

## СТАНОВИЩЕ

Относно защита на дисертационен труд: „Получаване на 2,3-бутандиол от нишесте чрез рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G-31A”.

За придобиване на научна и образователна степен „Доктор”.

По специалност „Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология” с шифър 02.10.09.

С кандидат: **Флора Венциславова Цветанова**

Научен ръководител: проф. д-р Калоян Кирилов Петров, Институт по инженерна химия - БАН

Изготвил становището: проф. д-р Калоян Кирилов Петров, Институт по инженерна химия - БАН

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

Темата на дисертационния труд е избрана именно поради актуалността на разглеждания проблем. Все по-широкото приложение на 2,3-бутандиола (2,3-БД) в различните индустрии обуславя и нарастващия интерес към методите за неговото получаване. Само през периода на докторантурата са публикувани около 200 научни труда, чиито обект на изследване е именно получаването на 2,3-БД. Разработват се както нови технологии, целящи конвертиране на все по-евтини субстрати, така и нови, хибридни организми, допълващи качествата на естествените продуценти.

Поради това, че досега опитите за получаване на 2,3-БД от нишесте в едностъпален процес са завършвали безуспешно или с частичен успех, усилията ни бяха насочени към създаването на рекомбинантен щам – свръхпродуцент на 2,3-БД, притежаващ силни амилолитични свойства.

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

Дисертацията е с обем от 103 страници, съдържа 20 фигури и 9 таблици. Цитираните в нея източници са 150 на брой. Цел на дисертацията е получаването на 2,3-БД от нишесте в едностъпален процес на едновременно втечняване, хидролиза и ферментация. За целта в плазмид е клониран ген за екстрацелуларна  $\alpha$ -амилаза от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G. Ензимът е избран поради изключително силната му активност в естествения му гостоприемник. С така полученият конструкт е трансформиран свръхпродуцентът на 2,3-БД, *K. pneumoniae* G31. Полученият рекомбинантен щам е наречен *K. pneumoniae* G31-A и е способен при оптимизирани условия да хидролизира напълно до 300 г/л нишесте. Максималната получена концентрация 2,3-БД, използвайки нишесте като единствен въглероден източник е 53.8 г/л.

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

Досега не е известен естествен организъм, способен да конвертира нишесте директно да 2,3-БД. Така например, известни са щамове на вида *B. licheniformis*, способни да продуцират 2,3-БД в големи количества. Известни са и щамове на

този вид, притежаващи силни амилолитични способности. Ако беше известен див щам, притежаващ и двете качества, тогава наистина, приложният принос на настоящия труд щеше да е несъществен. Поне до момента, обаче, такъв организъм не е известен.

Научните приноси са безспорни – за първи път е постигната хетероложна експресия на  $\alpha$ -амилаза за получаване на 2,3-БД. Постигната е максимална концентрация от 53.8 г/л, 14 пъти повече от единственото постигнато до момента – 3.8 г/л, чрез хомоложна експресия на ген от един щам *K. pneumoniae* в друг.

Като принос може да се отбележи и детайлното изследване на влиянието на различните компоненти на хранителната среда върху амилазната активност и продуцирането на 2,3-БД от рекомбинантния щам. Качествено и количествено е определено влиянието на различни видове соли, кофактори, индуктори на гена *amyL* и др.

Обобщавайки, може да се каже, че с представения труд се отваря една нова възможност – за промишленото получаване на 2,3-БД на базата на нишесте и нишестени материали. Дали описаният процес на директна конверсия на нишесте до 2,3-БД, използвайки щам *K. pneumoniae* G31-А ще бъде икономически изгоден, разбира се, е рано да се твърди. Предстоят да бъдат оптимизирани много от технологичните параметри на процеса, да се провери в каква степен хибридният организъм запазва качествата си в условия без селективен натиск, както и да се направи мащабен преход в по-големи обеми. Тези проблеми, обаче, не биха могли да се разрешат в рамките на една дисертация.

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

Представените в дисертацията резултати са публикувани в две международни списания, от които едното е с ИФ. Представен е и постер на конференцията с международно участие „15<sup>th</sup> International Symposium Ecology & Safety” през 2013 г.

Оптимизирането на хранителната среда с цел максимален добив на 2,3-БД от глюкоза е публикувано в *Journal of International Scientific Publications: Ecology and Safety*. Клонирането на гена *amyL*, трансформацията на щам *K. pneumoniae* G31, оптимизирането на експресията на клонирания ген, както и процесите на метаболизиране на нишесте в 2,3-БД от рекомбинантния щам *K. pneumoniae* G31-А са публикувани в *Applied Microbiology and Biotechnology* (ИФ 3,337). С последната статия, докторант Флора Цветанова спечели и наградата „За най-добра научна работа на млад български микробиолог” на фондация „Стефан Ангелов” за 2013 г.

Във всички представени материали докторантът Флора Цветанова е първи автор, с което, съгласно критериите в Правилника на ИИХ-БАН, са изпълнени всички изисквания за придобиване на научната и образователна степен „Доктор”.

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

До момента (25.05.2016) по публикации, включени в дисертацията са забелязани 5 цитирания (без самоцитати).

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

Въпреки, че обемът на дисертационния труд не е критерий за качество, описанието на резултатите, както и тяхното обсъждане са предадени изключително стенографично. Резултатите са описани в 25 страници, а тяхното обсъждане – в едва 6, което не кореспондира с обема на извършената работа. Липсват множество подробности и детайли, с които обикновено една докторска дисертация, предвид нейния образователен характер, изобилства. Броят на представените фигури и таблици, също би могъл да се увеличи значително. Все пак, считам, че представения материал е оригинален, лесен за четене и добре представя качеството на направените изследвания.

Относно представените по дисертацията публикации, мога да кажа, че ги считам за недвусмислен успех. Така например, основната публикация по дисертационния труд (статията в Applied Microbiology and Biotechnology) беше приета за печат само 9 дни след нейното изпращане, по лично решение на главния редактор на списанието.

### **Лични впечатления за кандидата.**

С Флора Цветанова работя от началото на 2012 г. Като докторант, при изпълнение на образователната програма, тя успешно завърши три специализирани курса за повишаване на квалификацията (един от които в Мадрид, след тримесечна специализация по програма Еразъм), курс по английски език и курс по компютърни умения. Изпитът по научна специалност (Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология) за докторантски минимум, положи с отличие. В изпълнение на научната програма, докторантката показва висока работоспособност, добросъвестност и професионализъм, овладявайки нови за нея методи и техники от областите на микробиологията, молекулярната биология и аналитичната химия. Общият брой, получени от докторанта кредити (334), също значително надхвърля изискуемия.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представения дисертационен труд разглежда актуален научен проблем от сферата на биотехнологиите, за чието решение са приложени комплексни знания от множество области. Считам, че представените резултати имат съществен, както научен, така и приложен принос. Основната част от тях са публикувани в едно от водещите в областта международни списания, което гарантира широката им достъпност до световната научна общност, чиито отзвук вече е налице.

Имайки в предвид, че докторанта Флора Цветанова има основен и изключителен принос за постигането на тези резултати, считам, че тя напълно заслужава присъждането на образователната и научна степен „Доктор”.

25.05.2016 г.

София

Изготвил становището:

  
/проф. д-р Калоян Петров/