

РЕЦЕНЗИЯ

относно защита на дисертационен труд „Биотехнологично получаване на нискомолекулни продукти“

за придобиване на научна степен „Доктор на науките“

по професионално направление 4.2. Химически науки

кандидат: проф. д-р Калоян Кирилов Петров

Рецензент: чл-кор. проф. д-тн Атанас Иванов Павлов

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси и научната дейност на дисертанта

Дисертационният труд на тема „Биотехнологично получаване на нискомолекулни продукти“, обект на настоящата процедура, е представен за защита от проф. д-р Калоян Кирилов Петров.

Проф. д-р Калоян Кирилов Петров завършва магистърска степен през 1994 г. в Техническият университет в гр. София с квалификация инженер по „Биотехника“. През 2005 г. защитава Образователна и научна степен „Доктор“ в Института по инженерна химия при БАН с тема на дисертацията „Получаване на млечна киселина от *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, имобилизиран в полиакриламиден гел“. Научната професионална кариера на проф. д-р Калоян Кирилов Петров е свързана изцяло с Института по инженерна химия при БАН, където последователно преминава през всички етапи на кариерното си развитие. Последователно заема длъжностите: „Технолог, инженер-химик“ (2002 г. – 2003 г.); „Научен сътрудник трета степен“ (2003 г. – 2006 г.); „Научен сътрудник втора степен“ (2006 г. – 2009 г.); „Научен сътрудник първа степен“ (2009 г. – 2011 г.); „Доцент“ (2011 г. – 2014 г.) и „Професор, ръководител на лаборатория „Химични и биохимични реактори“, която длъжност заема и понастоящем. През 2011 г. проф. Калоян Петров е постдокторант в Департамента по микробиология, Университет Стеленбош, Южна Африка с тема: „Изолиране и характеризиране на патогени от коне със загниване на копитата“.

Научните интереси и научната дейност на проф. Калоян Петров са свързани с приложната биотехнология - микробно получаване на метаболити с потенциално стопанско значение – полизахариди, ензими, различни нискомолекулни съединения; биопроцесорно инженерство; генетични модификации на микроорганизми. Прави впечатление, че голяма част от работите на проф. Калоян Петров са съвместни с неговата съпруга доц. д-р Пенка Петрова, от Института по микробиология при БАН, т.е. свидетели сме на развитието на „биотехнологично семейство“, от което може да очакваме значителни резултати в биотехнологичната наука през следващите няколко години.

2. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем.

Всички европейски страни, с изключение на Албания и България, имат разработени национални изследователски стратегии, които могат да се обобщят под общата тема „Био-базирана икономика 2030“, чиято цел е да подпомогне създаването на устойчива, био-базирана икономика чрез транслиране на биологични знания в промишлените производствени процеси. Две от основните направления на тези стратегии са: 1) използване на възобновяеми източници при разработването на нови биотехнологични процеси и продукти, и 2) намаляване зависимостта от изкопаемите ресурси, с цел проектиране на по-устойчиви производствени биотехнологични процеси. Именно в тези две направления са представените от проф. Петров изследвания в настоящата дисертация, който факт е показателен за навременността и актуалността на разработваните научни тези. По-конкретно, проф. Петров представя идеите си за развитието на биотехнологичните процеси от гледна точка метаболитните функции и особености на отделните микроорганизми, които биват адаптирани (оптимизирани) за специфичните изисквания на биотехнологичните производства. По мое скромно мнение това е рационалният подход за повишаване на ефективността и икономическата жизнеспособност на стопанско-значимите биопроцеси.

3. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите.

Дисертационният труд е оформен по възприетия в България класически модел, на 359 страници (Въведение – 5; Литературен обзор – 127; Цел и задачи – 3; Материали и методи – 26; Резултати и дискусия – 124; Изводи – 7; Приноси – 3; Литературни източници – 59) и включващ 126 фигури 32 таблици, 705 цитирани литературни източника. Структурата на дисертацията е балансирана, като отделните раздели позволяват на автора да изгради изложението по начин, даващ възможност за интерпретиране на получените резултати, в изпълнение на формулираната цел, във връзка с постигнатото в света до момента. В конкретния случай с постигнатото в света към момента на публикуването на представените резултати.

Литературният обзор е логично структуриран. Проф. Петров представя своето виждане за „Биорафинерия“ и основните приложения на биопродуктите, като при последното са разгледани само продуктите с С2 до С6. Информацията, представена в следващия раздел „1.3. Нискомолекулни съединения, обект на интерес“ би могла да се представи доста по-лаконично, доколкото е добре известна и обект на образователната литература. Следващата информация, представена в литературния обзор е тясно свързана с обектите на изследване в настоящата дисертация – млечната киселина, 1,3 – пропандиолът и 2,3-бутандиолът. Данните са представени в достатъчен обем и аналитично. Това позволява да се направи коректна оценка на състоянието на проблема и да се интерпретират след това получените данни от представените в настоящата дисертация изследвания. Литературният обзор завършва с изводи, които макар и валидни до момента на публикуване на описаните в труда резултати, дават възможност за коректно и логично извеждане на основната цел на представената дисертация.

Като недостатък на тази част на дисертацията може да се посочи ограничената актуалност на анализирания информация. Като цяло приемам обяснението на проф. Петров за по-старите

данни, представени в Литературния обзор, но това направление в биотехнологията се развива бурно през последните 10 години и така не може да се оцени реалният принос на представените изследвания.

Целта и задачите на дисертационния труд са правилно формулирани и логично структурирани.

Разделът „Материали и методи“ е структуриран добре. Биологичните обекти, условията за провеждане на експериментите и апаратурата са описани в детайли и по начин, позволяващ тяхното повторение.

Критичните ми бележки към този раздел са свързани с липсата на текст, представящ статистическата работа. Когато говорим за биопроцесорно инженерство това е задължително!

Резултатите от експерименталната работа в частта „Резултати и дискусия“ правилно са представени в три раздела – получаване на продукти на база глицерол; получаване на продукти на база нишесте и получаване на продукти на база инулин.

Първата група изследвания, представени от проф. Петров, са свързани с получаването на 2,3-бутандиол на база глицерол. Изследванията следват класическата биотехнологична схема, а именно 1) избор на шам-продуцент – изолиран е шам *Klebsiella pneumonia*, притежаващ необходимата толерантност към глицерол, както и шамова специфичност за биосинтез на 2,3-бутандиол; 2) Оптимизация на хранителната среда – установено е, че отсъствието на кобалтови йони води до по-високи добиви от 2,3-бутандиол; 3) оптимизация на условията на култивиране - доказано е, че при интензивно аериране метаболизмът на избрания шам се насочва към биосинтез на 2,3-бутандиол. Специално трябва да се отбележи находчивото разработване на култивационни алгоритми, базирани на периодични насочени флуктоации на активната киселинност на средата, което резултира в значително подобряване на добива на целевия метаболит.

Към тази част от изследванията възникват следните въпроси и бележки:

1. Навсякъде дисертантът пише „до момента“. В предвид бележките, направени в предишните части на дисертацията за кой „момент“ става въпрос?
2. На много места се бъркат понятията „изолат“ и „шам“. Например стр. 175 „Изолирани са 58 щама, усвояващи..... От тях са селектирани изолатите...“ ?!
3. 4.1.1.2. Оптимизация на хранителната среда – по същество не е провеждана оптимизация на хранителната среда, а е изследвано само влиянието на кобалтовите йони върху метаболизма на избрания продуцент.
4. При оптимизирането на условията на култивиране за получаване на 2,3-бутандиол на база глицерол общо взето всички най-добри резултати са на граничните стойности на изследваните независими променливи. Защо не сте отворили експерименталния дизайн до дефиниране на оптималните значения на изследваните независими променливи?
5. Стр. 190 – какво следва да се разбира под термина „фина саморегулация“?
6. 4.1.1.5. Аеробна ферментация на глицерол, стр. 191 – считам понятието „по-аеробни условия“ за некоректно, защото възниква въпроса, а какви биха били „най-аеробните

условия“ за получаването на 2,3-бутандиол. Коректно е да се използват точно определени стойности на аерацията.

7. При изследване на аеробното получаване на 2,3-бутандиол имате ли данни за концентрацията на разтворения кислород и нейните промени по време на култивационния процес? Не мислите ли, че би било целесъобразно нивото на разтворения кислород да се контролира посредством дебита на входящия въздух и скоростта на разбъркване паралелно? Каква е вашата гледна точка по въпроса?

В този раздел от частта „Резултати и дискусия“ са представени и изследванията, свързани с получаването на 1,3 – пропандиол на база глицерол. Основен акцент е разработеният подход, базиран на насочени контролирани флуктоации на активната киселинност на средата по време на култивационния процес. Установено е, че при тези условия на култивиране, метаболизмът на щам-продуцента се пренасочва от продуциране на етанол и органични киселини към биосинтез на диоли; увеличава се значително продуктивността, докато крайната концентрация на получавания 1,3-пропандиол се повлиява в по-ниска степен. Тук отново възниква въпрос относно оптималните значения на изследваната независима променлива – най-добър резултат е получен при $\Delta pH=1$. Това ли е оптималната стойност? Защо не е направен експеримент при по-ниска стойност на независимата променлива?

„Резултати и дискусия“ продължава с представяне на експерименталните резултати, свързани с получаването на 2,3-бутандиол, млечна киселина и етанол на база нишесте.

2,3 – бутандиол. Описана е успешна генетична модификация на *Klebsiella pneumonia* G31, резултирало в получаването на щам *Klebsiella pneumonia* G31-A – щам способен да конвертира нишестето в 2,3-бутандиол едностъпално, при което се постигат многократно по-високи добиви, както и висока продуктивност. По мое мнение тази генетична работа показва, че групата на проф. Петров притежава необходимия опит за разработване в бъдеще на актуалната в момента тема за генетичното редактиране и получаването на нови „платформени“ щамове, които да се развият като технологични матрици за бъдещи био-базирани технологии.

Изолиран от пшенична боза, идентифициран и охарактеризиран е щам *Lactobacillus paracasei* B41, който към момента на изследванията показва най-добри биосинтетични характеристики в сравнение с докладваните в научната литература.

Млечна киселина. Представени са резултатите относно способността да хидролизират нишесте с успореден биосинтез на млечна киселина на изолирани амилолитични млечнокисели бактерии от брашна теста и боза. Тествани са и пет вида от род *Rhizopus* (*Rh. arrhizus*, *Rh. oryza*, *Rh. delemar*, *Rh. niveus* и *Rh. chinensis*). Като стопанско перспективен е определен *Lactobacillus paracasei* B41, биосинтезиращ млечна киселина с обемен добив от 26.9 g/L.

Етавол. Въпреки екстензивната генетична работа по въвеждане на ген за синтез на външноклетъчна α -амилаза в *Zygomonas mobilis*, стопанско значими резултати не са получени.

Към тази част от изследванията възникват следните въпроси и бележки:

1. 4.2.1.2. Първоначално оптимизиране на хранителната среда – според мен в случая става въпрос за избор на хранителна среда. Не са представени изследвания по оптимизиране на състава на средите, а имперично сравняване на култивационни процеси, осъществявани с хранителни среди с различен състав.
2. 4.2.1.6.; 4.2.1.7.; 4.2.1.8. – Отново сте изследвали, чрез монофакторен експеримент, влиянието на правилно подбрани независими променливи (концентрация на индуктор, концентрация на стабилизатор и концентрация на глицин). Защо не сте предпочели многофакторен експеримент, който би ви позволил, в повече детайли, да опишете, моделирате и оптимизирате взаимните връзки на влиянието на изследваните независими променливи върху изхода на процеса в биологичната система?
3. Стр. 227 - бихте ли обяснили биологичния смисъл на използвания термин „разрехавяване на клетъчната мембрана“?

Като последна част от раздел „Резултати и дискусия“ проф. Петров представя изследванията си, свързани с използването на инулин като основен субстрат за получаване на млечна киселина и фруктоза. Направен е детайлен анализ на брашното от цикория и неговите предимства като източник на инулин. Предложената комбинация от щам, *Lactobacillus paracasei* B41 (способен едностъпално да конвертира инулина в млечна киселина с висока ефективност) и добър източник на инулин (брашно от цикория), експериментално е охарактеризирана като покриваща критериите за ефективност за стопанско приложение. Разработката отново следва класическия алгоритъм за развитието на биотехнологични процеси – избор на щам, анализ на влиянието на състава на хранителната среда върху получаваните добиви, влияние на активната киселинност. В допълнение, е изследвано и добавянето на метални йони към хранителната среда с презумцията за повишаване на ензимните активности, което стъпва на експерименти под влияние на наличието на използваните йони върху активността на пречистена инулиназа. Въпреки положителните резултати при моделните експерименти обаче, подходът не дава очакваните резултати при реален култивационен процес. Авторът обяснява получаваните резултати с експресията на *fosE* гена при условията на проведения експеримент. Подчертано, мангановите йони играят важна роля при трансформацията на инулина до млечна киселина. На база този извод проф. Петров детайлизира влиянието на мангановите йони върху биосинтеза на млечна киселина от *Lactobacillus paracasei* B41 на база инулин.

В края на дисертационния си труд проф. Петров очертава перспективите на получаването на фруктоза при култивиране на *Lactobacillus paracasei* B41 на цикориево брашно. Тази част от експерименталния план е развита на база на резултатите, получени при получаването на млечна киселина от *Lactobacillus paracasei* B41 на база инулин, а именно очерталата се възможност за получаването на високи концентрации от фруктоза при култивирането с висока начална концентрация на субстрата и в отсъствие на двувалентни метални йони, при които условия експресията на *fosE* гена се повишава многократно.

Към тази част от изследванията възникват следните въпроси и бележки:

1. Според мен тази част от представения дисертационен труд е с най-висока както научна, така и практична стойност.
2. И при двата изследвани процеса са проведени множество еднофакторни оптимизации. Очевидно бихте спестили значителни ресурси и време, ако планирате многофакторна оптимизация, а от друга страна при този подход, като правило, се получават и по-добри резултати.
3. Очевидни са предимствата на предложения от вас подход за получаване на фруктоза пред широко използваните хидролизни технологии. Но през последните години интензивно се разработват процеси за получаването на фруктоза на база отпадъчни биомаси от хранителната промишленост (като интегрална част от комплексното оползотворяване на отпадъците), основно от преработката на плодове и зеленчуци. Какво е вашето мнение по отношение на тези нововъзникващи технологии? Би ли бил конкурентен предлаганият от вас подход и при какви условия. Известно е, че суровината за споменатите технологии е практически безплатна, а и се ползват субсидии за оползотворяването на отпадъците.

Представените изводи коректно и в детайли отразяват основните получени резултати от работата по дисертацията.

4. Основни научни и научно-приложни приноси

Структурата на отделните изследвания, представени в дисертацията, експерименталният дизайн, както и интерпретирането на резултатите показват изграден научен стил, което може да се постигне само след дългогодишна, задълбочена работа.

Основните приноси, произтичащи от резултатите на представените изследвания могат да се определят като обогатяване на съществуващи знания и теории и приложение на научни постижения в практиката.

Обогатяване на съществуващи знания и теории:

- Разработен е култивационен алгоритъм основан на изкуствени флуктоации на активната киселинност на средата, резултиращ в моделиране на метаболитните потоци при смесено-киселите ферментативни процеси;
- За първи път е извършена хетероложна експресия на ген за амилаза в свръхпродуцент на 2,3-бутандиол;
- 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 (*Zymomonas mobilis*);

- Дефиниран е механизъмът на въздействие на мангановите йони при ферментацията на цикоревото брашно от *Lactobacillus paracasei* B41 и получаването на млечна киселина.

Приложение на научни постижения в практиката:

- За пръв път е получен 2,3-бутандиол от глицерол като основен продукт на ферментативния процес;
- За първи път е получен 2,3-бутандиол от нишесте в едностъпален процес на едновременно озахаряване и ферментация;
- Разработен е нов биотехнологичен процес за директно получаване на млечна киселина от инулин в едностъпален процес на едновременно озахаряване и ферментация;
- Предложена е концепция за нов биотехнологичен процес за микробно получаване на фруктоза от инулин.

5. Описание и оценка на представените материали

Публикуваните материали във връзка с дисертацията са 30 броя, 15 от които са статии в списания с Импакт фактор, с общ IF над 30, което е категоричен показател за научното качество на представения труд. Специално внимание бих желал да обърна на двата патента, регистрирани от проф. Петров (“Метод за получаване на 2,3-бутандиол” и “Метод за получаване на млечна киселина”), които пък са показател, високо оценяващ приложния аспект на дисертацията. Прави впечатление липсата на представяне на резултатите на научни форуми, което е съществен недостатък, доколкото научните форуми са за представяне на резултатите на работата на учените пред тясно специализирана публика. Надявам се, че това е технически пропуск.

6. Отражение на научните публикации на кандидата в българската и чуждестранната литература

Публикуваните резултати, във връзка с дисертацията са намерили широк и достоен отзвук сред научната колегия, работеща в областта. Откритите цитати са 383, факт достоен за специално отбелязване.

7. Критични бележки и препоръки

Авторът е можел да положи малко повече усилия и да обобщи и текущото състояние (последните постижения) на дискутираните биотехнологични процеси и това да е базата за начертаване на научна стратегия за развитието на тази област на биотехнологията (на база на представените в дисертацията резултати). Това би очертало перспективите за създаването на научна школа. Всъщност това би следвало да е логичният изход от дисертациите за научна степен „Доктор на науките“.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецензираният труд отговаря по качество на изискванията за дисертация за придобиване на научна степен „Доктор на науките“.

Публикуваните материали във връзка с дисертацията надхвърлят минималните национални наукометричните изисквания и изискванията на правилниците за приложение на Закона за развитие на академичния състав в Република България. Основните резултати са публикувани в редица престижни международни издания. Налице са и два регистрирани патента. Представените резултати са намерили широк отзвук сред научната общност.

Въз основа на анализа направен до тук, давам положителна оценка на дисертационния труд и с убеденост ще гласувам „За“ присъждане на научна степен „Доктор на науките“ по професионално направление 4.2. „Химически науки“ на проф. д-р Калоян Кирилов Петров.

19. 02. 2019 г.



/чл.-кор. проф. д-р Атанас Иванов Павлов/