

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури, сформирано със заповед РД № 15-365/19.12.2018 на директора на ИИХ- БАН за получаване на научна степен “ДОКТОР НА НАУКИТЕ” по Професионално направление 4.2. Химически науки.

Автор на дисертационния труд: проф. д-р Калоян Кирилов Петров

Тема на дисертационния труд: Биотехнологично получаване на нискомолекулни продукти

Рецензент: проф. Искра Витанова Иванова дбн

1. Данни за дисертанта

Проф. д-р Калоян Кирилов Петров е завършил висшето си образование в Техническия университет – София, през 1994 година. Работи в Института по инженерна химия – БАН от 2002 година като технолог-инженер, научен сътрудник (трета-първа степен). От 2011 година е доцент, а от 2014 година и понастоящем е професор и ръководител на лаборатория „Химични биохимични реактори”. През 2005 година защитава докторат в “Института по инженерна химия – БАН на тема: „Получаване на млечна киселина от *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, имобилизиран в полиакриламиден гел“.

Специализирал е Южна Африка, Университет в Стеленбош, Департамент по микробиология. Проф. Петров е учен с несъмнени качества базиращи се на добри наукометрични показатели, като публикации (57), цитируемост (570 цитати), глави от книги, патенти и т.н. Ръководил е на национални и участник в международни научно-изследователски проекти, а в резултат от активното му участие във втората и третата степен на обучение на студентите, под негово ръководство има защитени две докторски тези и две магистърски дипломни работи.

2. Актуалност на дисертационната тема

В голямата си част, съединенията с най-широко приложение в промишлеността са нискомолекулни C2 – C6 съединения, притежаващи двойна връзка или поне една функционална група. Това обуславя тяхното разнообразно използване като горива, структурни елементи, реагенти или прекурсори за получаването на други химикали. В момента обаче, почти всички C2 – C6 съединения, имащи жизненоважно значение за световната икономика, се произвеждат като нефтопродукти. Биологичните методи на получаване (в т.ч. и микробното получаване) се реализират в индустрията само в отделни случаи, там където химичните методи са скъпи или трудно приложими. Ето защо разработването на стратегии за получаването на съединенията (2,3-бутандиол, 1,3-пропандиол, млечна киселина, етанол и фруктоза) от атрактивни и възобновяеми източници в едностъпални и високоефективни микробни процеси, позволяващи реализацията им в производствен мащаб е наложително. Микробното получаване на тези съединения от три вида субстрат – глицерол, нишесте и инулин представлява значителен интерес. Интересът към конверсията на тези трисубстрата е обусловен това, че са сравнително евтини и едни от най- широко достъпните възобновяеми източници на въглерод. За усвояването на тези субстрати се използва особеностите на метаболизма на различни естествени и генетично модифицирани организми, предимно бактерии. Дисертационният труд на проф. Петров разработва именно тези, все още

нерешени въпроси, което дава убедително основание, избраната тематика да бъде определена като актуална.

3. Общо представяне на дисертацията и оценка на нейната структура

Дисертационният труд е конструиран изцяло според изискванията за трудове от подобен характер в оптимално съотношение на техния обем, изводи и справка за приносите, списък на публикациите по дисертацията, използвани съкращения. Общият обем на дисертацията е 373 страници, резултатите са подкрепени от 126 фигури и 32 таблици. Библиографската справка включва 705 заглавия.

През последното десетилетие се наблюдава бурно развитие на биотехнологията, методите за контрол на биопроцесите и метаболитното инженерство. Представените в настоящият труд данни се отнасят до прилагането на нови методи и техники за получаване на млечна киселина (МК), 2,3-бутандиол (2,3- БД) и 1,3-пропандиол (1,3- ПД) от алтернативни, възобновяеми субстрати – нишесте, инулин и глицерол. Поради тази причина, в литературният обзор, на тези три съединения са посветени отделни глави. **Литературният обзор** е балансиран като обем и като съдържание и показва много добро познаване на публикуваната информация, свързана с темата на дисертацията. Авторът последователно дава основните характеристики за получаване, естествени продуценти, метаболитни пътища на млечната киселина, 1,3-пропандиол, 2,3-бутандиол. Голямото количество информация е добре систематизирано, обобщено и онагледено с тридесет и една подходящи фигури и седем таблици. Представянето на разглежданите данни е ясно, направено е професионално и включва всички основни постановки, които са необходими за обосноваване и разбиране на извършените изследвания. Много добрият стил на изложение прави прочита на обзора, както и останалите части на дисертацията, лек и увлекателен.

На база на подробната обзорна част е формулирана **целта** на дисертационния труд – създаване на нови биотехнологични процеси за микробно получаване на нискомолекулни съединения с широко приложение (горива и химикали) от възобновяеми субстрати. Конкретното изпълнение на тази цел е свързано с разработването на процеси за микробно получаване на пет C2 – C6 съединения с широко приложение - 2,3-бутандиол, 1,3-пропандиол, млечна киселина, фруктоза и етанол. За получаването им са избрани три от най-атрактивните към момента възобновяеми източника на въглерод - глицерол, нишесте и инулин. Формулирани са и шест основни задачи с по няколко подзадачи, а именно: получаване на 2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол от глицерол; получаване на 2,3-бутандиол от нишесте; получаване на млечна киселина от нишесте получаване на етанол от нишесте; получаване на млечна киселина от инулин; получаване на фруктоза от инулин. Ясно се очертава периметъра на проведените изследвания. За решаването на поставените задачи са използвани удачно избрани експериментални техники. В зависимост от настоящето състояние на изследванията са поставени конкретни задачи за изпълнение, от друга страна методите и техниките, които трябва да бъдат приложени, са строго специфични за различните процеси.

Следващият раздел на дисертацията представлява подробно описание на всички използвани **материали и методи**. Представянето на експерименталните процедури съдържа достатъчно информация, необходима за оценка на проведените експерименти. Представени са микроорганизмите използвани в настоящата разработка. Това са естествени изолати и генетично модифицирани щамове: *Lactococcus lactis* B, *Klebsiella pneumoniae* G9, *Klebsiella pneumoniae* G31, *Klebsiella pneumoniae* G46, *Lactobacillus plantarum* Bom 816, *Lactobacillus pentosus* N3, *Lactobacillus paracasei* B41, *Bacillus licheniformis* 44 MB82, *Zymomonas mobilis* DSM 424, *Pediococcus acidilactici* PD384.

Rhizopus arrhizus, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus chinensis* и др. Достатъчно подробно са описани средите и условия на култивиране на микроорганизмите използвани в настоящата разработка при получаване на 2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол от глицерол; получаване на 2,3-бутандиол от нишесте; получаване на млечна киселина от нишесте получаване на етанол от нишесте; получаване на млечна киселина от инулин; получаване на фруктоза от инулин. Молекулно биологичните методи ключват изолиране на хромозомна, тотална и плазмидна ДНК, PCR анализи, PCR амплификация с видово-специфични праймери, 16S рДНК амплификация и секвенционен анализ бактериална трансформация, изследване на генна експресия чрез RT PCR, както и редица аналитични методи, свързани с спецификата на разработката. Цялата методология е не само описана подробно, но също обсъдена критично.

Разделът „**Резултати и обсъждане**“ е представен удачно в няколко глави и под-раздели съобразно поставените задачи. Всеки подраздел е придружен от съдържание на проведените изследвания. Намирам този подход за много удачен, защото помага за по-лесното ориентиране в богатия доказателствен материал, съпътстващ изказаните от проф. Петров тези. Всеки раздел е придружен и от заключение, обобщаващо в по-лесна за осмисляне форма най-важните резултати от проведените изследвания. Общо в този раздел резултатите са подкрепени от 104 фигури и 22 таблици.

С помощта на различни методи автора представя получаването на 2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол от глицерол и нишесте. В резултат на тези изследвания са установени са оптималните биопроцесни параметри за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол чрез щам *Klebsiella pneumoniae* G31 и е създаден е нов метод за рН контрол, т.н. «метод на изкуствените рН флукуации», при който рН на средата циклично се променя. Установено е влиянието на Δ pH и Δ t върху метаболизма на *Klebsiella pneumoniae* G31 в процеса на конверсия на глицерола до 2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол. Общото при всички процеси с изкуствени рН флукуации е значителното увеличение на получените количества диоли (2,3-бутандиол и 1,3-пропандиол) за сметка на продуцираните количества млечна, оцетна и сукцинова киселини. Определени са оптималните рН флукуации за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол в периодичен процес с подхранване. Определени са оптималните рН флукуации за получаване на 1,3-пропандиол от глицерол в периодичен процес с подхранване: за получаване на максимална концентрация и за получаване на максимална продуктивност.

Създаването на генетично модифициран щам, притежаващ едновременно способността, както да втечнява и хидролизира грубо нишесте, така и да продуцира 2,3-БД във високи концентрации, остава една изключително перспективна възможност. За целта е нужно обаче, в продуцента на 2,3-БД да се въведе ген, кодиращ екстрацелуларен ензим със силна α -амилазна активност, способен бързо да втечнява и хидролизира грубия субстрат. За донор на такъв ген беше избран българският изолат *Bacillus licheniformis* 44 MB82/G. Конструиран е рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A, с въведен ген за α -амилаза от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G, под контрола на индуцируем промотор *Plac* и е определено оптималното количество индуктор IPTG. Са йони и глицин добавени в средата имат определено влияние върху рекомбинантният щам *Klebsiella pneumoniae* G31-A, който е способен метаболизира високо концентрирани разтвори нишесте (до 30 % р-р). Най-висока концентрация 2,3-бутандиол (53,8g/L) е постигната при метаболизирането на 200 g/L нишесте. В този процес получените добив и продуктивност са 0.3 g/g и 0.5 g/Lh. Получените концентрация и продуктивност са съответно 14 и 3 пъти по-високи от постигнатите в света до момента. Всичко това потвърждава значимостта на това изследване.

Следващата глава от резултатите е посветена на получаване на млечна киселина от нишесте, което включва изолиране и характеризиране на амилолитични млечно кисели бактерии (МКБ), установяване на капацитета на амилолитичните МКБ да конвертират нишесте директно до млечна киселина в процес на едновременно озахаряване и ферментация и установяване на оптималните процесни параметри и състав на хранителната среда за получаване на високи концентрация, добив и продуктивност на млечна киселина от нишесте. В резултат на проведената работа е изолиран и характеризиран е нов, естествен изолат *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84, способен да хидролизира нишесте директно до млечна киселина. До момента това качество не е наблюдавано при представители на вида. Изолирани и характеризирани са три нови амилолитични лактобацилни щамове – *Lactobacillus plantarum* B08 816, *Lactobacillus pentosus* N3 и *Lactobacillus paracasei* B41. До момента няма данни за амилолитични представители на видовете *L. paracasei* и *L. pentosus*. Установено е, че от трите новоизолирани щамове, единствено *L. paracasei* B41 има потенциал за промишлено приложение за получаване на млечна киселина от нишесте. От 40 g/L нишесте изолатът продуцира 26.9 g/L млечна киселина. При *L. plantarum* B08 816 и *L. pentosus* N3 максималните получените концентрации са съответно 9.5 и 5.5 g/L. От тестваните за получаване на млечна киселина от нишесте пет щамове *Rhizopus* (от видовете *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus* и *Rhizopus chinensis*), щамове от вид *R. arrhizus* и *R. oryzae* показват значително по-добра способност да хидролизират и ферментират субстрата в млечна к-на. Максималните постигнати концентрации са съответно 25.3 и 16.88 g/L. За установяване на пълния капацитет на тези изолати като продуценти на млечна киселина от нишесте са нужни допълнителни изследвания.

За директно получаване на етанол от нишесте, в *Zymomonas mobilis* DSM 424 е въведен ген за екстрацелуларна α -амилаза от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G. Генът е клониран в совалкови вектори pZT1, pZT2 и pZT3, под контрола на промоторите *Plac* (*Escherichia coli*) и *SacC* (*Zymomonas mobilis*). Трансформираните и с трите вида конструи компетентни клетки *E. coli* добиват очакваната екстрацелуларна амилазна активност. Въвеждането на конструктите в *Z. mobilis* обаче, не води до секреция на амилаза.

Интерес представлява главата посветена на получаване на млечна киселина от инулин. Проблем при получаването на млечна киселина от инулин съдържащи субстрати, е липсата на продуценти, притежаващи инулинази. До момента, поради липса на подходящ организъм, не е осъществен SSF процес за директно получаване на МК от инулин съдържащ субстрат. В резултат на разработката е осъществен е процес на директна конверсия на инулин в млечна киселина чрез едновременно озахаряване и ферментация, осъществено чрез българския изолат *Lactobacillus paracasei* B41 (DSM23505). Щамът е свръх-продуцент на млечна киселина и е способен да синтезира ензим с екзо-инулиназна и инвертазна активност.

Установени са оптималните параметри за получаване на млечна киселина от инулин съдържащо цикориево брашно чрез *Lactobacillus paracasei* B41, като са прецизирани условията за постигане на максимална инулиназна активност, включващи оптимален състав на азотните източници в хранителната среда, оптимално съдържание на Mn йони температура, рН на хранителната среда и скорост на разбъркване. Експериментално е установено позитивното влияние на мангана при експерименти *in vivo* с клетки на *L. paracasei* B41 е установено силното позитивно влияние на Mn^{2+} върху продуцирането на млечна киселина от инулин.

От изключителен интерес е установеното многостранното влияние на Mn^{2+} в цялостния процес на метаболизиране на инулина от *L. paracasei* B41 до млечна киселина, а именно алостерично въздействие върху инулиназния ензим, повишаващо

активността му, позитивно действие като кофактор на ензимите от гликолитичната верига, облекчен транспорт на фруктоза (действие върху PTS чрез фосфорилиране на HPr), инхибиращо действие върху експресията на *fosE*, чрез подпомагане на фосфорилирането на HPr и CsrA (формиращи във фосфорилирано състояние активен комплекс на *cre* сайта). Предложената тук комбинацията от щам и нов източник на инулин (цикориево брашно) напълно покриват необходимите критерии за ефективност. Щамът *Lactobacillus paracasei* B41 (DSM 23505) е свръхпродуцент на млечна киселина от глюкоза и нишесте и притежава изключително висока толерантност към киселинен шок.

Също така, щамът притежава β -фруктозидаза (EC 3.2.1.80) със силна екзоинулиназна активност, позволявайки му да конвертира инулин съдържащи субстрати директно до МК, в едностъпален процес на едновременно озахаряване и ферментация. Ето защо получените резултати представляват една перспективна алтернатива на сегашното промишлено производство.

Фруктозата се произвежда промишлено основно за нуждите на хранително-вкусовата индустрия като хранителна добавка, овкусител и подсладител (под формата на концентрирани фруктозни сиропи или кристална (чиста) фруктоза в различни храни и напитки. Интерес представлява получаването на фруктоза от инулин, тъй като инулинът е полифруктан с ниска хранителна стойност и не се усвоява от човека и животните. Получаването на фруктоза от инулин се осъществява по два метода - химичната или ензимната хидролиза. Химичната се извършва в присъствие на киселини при висока температура, докато ензимната - чрез добавяне на пречистени ензими към разтвор на субстрата. До момента, процес на микробно получаване на фруктоза от инулин не е осъществяван. Процесът на едновременно озахаряване и ферментация на инулин, изпълнен като периодичен процес с подхранване в среда безсъдържание на соли, води до ускорение на хидролизния процес и до почти пълно възпрепятстване на последващата го ферментация. В резултат, на проведените изследвания проф. Петров установява оптималните условия за получаване на фруктоза от инулин-съдържащо цикориево брашно, като процеса е периодичен с подхранване, липса на соли и микроелементи в хранителната среда, оптимален състав на азотните източници в хранителната среда при определена температура, рН и скорост на разбъркване. Авторът установява, че силната инулиназна активност при процесите в среда без метални йони се дължи на седемкратно увеличаване на нивата на експресията на инулиназнания ген.

4. Оценка на приносите

Формулирани са 23 извода, които приемам с незначителни забележки като отразяващи получените резултати в дисертационния труд. Приносите на дисертационния труд са очевидни и имат фундаментален и приложен характер. Проф. Калоян Петров е дефинирал седем приноса с оригинален научно-теоретичен характер и шест научно-приложни приноса. Поради ограничения обем на рецензията си позволявам да отбележа само някои от тях в обобщен вид:

1. При микробна ферментация на глицерол за първи път метаболитът 2,3-бутандиол е получен като основен продукт на ферментацията.
2. Получените концентрации 2,3-бутандиол са многократно по-високи от постигнатите преди това от глицерол, което принципно отваря възможността за промишлено получаване на 2,3-бутандиол от глицерол.
3. За първи път е извършена хетероложна експресия на ген за амилаза в свръхпродуцент на 2,3-бутандиол. По този начин за първи път е получен 2,3-

- бутандиол от нишесте в едностъпален SSF процес, под действието на един-единствен генетично модифициран организъм.
4. За първи път е изолиран амилолитичен шам от род *Lactococcus*, както и амилолитични шамове от видовете *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus pentosus*. Използването на тези шамове осигурява получаването на млечна киселина от нишестени материали в икономически ефективен процес на едновременно озахаряване и ферментация.
 5. Създадени са работещи в *Escherichia coli* совалкови вектори pZT1, pZT2 и pZT3, носещи ген за силна екстрацелуларна амилаза (от *Bacillus licheniformis* 44MB82/G), съответно под контрола на промоторите Plac(*Escherichia coli*) и SacC (*Zyomonas mobilis*). Трансформантите *E. coli*, с въведен който и да е от трите вида конструкт, притежават силни амилолитични способности.
 6. За първи път, като единствен въглероден източник за получаване на млечна киселина е използвано инулин-съдържащо цикориево брашно.
 7. Разкрито е ключовото влияние на Mn²⁺ върху: активността на ензимаинулиназа; експресията на гена за инулиназа; транспорта на фруктоза през клетъчната стена; ключови ензими от гликолитичния път; цялостният процес на метаболизиране на полизахарида инулин (хидролиза и ферментация).

5. Публикации, свързани с дисертацията

Авторът е представил в дисертацията списък, съдържащ 30 научни труда, свързани с дисертацията. От тях 16 са в списания с импакт фактор за съответната година, а 12 са отпечатани през последните 5 години (2013 – 2017). В единадесет от публикациите авторът на дисертационния труд е първи, а в 21 - кореспондиращ автор. (общ импакт фактор 30,161). Двадесет и пет от статиите са цитирани общо 383 пъти, основно от чужди автори в публикации, публикувани в авторитетни научни журналы, което показва значимостта на научните разработки на дисертантката и колективите, с които той е работил.

Повечето от трудовете са публикувани в престижни научни списания като *Applied Microbiology and Biotechnology*, *Food Microbiology Biotechnology & Biotechnological equipment*, „*Z. fur Naturforschung Journal of Applied Bacteriology*, *Journal of International Scientific Publications: Materials, Methods & Technology*, *Bulgarian Chemical Communication Bioresource Technology*, *Starch-Starke*, *Process Biochemistry Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* и др.

Проф Петров има два патента: „Метод за получаване на 2,3-бутандиол” - Патент № 66411 и „Метод за получаване на млечна киселина” - Патент № 65664. Ръководител е на проект „Получаване на 2,3-бутандиол чрез ферментация на отпадна биомаса от новоизолирани и рекомбинантни шамове” от 2017г. и участник в 4 проекта.

6. Въпроси

Към проф. Петров имам следния въпрос:

- Кои са основните въпроси, които трябва да бъдат решени при стартирането на ново биотехнологично производство?
- Какви методи се използват в очистката на получените продукти?

7. Оценка на автореферата

В автореферата са отразени основните резултати на дисертационната работа - резултатите от таксономичния анализ на изолираните щамове МКБ, тяхната характеристика, продуцираните бактериоцини, антимикробната им активност, възможните приложения на част от изолираните щамове МКБ. Дадени са направените изводи и заключения, приноси, списък с научните публикации и цитати, и като обем отговаря на изискванията.

8. Заключение

Направеният разбор ми дава основание да считам, че приносът на проф. д-р Калоян Петров е решаващ за разработването на представената дисертация. Искам да добавя, че проф. Петров е доказан специалист. Задълбоченото познаване на материята му е позволило да избере много интересна и актуална тема, да докаже поставената цел, да получи резултати, да оформи оригинални и потвърдителни приноси.

Дисертационният труд отговаря по обем и качество на изискванията за дисертации за придобиване на научната степен "доктор на науките". Работата представлява завършена и прецизно изпълнена разработка с убедителен научен и научно-приложен характер. Оценявайки дисертационния труд в неговата цялостност – идея, цел, задачи, теоретична и методична обезпеченост на изследването, завършеност, оформяне и представяне, бих могла убедено да кажа, че той има голяма научна и приложна стойност. Дисертационният труд показва, че проф. Петров притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения. Основните приноси на дисертационния труд са публикувани в чуждестранни и български списания, докладвани са на научни форуми у нас и в чужбина.

Дисертационният труд на тема: **Биотехнологично получаване на нискомолекулни продукти** с автор проф. д-р Калоян Кирилов Петров **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) и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ.**

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да гласува положително** за присъждане на проф. д-р Калоян Кирилов Петров научната степен "доктор на науките" по Професионално направление 4.2. Химически науки.

София,
18.02.2019 г.

Изготвил рецензията:
проф. Искра Витанова Иванова