова датират от 2010 г. когато тя изработваше в ИИХ дипломната си работа за степента магистър. Още тогава Флора Цветанова правеше впечатление със сериозната и прецизна работа и с мотивацията да се развива като изследовател. Не се съмнявам, че основната част от приносите на труда са лично дело на дисертанта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Изложеното дотук ми дава основание да твърдя, че представените резултати, по обем и качество, отговарят напълно на изискванията на Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в БАН, Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за приложение на ЗРАСРБ и да препоръчам на уважаемото жури да присъди на Флора Венциславова Цветанова образователната и научна степен "доктор" по научната специалност „Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология“, професионално направление 4.2 Химически науки.

София
30.05.2016 г.

Изготвил:


/проф., д-р Драгомир Янков/