

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Драгомир Янков – ИИХ - БАН
член на научното жури по защитата на дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен „Доктор”

Автор на дисертационния труд: **Лидия Пламенова Цигорийна**, докторант на самостоятелна подготовка по специалност 4.2 Химически науки (Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология) към Институт по инженерна химия -БАН

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

Кратки биографични данни на кандидата: Маг. **Лидия Пламенова Цигорийна** е завършила висше образование с придобита степен бакалавър в Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“ през 2020 г. и е придобила степен магистър (специалност „Индустриални биотехнологии“) в същия университет през 2021 г. От 2020 г. Л. Цигорийна работи в ИИХ-БАН, първоначално като технолог, а от 2021 е назначена на длъжност „асистент“. Същата година е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка. Отчислена е с право на защита през 2023 г., като е покрила всички изисквания на закона и правилника на БАН.

Кратко описание на дисертацията: Дисертацията е посветена на микробно получаване на 2,3-бутандиол (2,3-БД) от инулин, чрез генетично модифициран щам *Bacillus licheniformis* 24. 2,3-БД е съединение с разнообразно приложение, чието нарастващо търсене през последните десетилетия води до непрекъснато повишаване на обема на производството му. През последните години нараства интересът към микробиологичното получаване на (2,3-БД), като изследванията са насочени към търсене на нови продуценти, повишаване на добива и използване на евтини и възобновяеми субстрати с оглед на подобряване на рентабилността на процеса. Темата на дисертацията е актуална с оглед на все по-голямото търсене на 2,3-бутандиол и оптимизиране на процеса на ферментационното му получаване. Представеният дисертационния труд е с обем от 102 страници. Дисертационният труд се състои от въведение, литературен обзор (37 стр.), цели и задачи, материали и методи (6 стр.), резултати (26 стр.), обсъждане на резултатите (6 стр.), изводи и приноси. Дисертацията съдържа 19 фигури и 16 таблици. Цитирани са 206 литературни източници, 60 (29%) от които публикувани през последните десет години, а 29 (14%) след 2019 г. Това показва, че дисертантът много добре познава литературата по проблематиката. В литературния обзор са разгледани свойствата на 2,3-БД, метаболитните пътища за микробното му получаване, различните продуценти, както и компонентите на хранителната среда и основните параметри, влияещи на процеса.

Дисертантът си е поставил за цел разработване на биотехнология за микробно получаване на 2,3-БД от инулин, чрез генетично модифициран щам *Bacillus licheniformis* 24.

За постигане на целта са формулирани следните задачи:

1. Оптимизиране на състава на хранителната среда за получаване на 2,3-БД;
2. Оптимизиране на процесните параметри за получаване на 2,3-БД;
3. Установяване на способността на дивия щам *B. licheniformis* 24 за конвертиране на инулин в 2,3-БД;
4. Клониране на ген за клетъчно свързана инулиназа (ЕС 3.2.1.80) от *Lactocaseibacillus paracasei* B41 (DSM 23505) в *B. licheniformis* 24;
5. Установяване на максималната възможност на модифицирания щам *B. licheniformis* 24 да продуцира 2,3-БД от съдържащо инулин цикориево брашно.

Оптимизирането на състава на хранителната среда и на параметрите на процеса е извършено с помощта на планирани експерименти. След статистически анализ и избор на значимите параметри са съставени уравнения, описващи процеса. След оптимизационна процедура са определени и оптималните стойности на параметрите за максимална продукция на 2,3-БД.

При намерените оптимални условия са проведени експерименти за получаване на 2,3-БД от различни субстрати – глюкоза, фруктоза в периодичен процес и периодичен процес с подхранване. Постигнати са много добри резултати, сравними с най-добрите описани в литературата.

С оглед подобряване на ефективността на процеса е направен опит за заместване на скъпоструващите захари с по евтин и достъпен субстрат - цикориево брашно. Резултатите показват, че *B. licheniformis* 24 няма достатъчна инулиназна активност за разграждане на инулина. За преодоляване на този проблем е извършено клониране на ген за клетъчно свързана инулиназа от *Lactocaseibacillus paracasei* B41.

За тази цел е избран *inu* генът на *Lactocaseibacillus paracasei* DSM 23505 кодиращ клетъчно свързана фруктан- β -фруктозидаза. Всички рекомбинантни конструи са въведени в *B. licheniformis* 24 чрез електропорация. Анализирани са около 150 клонове, от които са избрани два за по-нататъшни експерименти. Постигнато е осемкратно увеличение на инулиназната активност и въпреки че при ферментация на цикориево брашно (200 г/л) с рекомбинантния щам са получени само 18,5 г/л 2,3-БД, тези резултати са добра база за по-нататъшни изследвания.

Авторефератът пълно и достоверно отразява съдържанието на дисертационния труд.

Основни приноси на дисертационния труд:

1. Оптимизирани са съставът на хранителната среда и процесните параметри за получаване на 2,3-БД. При оптимизираните условия щам *B. licheniformis* 24 продуцира от глюкоза 138.8 г/л 2,3-БД, и 156.1 г/л 2,3-БД от фруктоза.

2. Успешно е въведен ген *inu* от *Lactocaseibacillus paracasei* DSM 23505 в *B. licheniformis* 24 чрез вектора pBE-S в два варианта – като конструктор pBES_Inu, съдържащ целия ген и като конструктор pBES_Inu-tr, съдържащ гена без домените му за свързване с клетъчната стена на гостоприемника.

3. Чрез въвеждане на конструктора pBES_Inu, на така модифицирания щам *B. licheniformis* 24 T26 е придадено качеството да продуцира 2,3-БД от инулин в процес на едновременно озахаряване и ферментация.

Научни публикации и участие в научни форуми: Дисертацията е построена върху резултати, публикувани в 3 статии с импакт фактор и 2 участия в научни конференции. Една от публикуваните статии е в списание с квартил Q1 и е цитирана

6 пъти, втората е с Q2 и третата с Q4.

Нямам особени забележки по дисертационния труд с изключение на някои правописни и граматически неточности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Изложеното дотук ми дава основание да твърдя, че представените резултати, по обем и качество, отговарят напълно на изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за приложението му, както и на Правилника на БАН. Препоръчам на уважаемото жури да присъди на маг. **Лидия Пламенова Цигорийна** образователната и научна степен "доктор" и ще гласувам напълно убедено с „ДА“.

София
29.1.2024


(проф. д-р Драгомир Янков)