

СТАНОВИЩЕ

върху дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № 15-365/19.12.2018 г на Директора на Института по инженерна химия при БАН

за придобиване на научната 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”**

Изготвил становището: **проф. Мария Богомилова Ангелова, д.б.н.**, Институт по микробиология, „Стефан Ангелов” при БАН

1. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем. През последните години биологичното производство на ценни ниско молекулни съединения от възобновяеми източници привлича все по-голямо внимание като алтернатива на получаването им от нефтопродукти. Тази тенденция има сериозно бъдеще поради ограниченото естество на природните ресурси, увеличаването на цените на петрола, както и поради последиците за околната среда от тяхното използване. Освен това, биобазираният индустриален сектор е признат от Европейския съюз като приоритетна област за устойчиво развитие. Ключовите фактори в този случай са разработването на естествени или инженерни микроорганизми за ефективно производство, оптимизиране на процесите и достъп до рентабилни и устойчиви ресурси. Въпреки значителния напредък на индустриалната биотехнология, производството на такива ниско молекулни съединения получава много малко внимание. Един от основните проблеми, търсещ решение, е замяната на скъпо струващи субстрати като глюкоза и захароза с широко достъпни възобновяеми ресурси. В тази област има много неизследвани ниши, които изискват задълбочено научно дирене и предполагат сериозен комерсиален интерес. Това от своя страна е предпоставка за получаването на нови данни и оригинални приноси.

Именно към тези аспекти на големия проблем за биологичното производство на ценни за медицината и бита съединения насочва вниманието си проф. Петров. Представените по-горе аргументи подчертават актуалността и перспективността на представения дисертационен труд. Преценката за актуалността произтича главно от основната насоченост на разработката - създаването и оптимизирането на биотехнологични процеси за получаване на ценни нискомолекулни съединения с широко приложение и се вписва много точно в основните приоритети на страната и Европа, каквито са биотехнологията и екологията.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите. Изборът на темата и начинът на разработване показват голямата ерудиция на проф. Петров в областта на микробните биотехнологии. Отличното познаване на проблема и на възможностите на съвременните методи за навлизане в нерешените въпроси, му позволяват да намери

обединяващия елемент в едно мащабно изследване с подчертана приложна насоченост. На базата на детайлен и творчески анализ на съществуващите до момента данни (705 литературни източника), проф. Петров си поставя амбициозната цел да използва ефективно подхода на микробната конверсия на евтини, широко достъпни и възобновяеми субстрати за синтезата на такива $C_2 - C_6$ съединения, които освен че са с жизненоважно значение за икономиката, все още нямат реализирана биотехнологична алтернатива в промишлен мащаб. В тази цел се включва получаването на 2,3-бутандиол, 1,3-пропандиол, млечна киселина, етанол и фруктоза от нестандартни суровини като глицерол, нишесте и инулин.

За постигане на поставената цел е проучен широк набор от микробни щамове, по-голямата част от които са изолирани конкретно за настоящата разработка. Това разширява мащаба на изследванията и демонстрира личния принос на проф. Петров. В съответствие с плануваните експерименти, той използва внушителен брой рутинни и съвременни микробиологични, биотехнологични, химични и молекулярно-биологични методи. Искам да подчертая някои от тях, като напр. оптимизиране на хранителните среди и условията за култивиране, генетично модифициране на щамове, идентифициране на щамове, идентифициране и клониране на гени, трансформация на щамове, изследване на генната експресия, определяне на голям брой ензимни активности, установяване концентрацията на захари, олигозахариди, течни метаболити и др. Експериментите са проведени със съвременна апаратура, включително газов хроматограф, снабден с FI детектор, HPLC, снабдена с RI детектор, PCR, RT-PCR, спектрофотометри, лабораторни биореактори и др. За секвенционен анализ са приложени специфични програми, като Chromas and CAP3 Sequence Assembly Program, BLAST и Clustal-W programs.

Дисертационният труд на проф. Петров представя мащабно биотехнологично изследване, подчинено на добре обмислена стратегия: използване на нови и евтини възобновяеми източници на въглерод, създаването на високо ефективни продуценти на атрактивни понастоящем нискомолекулни съединения и разработване на методи за тяхното получаване. Той е обособен в 3 основни раздела, базирани на вида на суровинния източник. Във всеки от тях детайлно са отразени резултатите относно селектирането или конструирането на високо ефективен шам-продуцент, оптимизирането на условията за получаване на максимален добив от 2 или 3 целеви продукта, създаването на условия за улесняване на транспорта през клетъчната стена и ефекта на екзогенно добавени метални йони върху експресията на съответния ген. Трябва да се подчертае строго научния подход при разработване на технологичните решения. Авторът проучва в дълбочина подходящите условия за синтезата на ензимите, отговорни за разграждането на нетрадиционните субстрати и тяхното усвояване, след което представя икономически ефективни процеси с готовност за промишлено производство. Получените данни са интерпретирани компетентно и са представени по подходящ начин, за да докажат на читателя своята достоверност. Дискусията е много убедителна и е изведена на базата на съвременни данни. Интерес и достоверност авторът постига и със сравнителния анализ на собствените

резултати, сравнявайки ги с най-доброто, постигнато в световен мащаб. Много добра идея е в края на всеки основен раздел от дисертационния труд да бъде представен подраздел „Заклучение“, който обобщава най-важните резултати. Този подход улеснява читателя при възприемане на постиженията на разработката. Тук искам да добавя своята положителна оценка за обширния експериментален материал, онагледен с 32 таблици и 126 фигури.

Трябва със задоволство да подчертая много доброто оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите във фигури и таблици, както и тяхното професионално представяне.

Изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания.

3. Основни научни и научно-приложни приноси. В резултат на извършените изследвания се оформят сериозни теоретични и приложни приноси. По мое мнение, проф. Петров ги е формулирал много ясно и точно в представената справка. По-важните от тях са следните:

1. Разработени са лабораторни технологии за получаване на 2,3-бутандиол от глицерол и млечна киселина от нишесте, които създават база за тяхното машабиране в индустриални условия.
2. За първи път е получен 2-3-бутандиол като основен продукт при ферментация на глицерол.
3. Разработен е нов метод за рН контрол, който ускорява синтезата на алкохоли от глицерол.
4. За първи път е извършена хетероложна експресия на ген за амилаза в свръхпродуцент на 2,3-бутандиол и е осъществен едностъпален процес за получаването му на база нишесте.
5. За първи път са селектирани шамове от род *Lactobacillus*, продуценти на амилаза, които осигуряват получаването на млечна киселина от нишестени материали в икономически ефективен процес на едновременно озахаряване и ферментация.
6. В *Escherichia coli* са създадени са работещи совалкови вектори, носещи ген за екстрацелуларна амилаза. Получените трансформанти се характеризират с силно изразена амилитична активност.
7. За първи път, като единствен въглероден източник за получаване на млечна киселина е използвано инулин-съдържащо цикориево брашно.
8. Разработен е нов биотехнологичен процес за директно получаване на млечна киселина от инулин в едностъпален процес на едновременно озахаряване и ферментация. Този процес осигурява най-високите стойности за концентрация, добив и продуктивност на млечна киселина, постигнати до момента от инулин.
9. Доказан е ефектът на Mn^{2+} за: повишаване активността на ензима инулиназа; ускоряване експресията на гена за инулиназа; активността на ключови ензими от гликолитичния път; транспорта на фруктоза през клетъчната стена; процеса на метаболизиране на полизахарида инулин.

10. Разработен е нов биотехнологичен процес за микробно получаване на фруктоза от инулин, който притежава редица предимства пред ензимните и химични методи.

4. Описание и оценка на представените материали. Представеният дисертационен труд е оформен въз основа на резултати, включени в 30 научни труда, от които 26 са публикувани в специализирани списания. 1 студия е отпечатана в книга от национално издание, 1 в сборник от научен форум и 2 патента. От журналните статии, 16 са в издания с импакт фактор, като напр. Food Microbiol., Appl. Microbiol. Biotechnol., Z. Naturforsch., Starch-Starke, Bioprocess Biosyst. Eng., Process Biochem. и др. с общ ИФ 30.134.

5. Отражение на научните публикации на кандидата в българската и чуждестранната литература. Общият брой цитирания на проф. Петров за цялата научна кариера са 571, а *h*-индекса е 12. Включените в дисертацията статии са отбелязани в 383 цитата, изключително в чуждестранни или международни списания и само 8 – в български издания. Някои от тях са цитирани многократно (№ 1 - 56 цитата; № 4 - 126 цитата; № 6 – 20 цитата; № 7 - 96 цитата и т.н.).

Анализът на публикациите и цитатите доказва, че резултатите на проф. Петров са оценени и от международната научна общност.

6. Изпълнение на минималните национални изисквания. Всички представени материали са в съответствия с изискванията на ЗРАСРБ и дори многократно надхвърлят минималните национални изисквания, както и препоръчителните показатели на Правилника на БАН.

7. Критични бележки и препоръки към научните трудове на кандидата. Към дисертационния труд и приложените публикации нямам критични забележки. Дисертацията е прецизно написана и по своята насоченост, обем, съдържание и изпълнение отговаря на изискванията за научната степен „доктор на науките”.

8. Лични впечатления на рецензента за кандидата. Не познавам лично проф. Петров, не съм съавтор, но съм запозната с голяма част от научните му трудове. По мое мнение, той е изключително ерудиран учен в областта на микробните биотехнологии, който успешно намира значими и нерешени проблеми, насочвайки усилията си към създаване на база за индустриално производство на ценни съединения с широко приложение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Направеният разбор, както и мнението ми за проф. Петров като учен, ми дават основание да считам, че неговият принос е решаващ за разработването на дисертационния труд. Безспорната актуалност и перспективност на избраната тема, задълбоченото познаване на материята от автора, както и творческият и иновативен подход в хода на експерименталната работа са позволили получаването на достоверни резултати и формулирането на оригинални научни и приложни приноси. Постигната е целта на изследването, а именно разработени са процеси за продукция на ценни за индустрията и

медицината съединения от възобновяеми източници. Една от впечатляващите характеристики на дисертацията е нейното подчертаното приложно звучене, което намира място в разработената база за промишлено получаване.

Дисертационният труд на проф. Петров отговаря напълно на изискванията за присъждане на научната степен "Доктор на науките". Той надхвърля нормите, определени от ЗРАСРБ и от Правилника на БАН към него. Като имам предвид посочените достойнства на рецензирания труд, резултатите от мащабната изследователска дейност и направените приноси, убедено препоръчвам на уважаемите членове на научното жури, сформирани със заповед № 15-365/19.12.2018 г на Директора на Института по инженерна химия при БАН да присъди научната степен "Доктор на науки" на проф. д-р Калоян Кирилов Петров.

07.02.2019 г.

Изготвил становището:.....

/проф. Мария Ангелова, дбн/

