

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на научната степен "доктор" при Института по инженерна химия при БАН

Автор на дисертационния труд: магистър Лидия Пламенова Цигорийна

Тема на дисертационния труд: Получаване на 2,3-бутандиол от инулин чрез модифициран непатогенен продуцент

Направление: 4.2. Химически науки

Научна специалност: Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология

Рецензент: проф. д-н Венко Николаев Бешков

1. Биографични данни за кандидата

Г-жа Лидия Пл. Цигорийна е завършила Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ през 2020 г. с научната и образователна степен „бакалавър“ по специалността „Биотехнологии“. Веднага след това постъпва на работа като технолог и по-късно като асистент в Института по инженерна химия при БАН, където работи понастоящем. Магистърската си степен получава по същата специалност в същия факултет през 2021 г. по тематика, сходна с темата на настоящия дисертационен труд. Участвала е в 5 изследвателски проекта под ръководството на проф. Калоян Петров (научен ръководител на дисертационния ѝ труд) и един под ръководството на проф. Драгомир Янков. Тематиката на проектите е близка до тази на дисертацията.

Маг. Л. Цигорийна е автор (в съавторство) на 10 научни публикации в списания с висок импакт-фактор ($ИФ > 4$) с квантили Q1 и Q2. Забелязани са 78 цитата върху публикациите.

Интересите ѝ са в областта на биотехнологиите, свързани с приложение на подходите на биопроцесното и метаболитното инженерство и микробното получаване на ценни метаболити с индустриално значение.

Маг. Л. Цигорийна е носител на две награди: на фондация „Акад. Стефан Ангелов“ (2021) за млад български микробиолог и наградата „Ив.Евст. Гешов“ на БАН за най-млад учен (2023).

2. Актуалност на разработвания проблем

Интересът към този род изследвания се определя от застрашителните климатични промени, свързани с енергетиката, използваща изкопаеми горива. В резултат са налице огромни емисии на въглероден диоксид с парников ефект. Примамлива е перспективата от замяната на въглерод-съдържащи горива с възобновяеми енергийни източници, в това число биопродукти, като биоетанол, биогаз,

биодизел и пр. Съединението 2,3-бутандиол (2,3-БД) е в тази категория. Освен като гориво той може да се използва като изходно вещество за различни синтези и производства, като разтворител, като добавка към други горива и пр. От тази гледна точка 2,3-бутандиолът отлично се вписва в концепцията за продукт на биорафинерия, поради перспективата то да се произвежда по ферментационен път от естествени суровини (въглехидрати) вместо от нефтени деривати. Този подход с използването на глюкоза, фруктоза и инулин е обект на рецензираната дисертация.

В дисертационния труд са цитирани 206 литературни източника, от които сто четиридесет и шест от тях са след 2000 г., а петдесет са след 2015 г. Това показва, че интересът към тези изследвания е голям и че тематиката е актуална, а авторът е запознат с най-новите постижения в областта.

3. Познава ли дисертантът състоянието на проблема и оценява ли творчески литературния материал?

В литературния обзор авторът се спира на актуалните въпроси за ферментационното получаване на 2,3-БД. Това са метаболитните пътища за различни щамове-продуценти, условията за получаване на оптични изомери с висок добив, на рацемични смеси, стратегиите за повишаване на ефективността на ферментационните процеси за този продукт, на щамове-продуценти и техните генни модификации.

Голямо внимание е отделено на значимостта на микробните щамове, известни в литературата и на техните способности да продуцират 2,3-БД в различни съотношения на оптично-активните изомери и рацемичната смес. Разгледани са и постиженията в генното модифициране на щамове от рода *Bacillus* и щамове *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*.

Разгледани са хранителните среди и процесните параметри, които имат влияние върху ферментационните процеси за производството на целевия продукт.

Целта и задачите на дисертационната работа са изведени от литературния обзор и са много добре формулирани. Цялостното впечатление е, че дисертантът владее добре литературния материал и борави свободно с него.

4. Кратка аналитична характеристика на естеството и оценка на достоверността на материала, върху който се градят приносите на дисертационния труд

Авторът логично представя методологията за извършване на опитните изследвания, започвайки с методите на планирания експеримент. След избора на щама *Bacillus licheniformis* 24 най-напред се отсяват значимите компоненти на хранителната

среда, следва оптимизация на уточнената хранителна среда и на различните процесни параметри за производство на 2,3-БД.(рН, температура и степен на аерация). При експерименталното доказване на модела в периодичен режим при оптимизацията на условията на ферментационния процес са постигнати много високи концентрации на крайния продукт (91,2 г/л) с добив, близък до теоретичния. Постигната е висока производителност, 1,94 г/л/ч. Постигнатите величини, споменати по-горе са близки до предвидените според математичния модел, изведен от планирания експеримент с което се доказва адекватността му.

Като субстрати-въглеродни източници са използвани глюкоза, фруктоза и инулин. Изследванията са проведени в периодичен режим и режим с подхранване (fed-batch). Сравнението на получените резултати за периодични режими показва, че при субстрати глюкоза и фруктоза се постигат високи концентрации на продукта (при глюкоза) и високи производителности (при фруктоза). И в двата случая добивът на 2,3-БД е близък до теоретичния. При режим на подхранване фруктозата се оказва подходящия субстрат.

Опитите с инулин като субстрат показват слабата активност на щама, която дори след генни модификации отстъпва на активността му при субстрати от монозахариди.

Във връзка с това смятам, че заглавието на дисертационния труд е непълно, тъй като най-значимите получени резултати са при използване на монозахариди, а не инулин.

Във всички случаи основен страничен продукт е глицеролът. Във връзка с това смятам, че би било добре, ако в текста беше поместена схема, показваща мястото на глицерола в метаболитните пътища за получаване на 2,3-бутандиол.

На стр. 78 (долу) се твърди, че „...ефектът от представената комплексна оптимизация на състава на средата и параметрите на процеса е най-очевиден, когато се сравняват резултатите от периодичната ферментация от глюкоза преди и след оптимизацията“. Какви са били параметрите на процеса „преди“ оптимизацията?

5. В какво се заключават научните и научно-приложните приноси на дисертационния труд?

Дисертационният труд има научен и практически характер, а приносите в него са предимно научно-фундаментални. Те са разделени на „изводи“ и „приноси“. За мен определените като „изводи“ имат стойността на приноси. По-общо казано, те са следните.

- Чрез методологията на планиране на експеримента са установени най-значимите компоненти на хранителната среда за получаване на 2,3-БД чрез щама *B. licheniformis* 24. Чрез планиране на експеримента са установени, оптималните концентрации на тези компоненти.
- Чрез планиране на експеримента от втори ред са установени оптималните стойности на процесните параметри за получаване на 2,3-БД чрез *B. licheniformis* 24 (температура; pH; скорост на аерация).
- При ферментацията на глюкоза от *B. licheniformis* 24 с повишаване на температурата се повишават: (а) скоростта на усвояване на глюкоза; (б) скоростта на формиране на 2,3-БД (продуктивността); (в) продуцирането на страничния продукт глицерол, като добивът на 2,3-БД намалява.
- При субстрат глюкоза при увеличаване на аерацията се повишава добивът на 2,3-БД, продуктивността му не се променя, а скоростта на усвояване на глюкоза и формирането на глицерол – намаляват.
- В периодичен процес с подхранване при субстрат глюкоза максималното количество 2,3-БД, който щамът може да продуцира при оптимални условия е 138.8 g/L, с добив близък до теоретичния (0.478 g/g) и продуктивност 1.16 g/L/h.
- В периодичен процес с подхранване при субстрат фруктоза максималното количество 2,3-БД, се продуцира при оптимални условия е 156.1 g/L, с добив от 0.46 g/g и много по-висока продуктивност- 2.17 g/L/h.
- Щамът *B. licheniformis* 24 притежава естествена инулиназна активност, която не е достатъчна, за да хидролизира инулина от цикориево брашно Frutafit® HD до ферментируеми захари. Въвеждането на ген *inu* от *Lacticaseibacillus paracasei* DSM 23505 (GenBank KP663715.1), кодиращ клетъчно свързана фруктан- β -фруктозидаза (EC 3.2.1.80) в *B. licheniformis* 24 води до 8.7 пъти увеличение на ензимната активност (трансформант T26). Въвеждането на ген *inu* от *Lacticaseibacillus paracasei* DSM 23505 в *B. licheniformis* 24 без домените му за свързване на ензима с клетъчната стена с цел ензимът да стане екстрацелуларен, води до 4.7 пъти увеличение на ензимната активност (трансформант T14).

- Модифицираният шам *B. licheniformis* 24 T26 е способен да хидролизира 140 g/L инулин, но полученото максимално количество 2,3-БД е едва 18.5 g/L, поради натрупване на захароза в културалната течност.

Приносите съдържат полезни препоръки за условията и възможностите за получаване на 2,3-бутандиол за практически цели. В тези препоръки се съдържа приложната стойност на дисертационния труд.

6. Може ли да се оцени в каква степен дисертационния труд и приносите представляват лично дело на дисертанта?

Представянето на текстовете на дисертацията и на автореферата показват, че разработването на дисертацията е дело на докторанта.

7. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Дисертационният труд се основава на три научни публикации, от които две в списания с висок импакт фактор (4.501 и 5.11) и квартали **Q1** и **Q2**. Третата е в списание с импакт-фактор 0,14 и квартал **Q4**. Налице са и 2 участия в конференции и други научни форуми. На една от научните публикации са забелязани 6 цитата.

Наукометричните данни напълно задоволяват изискванията за присъжданата образователна и научна степен “доктор” съгласно правилника на ИИХ-БАН.

8. Авторефератът направен ли е съгласно изискванията, правилно ли отразява основните положения и основните приноси на дисертационния труд?

Авторефератът правилно отразява съдържанието на дисертационния труд.

9. Заключение

Изложеното дотук ми позволява убедено да препоръчам на почитаемото жури да присъди научната степен "доктор" на магистър. Лидия Пламенова Цигорийна.

София, 19 януари, 2024 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:



(проф. д-р Венко Н. Бешков)