

РЕЦЕНЗИЯ

относно защита на дисертационен труд
„Получаване на ценни биопродукти от инулин съдържащи субстрати”

за придобиване на научна и образователна степен ОНС “Доктор”
по специалност 4.2. „Процеси и апарати в химичната и биохимичната
промишленост“

с кандидат: Луиза Георгиева Попова

Рецензент: доц. д-р Златка Милчева Алексиева - Институт по микробиология
“Стефан Ангелов”, БАН

1. Кратки биографични данни

Докторант Луиза Георгиева Попова е придобила образователна степен „Бакалавър” в БФ на СУ „Климент Охридски” по научна специалност „Приложна хидробиология и аквакултури” през 2011 г., а образователна степен „Магистър” получава през 2013 г. в същия факултет, но по научна специалност „Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология”. От началото на 2014 г. е зачислена като редовен докторант в Институт по инженерна химия към БАН.

2. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем.

Възможностите за получаване на ценни продукти с биологично и медицинско значение от евтин и достъпен субстрат, какъвто е напр. растителната биомаса, са сред най-актуалните сфери на съвременните научни изследвания с приложение в съвременните биотехнологии. Намаляването на енергоемкостта на подобни процеси и повишаване на ефективността на производство са от ключово значение с оглед на ограничаване на употребата на стандартните енергийни източници. Тематичната насоченост на представения дисертационен труд има пряко отношение към решаването на тези три важни и актуални задачи.

Актуалността на разработваната тематика се подчертава и от избора на щам, принадлежащ към млечнокиселите бактерии (*Lactobacillus paracasei*) и способен да продуцира високи количества млечна киселина. Отдавна е известна важната роля, която играят млечнокиселите бактерии при производството на храни и фуражи. Съвремените проучвания са фокусирани върху ферментирали зърнени култури и други различни от млечните източници. В тази връзка, известно е, че в природата, инулинът е вторият по разпространение резервен въглероден източник след нишестето.

3. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите.

При щамове, продуценти на млечна киселина често се установява наличие на инулиназна активност. Това е основанието за провеждане на анализите за инулиназна активност да бъде избран щам *Lactobacillus paracasei* B41, който е доказан продуцент на млечна киселина. За основен субстрат е избрано инулин съдържащо цикориево брашно поради широката му достъпност и съдържание на инулин (20%). Целта е получаването на два ценни биопродукта – млечна киселина и фруктоза в едностъпален високоефективен технологичен процес.

Оптимизирането на условията за технологичното им получаване е от важно индустриално значение.

В литературния обзор са включени актуални и подробни сведения за известните до сега данни за инулина, използването му като субстрат за получаване на ценни суровини (ФОЗ, фруктоза, млечна киселина, етанол). Най-много информация е посветена на получаването на млечна киселина като цяло и от инулин, в частност. Описани са известните экзо- и ендо- инулинази, техните ензимни характеристики и активни микробни продуценти. Съществено внимание е отделено на азотните източници, които оказват влияние върху синтеза на инулиназа, когато се включват като компоненти на хранителните среди за култивиране на микроорганизми. Описано е и влиянието на редица метални йони, добавени в реакционната смес върху ензимната активност. Обзорът обхваща 32 страници, заедно с Въведението, подходящо е илюстриран с 6 фигури и 2 таблици и приключва с раздел „Изводи от литературния обзор”, който на практика обосновава необходимостта от планираните в дисертацията изследвания.

Формулираните Цел и задачи дават ясна представа за очакваните резултати.

Разделът „Материали и методи” убедително показва, че дисертантът е усвоил и владее значителен набор от класически и съвременни експериментални методи – микробиологични, биохимични и молекулярни методи. Така представен, дисертационният труд е издържан в методично отношение и дава възможност за коректно провеждане на експериментите и достоверност на получените резултати.

Глава Резултати обхваща 35 страници и е добре илюстрирана с 21 фигури и 8 таблици. В началния етап от изследването е доказано по молекулярен път наличието на клетъчно свързана екзоинулиназа и способността на щама да разгражда инулин до млечна киселина и фруктоза. Установено е, че тези процеси подлежат на катаболитна репресия. В следващите раздели на глава Резултати, вниманието е насочено към биотехнологичните параметри на получаване на двата продукта.

Поради доказаното ключово значение на състава на хранителната среда за микробното продуциране на млечна киселина е изследвано влиянието на много популярни източници на азот и неорганични соли (CaCl_2 , Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , CH_3COONa , MgSO_4 , MnSO_4), както и влиянието на 12 метални йони в различни концентрации върху активността на чист ензим и в условията на култивиране на щам *L. paracasei* B41. Изследвано е и влиянието на киселинността на средата. Като най-подходящ източник на азот е определен царевичният хидролизат (20g/l), включен в среда с рН 5.5 и концентрация на цикориево брашно – 136 g/l. В тази среда е измерена максималната инулиназна активност - 267 U/mL, при биомаса от порядъка на 8.3×10^{12} CFU/ml. Установено е положителното въздействие на двувалентните йони на Mn, Mg и Ca, като най-силен е ефектът, предизвикан от 2.5 mM Mn^{2+} , както при пряко въздействие в реакционната ензимна смес, така и при включването в средата за култивиране (*in vivo*). Чрез RT-PCR-експерименти е показано, че генната експресия на *fosE* ген е най-висока при отсъствие на трите вида йони, но е налице в достатъчна степен да осигури синтеза на активна инулиназа. В следващите експерименти, докторантката установява, че по-

високите концентрации на Mn^{2+} (до 15 mM) обезпечават практически пълното превръщане на субстрата в млечна киселина (концентрация на продукта от 151 g/L, $Y=0.83g/g$). Това е най-високият добив на млечна киселина, докладван до момента.

Подобни изследвания са проведени и при проучване на максималния добив на фруктоза, като в тази част са установени и оптималните температурни условия, скорост на аериране, типа ферментация и кинетика на процесите. В резултат са установени оптималните условия за максимален добив на фруктоза. Най-висок добив на фруктоза (359 g/L) е получен при периодично култивиране с подхранване в хранителна среда с начален състав 25 g/L цикориево брашно, 10 g/L дрождев екстракт и 10 g/L бактопептон, култивиране при температура 33 °C, pH-5.5, разбъркване - 100 rpm, продължителност на процеса - 160 часа.

В глава VI. Обсъждане на резултатите е направено обобщение и сравнителен анализ на описаните в предходната глава резултати. Прави се извод, че действието на мангана не е само върху инулиназния ензим, но вероятно и върху ензимите от гликолитичната верига, но за съжаление не са посочени мнения на други изследователи по този въпрос, което вероятно би засилило значението му, както това е направено относно заключението, че липсата на соли и метални йони в средата възпрепятства транспорта на фруктоза през клетъчната мембрана. Значително внимание е отделено на механизма на действие на Mn^{2+} . Създадена е оригинална схема, демонстрираща алтернативните механизми на регулация, осъществявани от тези йони върху хидролизата на инулина, транспорта на фруктоза и генната експресия на *fosE* гена.

4. Основни научни и научно-приложни приноси.

1. За първи път е открит щам - *Lactobacillus paracasei* B41 (DSM 23505), способен в едностъпален процес да осъществи едновременно озахаряване и ферментация на инулина до икономически изгодни количества млечна киселина.
2. Чрез вариране на концентрацията на Mn^{2+} йони, както и избора на подходящ тип култивиране, авторите са открили пряк, сравнително лесен и икономически изгоден начин за управление на процесите на синтез в посока млечна киселина, фруктоза и т.н.
3. Получените 151 g/L МК, при добавяне на 15 mM Mn^{2+} към хранителната среда, е най-високият резултат, получен от инулин съдържащ субстрат до момента. Това подчертава решаващото значение на мангана в процеса на получаване на МК от инулин.
4. Получените от инулин съдържащ субстрат количества млечна киселина (151 g/l) и фруктоза (359 g/l) са най-високите постигнати до момента, което е предпоставка за приложението на изследваните процеси в биотехнологичната практика.
5. Създадена е логична, нова научна хипотеза за ключовото значение на Mn^{2+} при метаболизирането на инулина от щам *L. paracasei* B41.

5. Описание и оценка на представените материали:

Общият брой научни публикации на докторант Луиза Попова е 7. Три от тях са пряко свързани с разработката на дисертацията, като в една от тези три, докторантът е първи автор. Общият Импакт фактор от две от тях, публикувани в реномирани международни списания (*Bioresource Technology* и *Applied Microbiology and Biotechnology*) е 8.293. Третата публикация е обзорна и е посветена на получаването на ценни продукти от инулин. Може да се направи извода, че количествените показатели съгласно критериите в Правилника на ИИХ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор” са спазени и дори надвишени.

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

Наличните в чуждестранната научна литература цитати са 6 до настоящия момент. Всички те цитират една от статиите, излязла от печат едва през 2015 г. Тази бърза поява на цитати показва широкият интерес, който резултатите предизвикват в международната научна общност и потвърждават актуалността и значението на изследванията, посветени на разграждането на инулина с високоефективен микробен ензим.

7. Критични бележки и препоръки към научните трудове на кандидата.

Въпроси:

1. Към 1.1. от глава „Резултати” - За инулиназна активност са изследвани супернатанта, цели клетки и фракция клетъчни стени. Изследвано ли е наличието на подобна активност в осветлен клетъчен лизат?
2. В раздел 5.1.2.2. Влияние на киселинността на хранителната среда установявате най-висока инулиназна активност – 267 U/ml и нищожно количество остатъчни захари при наличие на 0.05 g/L MnSO₄ в хранителната среда. Това съответства ли на показаното на фиг.16, където инулиназната активност е най-висока по време на процеса с 10 mM Mn²⁺ ?

Препоръки:

1. По отношение формулирането на задачите – Вместо „оптимизиране на условията”, което предполага вече известни условия е по-добре да се напише това, което по-долу очертава новостта на разработката, а именно „изследване и установяване”.
2. В Литературен обзор, раздел 1.6. – Би трябвало ясно да се разграничи влиянието на металните йони върху синтеза на ензима и прякото влияние на тези йони в реакционната смес.
3. Препоръчително е ензимната активност (инулиназна) да бъде представяна не като U/ml, а като U/mg protein, което ще даде по-голяма обективност при оценяване на влиянието на изследваните фактори (pH, концентрация на метални йони и др.) и ще изключи прякото влияние на количеството биомаса върху интерпретацията и сравнението на получените резултати.

4. Към 5.1.2.5. Препоръчително е проучването на влиянието на Mn да бъде задълбочено и да се даде по-убедително обяснение за двустранното му въздействие като регулатор на експресията на *fosE* гена и активността на синтезирания ензим, а от друга страна да се обясни ролята му по отношение на натрупване на биомаса. За целта е нужно параметрите на средата и концентрацията на субстрата да останат непроменени или поне да не се променят едновременно. Възможно е манганът да въздейства и чрез друг механизъм върху метаболизма на клетките, освен описаното въздействие върху синтеза и регулацията на инулиназната, за което може да се съди по силното му въздействие върху натрупването на клетъчна биомаса.
5. Към 5.2.5. Влияние на азотните източници – при интерпретиране на резултатите от тези експерименти трябва да се има предвид, че и дрождевия екстракт и пептона освен източници на азот са и богат въглероден източник. Добре е да се обърне внимание на различната концентрация азот и въглерод, които се съдържат в различното общо количество такива източници, добавяно в различните експерименти – от 10 до 30 g/l.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Като обобщение мога да кажа, че представената дисертационна разработка съдържа значителна по обем експериментална и анализаторска дейност на високо ниво, в резултат на което са получени оригинални теоретични и научно-приложни резултати.

Въз основа на всичко изтъкнато до тук, считам че представената дисертация на тема „**Получаване на ценни биопродукти от инулин съдържащи субстрати**” отговаря на всички научни и законови изисквания и убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват положително за присъждане на научната и образователна степен “Доктор” на докторант **Луиза Георгиева Попова**.

27.04.2017

Рецензент



(доц. д-р Златка Алексиева)