

РЕЦЕНЗИЯ

по защита на дисертационен труд „Биотехнологично получаване на нискомолекулни продукти“
на Калоян Кирилов Петров, проф. д-р
за придобиване на научна степен висш докторат DSc „Доктор на науките“
Рецензент Серафим Димитров Влаев, дтн, професор

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

• По биографичната справка, въз основа на документите констатирам следното:

Кандидатът е завършил магистър по инженерна биотехника с разширен курс по молекулярна биология. След завършването си през 1994 г работи първоначално за кратко като администратор, по-късно като технолог във фармацевтични фирми и институт по микробиология. Отбелязвам обстоятелството, че е работил в производствени предприятия и има административен и технологичен опит.

В ИИХ-БАН работи от 2002 г непрекъснато 18 години. Защиства успешно докторска дисертация през 2006 г и придобива образователната и научна степен "доктор" по научната специалност "Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология". Последователно участва и спечелва конкурси за доцент през 2010 г и за професор през 2014 г по същата специалност. През 2011 г изпълнява пост-докторантура по биотехника в Университет в Южна Африка. В Института по инженерна химия се ангажира с молекулярно-биологични методи, гена идентификация на организмите, микробиологичен и генетичен контрол на биопроцеси, които по-долу са **едно от основанията ми да го охарактеризирам като учен с ясно очертана тематика, в която е водещ изследовател.** Изследванията му са огласени текущо в 57 научни статии с повече от 570 цитата в областта на инженерната биотехнология, която съответства на специалността му. Осем проекта, в чиято разработка участва от 2008 г насам, засягат проблеми и решения от дисертацията.

2. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем.

Дисертационният труд спада към областта на основния био-органичен синтез, изследвания на тези процеси с оглед тяхната реализация в технически мащаби, включително чрез молекулярно-биологични методи.

Разработваният в дисертационния труд проблем включва биосинтез на нискомолекулни продукти – диоли, етанол, органична киселина – по-конкретно 2,3-бутандиол (БД), 1,3-пропандиол (ПД), етанол, 2-хидроксипропанова киселина (МК), които като производни на нисшите алкани представляват основни нискомолекулни съединения на техническия органичен синтез; Като най-актуално и иновативно приложение, от изследваните диоли, етанола и млечната киселина, се получават полимерни саморазпадащи се материали – напр. разпространените поли-хидрокси-алканоати. Известно е, че традиционните източници на нисши алкани са нефта, природния газ и въглищата. **Най-актуалната задача** на индустриалният органичен синтез е замяната на тези източници с отпадни или природно-възобновяеми суровини – например, отпаден глицерол, нишесте. В световен мащаб решаването на тази задача ускорява научните изследвания и развойната дейност. Само обзора на този труд съдържа 100 публикации, излезли в периода от 5

години между 2011-2016 г. Напоследък се налага понятието „Бяла биотехнология“, прилагано за производства на химически вещества. Настоящият труд е насочен към създаване на научните основи и изследване на производството на основни полупродукти за „белите биотехнологии“ с прогнозиране на потенциалните възможности за производство на такива полупродукти в технически мащаби. **За актуалността на проблемът може да се съди по ръста на пазарните мащаби на тези производства:** например (по данни на Plastics Technology On Line, Jan H. Schut (2010). www.ptonline.com) само през последните години са влезли в производство инсталация за био-ПД от царевица с капацитет 45000 тона (на DuPont), инсталация на холандска компания за МК в Тайланд на база нишесте с капацитет 90 000 тона, за полимлечна киселина 50 000 тона (Metabolix), за полихидроксibuтират 80 000 тона (на Toyota), за полихидроксibuтират-валерат 9000 тона (на Monsanto). Излишно е да се напомня, че производството на тези продукти чрез химически синтез би включвало многостадийни процеси, свързани с високи налягания и температури. (Например, алкандиолите, между които 1,3-БД, се получават химически в двустадисен процес чрез димеризация – алдолна кондензация - на ацеталдехид (от етанол) и каталитично хидриране при високи температури 180-200°C и налягания над 100 атм.

Трудът засяга и биопроцес за фруктоза от инулин. Получаването на фруктоза от инулин - като правило за захарната индустрия - е процес за получаване на чиста фруктоза, поради което и този процес е актуален.

3. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Обемът на дисертационния труд е 373 страници, включващи 126 фигури и 32 таблици.

Дисертационният труд включва въведение - 5 стр, 140 страници литературен обзор, включително изводи, цел и задачи, раздел „Материали и методи“ от 26 стр, раздел „Резултати и обсъждане“ в 125 стр, изводи и приноси - 10 стр и литература 58 стр., допълнена с 3 стр. списък на авторските публикации по темата на дисертационния труд. Списъкът на цитираната литература включва 705 позовани източника. Опитните данни са илюстрирани в 126 фигури и 32 таблици.

Литературният обзор информира за нискомолекулните съединения, обект на интерес, като разглежда подробно научните изследвания върху съединенията, разработвани в дисертацията. Подходящо е наблегнато на техническата страна на биопроцесите, като продуценти, субстрати, условия за получаване, постигнати параметри и възможности за извличане от ферментационни среди. Поднесен по такъв начин, литературният обзор естествено води до направените изводи за необходимостта от намиране и създаване на организми за ферментация на по-евтини субстрати, оптимизиране на технологичните процеси; **Към момента** получените концентрация, добив и продуктивност за тези процеси не са достатъчни за едромащабно приложение или трябва да се създадат продуценти чрез „пробив на молекулно ниво“, за да стане възможно едно бъдещо производство. Авторът приема предизвикателството за такъв „пробив“ чрез прилагане на молекулярно-биологични методи и научно обосновано насочване на метаболизма на получените организми към оптимален биологичен процес.

Като добре обосновани според фактите от анализа, разпознавам следните по-важни работни **хипотези**, представляващи предизвикателство за науката,:

Обобщаващата работна хипотеза, която се потвърждава експериментално в дисертационния труд, е научно обоснованото **предположение за възможността да се създадат щамове, изолати, генно-модифицирани (ГМ) организми и условия**, при които може да се реализират микробни

биопроцеси за синтез на нискомолекулни съединения с параметри (етапност, добив, продуктивност, усвояване на субстрата, ефективност), задоволяващи мащабни производства.

Тази хипотеза е конкретизирана в няколко направления, паралелно на стремежа за реализация на най-желаните възобновяеми суровини, съдържащи глицерол, нишесте и инулин, както следва:

- **организъм и условия** за усвояване на високи концентрации на глицерол до 2,3-БД и паралелно на 1,3-ПД.
- **ГМ организъм** - свръхпродуцент на 2,3-БД - чрез въвеждане на ген за екстрацелуларна амилаза с очакван висок (амилолитичен) потенциал за *директно* превръщане на нишесте в 2,3-БД с висока концентрация, добив и продуктивност и **условия** на такъв процес.
- **амилолитични шамове** с потенциал за директно превръщане на нишесте до МК в едноетапен ефективен процес (SSF) и **условия** на такъв процес.
- **ГМ организъм** за *директна* конверсия на нишесте до етанол.
- **изолати** на продуценти на МК притежаващи инулинази, както и **условия** с потенциал за *директна* конверсия на инулин до МК
- **условия** на контролиран метаболизъм на култура (*на ускоряване на процеса на хидролиза и потискане на ферментацията*) за постигане на *едностъпален* процес за получаване на фруктоза от инулин.
- **Основната и съставните хипотези/предположения са проверени експериментално, като потвърждение е получено чрез следните основни резултати:** Накратко, преследвани са нови организми, едноетапни процеси, концентрирани продукционни флуиди, търсени са критични влияния на добавки и операционни параметри –аерация и разбъркване – всичко в рамките на перспективата за мащабно производство.

(1) Раздел 4.1.1. 2,3-БД от глицерол. Постигнати са оптимални условия за биосинтези, защитени чрез данни за шамове и консумиран глицерол, поведение и влияние на рН, влияние на скорост на разбъркване, усвояването на глицерол и формиране на 2,3-БД паралелно на други метаболитни продукти, с оглед селекция на шам и намиране на оптимални условия на биопроцес за получаване на 2,3-БД; кинетични криви „концентрация-време“ при вариране на аерацията, разбъркването и рН на средата; резултати за периодичен процес с подхранване при изследвания при анаеробни и аеробни условия. **Постигнат е изолат на *Klebsiella pneumoniae* шам G₃₁ и оптимални условия за процес на получаване на 2,3-БД.**

(2) Резултати с контролирано изменение на рН, в рамките на едно обобщение, като нов метод за производство с повишени параметри.

(3) Аналогично за продуциране на 1, 3-ПД, раздел 4.1.2.

(4) В раздел 4.2.1 е постигнат процес за получаване на 2,3-БД от нишесте, който отговаря на две основни технически изисквания – висока концентрация на крайния продукт и едностъпална конверсия. Избрана е стратегия, ориентирана към ГМ шам. Представени са резултати за подбиране на средата, кинетиката на усвояване на гликоза, **постигната е експресията (хетероложна) на ген за амилаза в див шам *Klebsiella pneumoniae* G₃₁.** Показано е сравнение на резултатите на разграждане на нишесте от двата паралелни шاما – природният и рекомбинантния *K. pneumoniae*

G₃₁-А. Изследвани са влиянията на концентрацията на конкретен индуктор (изопропил-β-D-1-тио-галакто-гринозид) IPTG, калциеви йони, глицин, усвояване на концентрирани нишестени разтвори, представени като опитни данни за амилазна активност и криви на разграждане на нишесте и формиране на странични продукти. **Като резултат са изпълнени основните изисквания към процеса.**

(5) **Раздел 4.2.2.** изследва процеса за получаване на **МК от нишесте**. Резултатите са насочени към получените концентрации МК в различни среди, при промяна на условията – температура, скорост на разбъркване, контролирано рН, сравнени са кинетични криви за три щама МК бактерии, разкрити като притежаващи амилολитични свойства, като за технически цели е отдадено водещо въздействие на *Lactobacillus paracasei* В₄₁. На този организъм е посветена оптимизационната част от изследванията, които завършват с установяване на **оптимални условия с високи параметри** – концентрация, добив, продуктивност – за биопроцеса. Приведени са резултати с щамове от вида *Rhizopus*, като **основен резултат е извеждането на организми с преимущество за по-висока концентрация на МК** – максимална при *Rhizopus arrhizus* (25 г/л).

(6) **Раздел 4.2.3** е посветен на **едноетапно получаване на етанол от нишесте**. Основна цел е постигане на *директна* конверсия на нишесте в етанол чрез въвеждане на ген за екстрацелуларна α-амилаза в бактерията *Zyotomonas mobilis* DSM₄₂₄ (от Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen), която е свръхпродуцент на етанол. Получени са три рекомбинантни щама, като е взета под внимание и информация за предишни клонирания и експресия на амилазен ген в този организъм. **Резултатът е създаване на совалкови вектори с ген за амилазна активност, но без приложна стойност.**

(7) **Раздели 4.3.1 и 4.3.2.** Получени са резултати, представени като кинетични криви, данни за ензимна (инуланазна) активност, нива на експресия на инуланазния ген *fosE* при вариране на концентрацията на манган и други двувалентни йони, които позволяват **директна конверсия на нулини-съдържащи субстрати**, по-конкретно цихориево брашно, до МК и фруктоза чрез регулиране на количеството на манганови (2+) йони в хранителната среда с продуцент *L. paracasei* В₄₁. Процесът на получаване на фруктоза е организиран чрез подхранване, като са показани резултати за формиране на метаболити при вариране на условията – температура, рН на средата, скорост на разбъркване, азотни източници, наличие на манган - с доказано нарастване на количествата на продукта при отсъствие на манганови йони. **Резултатът е биопроцеси за директна конверсия на МК и фруктоза с високи параметри.**

- Една от съставните хипотези не е потвърдена – тази за рекомбинантен организъм за директна конверсия на нишесте до етанол. Тази хипотеза в бъдеще следва да се модифицира, като се търси подходящ организъм и условия.

- Като **обобщена характеристика на глава 4 „Резултати и обсъждане“**, в разделите са посочени критериите за технически-приемливо производство на нискомолекулния продукт, обсъждана е индуктивно стратегия, свързана с избора на пазарно-приемлива хранителна среда и подходящ щам-продуцент, с оглед постигане на едноетапна конверсия до високи концентрации на продукта в получените разтвори, показани са проявленията на метаболизма на организмите чрез кинетични криви на продуктите и усвояването на субстрата, ензимната активност и в заключение е дадено научно обяснение на получения резултат, дедуктивно от гл. т. на метаболизма и експресията на съответните гени.

- **Общото впечатление за трудът** е, че е написан много вечно, аналитично, последователно и дефинитивно, паралелно на избраните три основни субстрата - глицерол, нишесте и инулин, както и на съответните нискомолекулни продукти - 2,3-БД, 1,3-ПД, етанол, 2-хидроксипропанова киселина (МК) и фруктоза и относно биологичните видове - алтернативно на две нива – селекция на природни изолати и биоматериали с манипулирани метаболитни свойства.

- **Една друга характеристика** на дисертационния труд засяга използваната методология и се заключава в обстоятелството, че наред с конвенционалните методи за контрол на биопроцесите и идентификация на микроорганизмите и тяхната биоактивност, са използвани модерни молекулно-биологични методи на идентификация чрез секвениране и картиране на последователностите от полипептиди, на клониране и трансформация за създаване на рекомбинантни щамове, съдържащи нови биологични молекули и генно охарактеризиране на активността на организмите. **Дисертацията напълно съответства на съвременното схващане (от 1980-те г и досега), че биоинженерство означава преди всичко прилагане на молекулярно-биологични методи в биотехнологиите.**

4. Основни научни и научно-приложни приноси

Трудностите по замяната на традиционните процеси за основни продукти с биопроцеси в т.нар. биорафинерия са ниските концентрации на биологичните среди, необходимостта от ангажиране на подходящо продуктивни щамове. Настоящият труд се ангажира и дава отговор и на двете предизвикателства: да разработва и селектира щамове, включително с генни манипулации, и да установява условия за по-високи параметри на биопроцесите. В това се състоят и **основните приноси**, които проверих последователно за иновативност и оригиналност (по-подробно формулирани в текста на дисертацията и в автореферата), а тука обобщавам:

- **Изолирани са нови щамове** и са създадени **нови рекомбинантни микроорганизми**, в т.ч. – рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G₃₁-A, лактобацилни щамове *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84, *Lactobacillus plantarum* om816, *Lactobacillus pentosus* N3, *Lactobacillus paracasei* B₄₁ (DSM23505), щам *Klebsiella pneumoniae* G₃₁, рекомбинантни щамове от *Zygomonas mobilis* DSM424 - *Z. mobilis* pZT1, *Z. mobilis* pZT2 и *Z. mobilis* pZT3, с потенциал за получаване на целевите нискомолекулни съединения – диоли, МК, етанол, фруктоза от възобновяеми материали; изследвана е биокинетиката на генерираните от тях биопроцеси. Тествани са щамове от рода *Rhizopus* за конверсия на нишесте до МК и алкохол.

- Предложен е **нов метод на насочване на метаболизма чрез принудени флуктуации на pH**; дадено е обяснение на получения технологичен ефект чрез изместване на метаболитния поток от продуциране на киселини към продуциране на алкохоли, следвайки механизъм за саморегулация, позволяващ на клетката да оцелее в среда с повишаваща се киселинност. Разкрито е влиянието на честотата и амплитудата на флуктуациите за конкретен процес. Чрез него са получени високи концентрации 2,3-БД до 70 г/л. Методът може да се провери и при други организми и системи на смесено-киселите ферментации и разкрива възможности за проверка и насочване на метаболизма и на други биопроцеси. Представлява принос с научно и научно-приложно значение.

- Предложени са **едноетапни/SSF технически-ефективни биопроцеси** за конверсия на нишесте до 2,3-БД, на нишесте до млечна киселина, и на инулин-съдържащо цихориево брашно до млечна киселина. По кинетични данни – като концентрация на продукционните разтвори, съотв. ~54 г/л,

24 г/л и 1–124 г/л, добиви ~ 0.5-1 г/г, и скорости на биотрансформация 0.6-1 г/л на час - те надвишават постигнатите досега характеристики. Постигнат е **нов метод за оригинално едноетапно получаване на фруктоза** с висока концентрация - 36 %-ни разтвори.

- Създадени са **вектори за генна модификация на организми**, които - поради спецификата на биологичните молекули - представляват оригинални научни решения.

- Посочени са **оптимални условия за получаване на целевите биопродукти**, които по естеството на заложените организми са иновативни научни постижения, а по естеството на резултата – имат глобално научно – приложно значение за пазарно-ориентираните „бели“ биотехнологии.

Без да смятам това за недостатък на работата, считам за неподходящо разделянето на претенциите на изводи и приноси. Дедукциите са дадени в "Заключения" към всеки подраздел. Разкриването на условията на отделните процеси, очертано с изразите „Установено е че...“ „Определено е влиянието на...“ считам за приноси и при оценката ги разглеждам заедно.

В защита на приносите са от значение и следните факти:

- **Относно приноси 6.1.**

Приноси 6.1 са защитени с експериментални резултати, описани подробно в гл. 4.1 на дисертацията. Въведеният нов метод на принудени рН-флукуации представлява принос към техниката за получаване на 2,3-БД – като основен продукт при ферментация на глицерол, както по обем - получен в съотношение 5:1, така и като предписание на условията; постигнатия резултат, като екстремна концентрация ~ 70 г/л е постижение, почиващо на логиката и проучване на метаболизма на използвания щам и умело насочване на метаболизма към желаната адаптация чрез използване на механизма на саморегулация на клетките. Публичност на метода е регистрирана в 10 статии, вкл. две публикации в международни списания с висок импакт фактор и е получен патент. Приносите намират широк отзвук от общо 245 цитата.

- **Относно приноси 6.2:**

Съществен принос от серията 6.2 е постигане за първи път на едноетапен процес за получаване на 2,3-БД от нишесте с високи параметри, концентрация ~ 54 г/л при продуктивност 0.6 г/л на час. Този резултат е постигнат в хода на докторантура за ОНС под ръководството на кандидата, като е създаден рекомбинантен щам *Klebsiella pneumoniae* G₃₁ - А чрез въвеждане на ген за α-амилаза в бактерията *Klebsiella pneumoniae* G₃₁. Разликата между постигнатото с хетероложна експресия в сравнение с хомоложна експресия в аналогичен щам показва уникален резултат – 14 пъти по-висока концентрация и три пъти по-висока продуктивност от постигнатите до момента. Съставни елементи на този принос са описани като изводи 5.2.1 от 1 до 5. Резултатът е защитен с опитни данни описани в гл. 4.2.1 с.с. 207 - 231 на текста и с основна научна статия 17 в сп. АМВ, с адекватно обявени приноси, както са формулирани в тезата. Съставните приноси са публикувани в 7 статии, има отзвук от 14 цитата.

Основателни са приноси 6.2.3 и 6.2.4 и изводи 5.2.2. за **получаване на МК директно от нишесте** чрез новоизолирани амилолитични лактобацилни щамове, между които за *Lactobacillus paracasei* В₄₁ е установен потенциал за приложение в технически мащаби (с припл. 27 г/л МК от нишесте). Тези изследвания са описани в гл. 4.2.2 с. 232-247. Публикувани са в статия 10 от 2012 г и досега е регистриран отзвук от 21 цитата. Паралелно са описани приноси в областта на рекомбинантните

технологии с претенции за пионерна хетероложна експресия на ген за амилаза – 6.2.1 и създаване на совалкови вектори (приноси 6-2-1 и 6-2-5 и заключения 5.2.1 от 1 до 5).

Обявен е опит за създаване на ГМО на *Zytoponas mobilis* DSM₄₂₄ за директно получаване на етанол със значение за следващи научни приложения. Този резултат засега отхвърля предположението за възможността за създаване на ГМ организъм *Z. mobilis* за конверсия *директно* на нишесте до етанол с максимален добив /виж Работни хипотези, стр.2 на този материал/.

Относно приноси 6.3:

Приноси 6.3. се отнасят до получаване на ценни продукти - МК и фруктоза - от инулин. Приноси 6.3.1.-6.3.3 представят пионерен резултат за успешен директен SSF биопроцес за МК от инулин-съдържащо цихориево брашно с постижение от ~ 124 г/л, а при добавяне на манган (2+) до 151 г/л, уникални за момента. Постигнати са с български изолат *Lactobacillus paracasei* В₄₁ (DSM23505). Защитени са с експериментални данни (в раздел 4.3 на стр. 257 – 279), предмет и на **докторантура** за ОНС под ръководство на кандидата и от две **публикации** - от 2015г (BT) и 2017 (PB) с отзвук от 19 цитата.

На инулин-съдържащ субстрат е разработен нов метод за получаване на фруктоза с редица предимства пред ензимните и химически методи (принос 6.3.5, изводи 5.3.2). Приносът е защитен чрез предложената и опитно потвърдена стратегия за периодичен режим с подхранване и работа в среда без метални йони, както и с установеното при тези условия 7-кратно увеличение на нивата на експресия на инуланазния ген. Той е част от **докторантура** под ръководство на кандидата. Публикуван е в три статии през 2017 г, като за краткия период от тогава е регистриран отзвук от 8 цитата.

Обща характеристика на приносите

В отговор на въпроса дали приносите представляват решения на голям научен или научно-приложен проблем.

- **Разкритите нови биопроцеси и микроорганизми представляват за науката нови методи.** На всички наблюдавани ефекти и към всички методи са дадени логични обяснения, с изчерпателна обосновка по проявата на факти и доказателства, например като определена генна експресия или установени метаболитни явления. Те имат характера на теоретични обобщения и могат да послужат за допълване на теоретичните знания за метаболизма на съответните биологични видове.
- Преобладаващата част от получените резултати - получаване на 2,3-БД от глицерол и от нишесте, съпроводено с повишена концентрация на желанния продукт, или получаване на 1,3-ПД, методите за получаване на млечна киселина в едноетапен процес, нов процес за получаване на фруктоза БД от глицерол, методът за получаване на млечна киселина, едностъпалната конверсия на МК от инулин, метод за получаване на фруктоза при регулиране на генната експресия на инуланазния ген, методът за принудено изменение на рН флукутации, хетероложна експресия на ген на амилаза - **представяват пионерни решения** (за първи път) на проблема. Считам, че тези приноси отличават кандидата, като **водещ учен в своята област** и по-специално като **водещ в реализацията на едноетапни биопроцеси** за нискомолекулни продукти.

Една друга по-малка част от приносите могат да послужат като реализация на необходим етап от решаване на проблемите, какъвто е случая с провереното предположение на една възможност за директно получаване на етанол от нишесте в биопроцес с рекомбинантни *Z. mobilis*.

- Трудът съдържа обстоен анализ на предварителната информация за постиженията в областта, която обхваща 1/3 от обема страници плюс 370 лит. източника. Този анализ вписва **проведените изследвания, като значими в изследваната област**, както по съвременно ниво на разработените щамове, така и по постановката и насочването на техния метаболизъм за усвояване на субстрата, но и като параметри на получените продукти/разтвори.

Общоприето е, че проблемът на замяна на конвенционалните синтези с биотехнологии има **глобален характер** със световно значение. Резултатите на този труд представляват компонентни решения и стъпки при решаване на глобалния проблем за замяна на петрорафинериите с биорафинерии, и по конкретно на замяна на органичния синтез на основни полупродукти, получавани от изкопаеми, с биосинтез, основан на възобновяеми агроресурси, което пък изисква създаване на щамове-продуценти, способни да обработват широк спектър от субстрати в едностъпални процеси до високи концентрации на крайния продукт. Веднага трябва да се добави, че тази замяна е силно-наукоемък процес и ангажира мащабни интердисциплинарни изследвания, част от които е и настоящия труд. От тази гл.т. получените пионерни резултати представляват **решения на големи научни и научно-приложни проблеми**. От друга страна, пионерният характер на получените решения ги нарежда в **категорията на новобразкрити факти и зависимости, представляващи оригинален принос за науката**.

- **Относно личния принос на кандидата:**

Изследванията са интердисциплинарни и засягат едновременно инженерно-технологични аспекти, биокинетика и оптимизация, от една страна и култивиране на щамове и контрол на микробиологията – от друга. Прегледът на авторствата и индивидуалния принос показва, че **технологичната страна на приложението, биокинетиката, оптимизациите и инженерния подход са изцяло в обхвата на кандидата**. Инженерно-технологичната насоченост на труда личи и от обстоятелството, че на 26 места в текста се споменава за цена и на 56 – се обсъжда ефективност. Въз основа на стройната логика и обвързаност на представения текст, личният принос на кандидата в проведените анализи на наличната информация, в поставените цели и задачи, в очертаната стратегия за атакуване на проблемите и изведените заключения изглежда безспорен. Както към приноси 6.1, така и към 6.2 и в 6.3, личният принос на кандидата личи в постановката за техническа/пазарна ориентация на изследванията, проучването на кинетиката на процесите, параметрите на получените продукти – отговарят ли „да или не“ на поставените технически изисквания и също така – в компетентното въздействие върху системите, ако те не отговарят – именно, насочване на изследванията към изолиране на съответните щамове и ГМО, създаване на самите организми, както и постановката на условията на биопроцесите, с оглед постигане на желания метаболизъм и оптимални условия на биопроцесите. Проведените експериментални програми, касаещи кинетиката и оптимизацията на изследваните биопроцеси също е очевидна. Справките показват, че **кандидатът е преминал разширен курс по молекулярна биология и е подготвил и реализирал лабораторните манипулации за генна модификация и създаване на ГМ организми. Иницирал е подхода при изследването на получените ГМО**. Провеждал е компетентен контрол, включващ молекулярно-биологични методи. **Основни раздели от представения труд за БД от нишесте и ценни продукти от ипулин са предмет на две успешно защитени докторски дисертации, съотв. на Флора Цветанова (2016) и на Луиза Попова (2017) под научно ръководство на проф. Петров**. Като интердисциплинарно, изследването не изключва съдействието на външни специалисти за консултация, обсъждане на

резултати и провеждане на някои процедури от колеги с експертиза по микробиология и молекулярна биология. Проведох обстоен анализ на приносите по публикации със съвместно авторство. За два от трудовете, засягащи основни приноси (статии 10 и 19 от списъка на публикациите), поисках декларации за характера на съдействие и дял на индивидуално участие. Декларациите са приложени към рецензията и не оспорват приноса на кандидата.

5. Описание и оценка на представените материали

По изпълнението на изисквания на Правилниците и Закона:

- Кандидатът е представил диплом за научна степен „доктор“. Проверка върху тематиката на изследванията на кандидата в годините показва, че на представеният дисертационният труд не повтаря и не включва резултати от дисертационния труд, защитен за тази научна степен.
- Представен е доказателствен материал, съдържащ списъци на научни публикации и цитати, преобладаващо в индексирани списания. Кандидатът е съавтор на 57 публикации, 2 глави от книги, 2 патента. Броят на авторските публикации в пълен текст по дисертацията е 30. От тях 16 са в списания с импакт фактор за съответната година, а 11 са публикувани през последните 5 години (2014 – 2018). Включени са два патента. Публикациите са цитирани общо 383 пъти. В 11 от публикациите кандидатът е първи автор, а в други 9 – първи автори са негови докторанти. Съответно на тези данни, кандидатът покрива специфичните изисквания на Правилника на Института по инженерна химия за степен „доктор на науките“.
- Публикациите покриват основните приноси на дисертацията и съдържат съставните изводи и заключения, както за новите рекомбинантни организми, така и за постигнатите концентрации на целеви нискомолекулни продукти и за постигнатите оптимални условия на съответните биопроцеси. **Те очертават ясно тематиката на ученият, в която той е водещ изследовател.** Тя може да се формулира като *разработване и оптимизация на иновативни биопроцеси за получаване на метаболити с индустриално значение чрез изолиране и разработване на нови, включително рекомбинантни организми с подобрени свойства.*
- **Оценка на съответствието на кандидата към минималните изисквания за защита на научната степен „доктор на науките.** Кандидатът е представил отделно обширен материал, включващ всички статии в реферирани/индексирани издания, включително 33 статии от авторският му профил в SCOPUS, които попадат в показатели 7 на група Г и допълнително 25 статии в нереферирани издания и 2 глави от книги, както и SCOPUS-профил информация за 317 цитата в реферирани/индексирани издания, които попадат в показатели група Д. Приемам представената от него справка и определям получения брой точки, както по показатели, така и по естество на отделните компоненти, а именно 50т за защитена дисертация НОС „доктор“ група показатели А, 100т по настоящата дисертация за „доктор на науките“ по група Б, над 600т – повече от 100т - по група показатели Г и над 1500т -повече от 100т - по група показатели Д. В заключение, кандидатът удовлетворява изискванията многократно.

Подчертавам, че точките на кандидата надхвърлят задължителната норма на Правилника на БАН не само за Технически, но и за Природни науки *Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*.

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

Трябва да признаем, че областта на дисертацията е много динамична и получените сполучливи решения на даден автор веднага стават изходна точка за надграждане от други автори. С това и с изключителната актуалност на темата може да се обясни постигнатия ефект от публикуваните

резултати. Кандидатът е представил данни за общо 57 научни статии и 571 цитата, като 375 цитират 9 статии от дисертационния труд. В международната база данни SCOPUS са отразени негови 37 статии с **повече от 405** цитата. Считаю този резултат за достатъчно свидетелство за отзвук на изследвания на кандидата сред международната научна общност. Споменавам само част от тях: Особено ценени са изследванията по публикувания принос 6.1.1 и 6.2.3, които са цитирани повече от 10 пъти непосредствено след публикуването им. Методът на изкуствените рН флукутации **публикуван през 2009 г е охарактеризиран** като **“основна стратегия за ефикасно и икономическо ефективно производство на 2,3-БД“** в обзор на *Biotechnology Advances*, списание с висок IF 7.6 (от Ji X.J., et al. (2011) “Microbial of 2,3-butanediol production: a state-of-art review” *Biotech Adv*, vol. 29, 351-364) и отново през 2016 г и 2018 г с отношение към **1,3-ПД в сборниците Current Developments in Biotechnol и Biosynthetic Technology (Vivek et al., (2016) Production and Applications of 1,3-PD., Eds. A. Pandey, S. Negi and C. R. Soccol, pp. 719-738)**. От друга страна, една последна статия от 2017 г върху контрола на генна експресия при получаване на ценни продукти от инулин (приноси 6.3, статии 24 и 25) е получила признание в току-що издадената книга на Caister Academic Press от 2019г. *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering*. Постигнатите концентрации на МК от инулин (приноси 6.3, статия 19) са признати като върхово постижение в обзорна статия на Singh R.S. et al. (2018) в *Bioresource Technology*(**IF 4.9**): Biotechnological Applications of Inulin-rich Feedstocks.)

7. Критични бележки и препоръки към научните трудове на кандидата

- Установените оптимални биопроцесни параметри за получаване на 2,3-БД от глицерол, оптимални честоти и амплитуди за рН флукутации са обвързани с точно определени скорости на разбъркване и аерация, в случая касаещи хидродинамиката на микроаерофилния процес, като аерация 2.2 vvm и скорост на разбъркване 200 rpm. Оптималните условия извод 5.1.1 ал.1 на стр 300, би следвало да се конкретизират като **лабораторни** или укрупнено лабораторни, тъй като е известно, че хидродинамиката е зависима от мащаба на био-обекта, а конкретните изследвания са ограничени до съдове от 0.5-1 литра и оборотите и дебитите важат за конкретния мащаб. В този смисъл резултатите в дисертацията са обвързани с мащаба на изследване. Като препоръка, работата по разширяване на обхвата на метода и теоретичното му основание би следвало да продължи и в по-големи съдове (напр. *Biostat B* 10 л) и по-големи (200 л), които се доближават до полутехнически мащаби. Това важи и за условията на другите биопроцеси/методи.
- Прави впечатление – напр. при конверсията на нишесте в 2,3-бутандиол - **експериментирането с ниска плътност на клетките**, от порядъка на 1-4 г/л; изследване влиянието на този параметър, като работа при концентрирана биомаса, не срещнах в дисертацията, а по-високата плътност на клетките би могла да постигне и по-високи резултати, например като повишена продуктивност и концентрация на продукта.
- Може би би следвало да се даде и коментар/оценка дали прилаганите изходни материали за генна модификация на микроорганизми са търговски **достъпни**. Например, в условията за техническа експлоатация на биопроцес с ГМО влизат простота на техниката за молекулярно-генетична манипулация на организма, наличие на многообразие от вектори, щамове и методи, евтина техника, достъпност на източник и приемник, разглеждане на системата на експресия като търговски достъпен комплект, сходни условия на растеж и толеранси на източника и гостоприемника.

Както се разбира от Таблица 17, кандидатът използва пазарни препарати, плазмиди и праймери и стандартен организъм *E. coli* за размножаване, които са пазарно достъпни препарати за реализация на технически цели. Не става ясно обаче дали това важи и за щама *B. licheniformis* 44MB8₂/G. Той

също би трябвало да е пазарно достъпен, ако процесът се лансира, като такъв с техническо значение.

От друга страна векторите pJETamyBL и pCRamyBL са новосъздадени продукти без да са обявени в претенциите за приноси на дисертацията, както това е направено за совалковите вектори pZT1, pZT2 и pZT3. Каква е разликата?

8. Лични впечатления на рецензента за кандидата

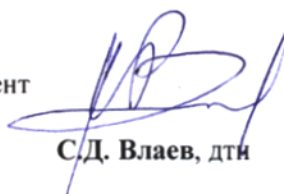
Нямам непосредствен контакт в съвместни разработки с кандидата, но имам странични впечатления от работата му в „Лабораторията по биохимични реактори“, която напоследък ръководи. Той е надежден учен, концентриран в своите замисли, амбициозен в целите си и енергичен в работата си. Плановете му да изгради лаборатория за генно-инженерство в ИИХ надвишават финансовата подкрепа на фондовете, поддържащи научните изследвания на ИИХ. Развива дейност за преодоляване на тази несъстоятелност. Личното ми впечатление е, че - чрез своите публикации и настоящия труд - авторът израства като майстор на техниките за контролирано насочване на метаболизма чрез изменение на условията на ферментация, включително чрез генно инженерство и постига и ще постига и в бъдеще реални научни и приложни резултати.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение, подчертавам наличието в представения труд на двете основни характеристики, необходими според Закона за научната степен, а именно, да съдържа решение на глобален научен проблем за съответната наука, съответстващ на съвременните постижения и да представлява оригинален и значим научен принос. И двете характеристики присъстват в този труд, като кандидатът едновременно с това надвишава минималните изисквания за научната степен. Като имам пред вид това предлагам да се вземе положително решение за присъждане на Калоян Петров на научната степен „доктор на науките“.

София, 20 февруари 2019 г

Рецензент



С.Д. Влаев, дти