

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Венета Иванова Грудева, Софийски университет „Св. Кл. Охридски”, Биологически факултет

на дисертационен труд, представен за защита за получаване на образователната и научна степен „доктор”

Автор на дисертационния труд: Емилия Иванова Писарева

Тема на дисертационния труд: „Изследване на механизма за биосинтеза на цитринин при гъби от род *Monascus* ”

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Филаментозните гъби от род *Monascus* са известни с потенциалите си възможности за използване в различни биотехнологии. Тези гъби са продуценти на различни вторични метаболити - пигменти, монаколини, метилкетони, които имат широко приложение. Особено актуални са пигментите, продуцирани от посочения род. Нарастването на търсенето на природни, естествени пигменти за употреба в различни сфери на леката промишленост, налага изолирането и селектирането на щамове гъби от род *Monascus*, притежаващи свойството да синтезират такива вещества. Много често обаче, в процеса на култивиране, биосинтезата на пигментите е съпътствана продукция на микотоксина цитринин, в резултат на което желаните крайни продукти са и със съдържание на нежелания микотоксин. Това ограничава използването на *Monascus* - пигментите и други продукти, получени с тяхно участие. Естествено възниква въпросът за търсенето или получаването на щамове, при които съпътстващата синтеза на цитринин е блокирана или силно

редуцирана. За съжаление механизмите на биосинтезата на пигментите от род *Monascus* както и метаболитните пътища за синтезата на цитринин се нуждаят от допълнителни изяснявания, независимо от интензивните изследвания в тази насока през последните години. Изясняването на механизма на биосинтеза на цитринин на генетично, биохимично и физиологично ниво, както и на възможните начини за неговата регулация биха дали възможност за продукцията на свободни от цитринин *Monascus*-пигменти. В този смисъл представената дисертация третира изключително актуален проблем за биосинтетичните възможности на гъбите от род *Monascus* в частност, както и за филаментозните гъби като цяло. Затова считам, че настоящата дисертация третира проблеми на гъбния метаболизъм, представляващи сериозен фундаментален интерес. Съществува потенциална възможност и за практическо използване на резултатите от изследванията при разработване на технология за продукция на пигменти, свободни от цитринин.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е построен според изискванията за такъв род трудове, като е съставен от 7 раздела: Увод (2 стр.), Литературен обзор (43 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (11 стр.), Резултати и обсъждане (102 стр.), Изводи (2 стр.), Списък на използваната литература (съдържа 313 източника, 309 на латиница, 4 на кирилица, 109 източника от последните 10 години включително и такива от 2012 г.). Общият обем на труда е 201 стандартни А4 формат страници, включващ 19 таблици и 50 фигури.

2.1. Литературен обзор

В обзора е представено подробно описание на аскомицетните гъби с акцент върху особеностите в морфологията, размножаването,

физиологията на тези от род *Monascus* както и подходите в таксономията на посочените гъби. Подробно е представена и критично анализирана информацията за биосинтезата на вторични метаболити от посочения род, участието на главните метаболитни пътища и пост синтетичните модификации. Особено подробно са разгледани факторите, влияещи върху биосинтезата на цитринина като е направен задълбочен анализ на наличните литературни данни в това отношение. Представена е информация за експресията на гените за цитрининовата биосинтеза на гъбите от род *Monascus*. Коментира се и еволюционната стабилност на гените, имащи отношение към биосинтезата на посочените метаболити.

От анализа на литературния обзор могат да се очертаят няколко характеристики на докторанта, а именно:

- Висока микробиологична и генетична осведоменост на докторанта по отношение на филаментозните аскомицети
- Отлично познаване на съвременното състояние на таксономията на гъбите както по отношение на класическите така и на молекулните подходи
- Ясно изпъкващо умение на докторанта да борави с разностранна литература, да я анализира и обобщава

Литературният обзор е написан много четивно, ясно и коректно. Съществуват някои технически неточности, които докторантката може да отстрани. Считам, че този раздел от дисертацията я представя като отлично подготвена в направлението на дисертационна тема, което е съществено за успешна експериментална работа.

2.2. Цел и задачи

Целта на дисертационния труд е изследване на метаболитните и генетичните особености на цитринин несинтезиращи гъби от род *Monascus*.

За постигане на целта са формулирани 5 основни задачи с доста под задачи. Тези задачи са ясно дефинирани и точни и дават уверение, че поставената цел ще бъде постигната

2.3. Материали и методи

Разделът (11 стр.) съдържа прецизно описани използваните в работата материали, както и приложените за изпълнението на задачите методи. Подробно са описани използваните микроорганизми и техния произход, използваните хранителни среди, култивационните методи, таксономичните схеми за изследвания на род *Monascus* както и други аналитични методи. Представени са методите за определяне на концентрацията на синтезираните пигменти, електрофоретичните анализи на изоензимния профил, методите за определяне на наличие на цитринин. Описани са и използваните биоинформатични методи за идентификацията на гените, кодиращи ключови ензими от централния метаболизъм както и тези за разпознаване на белтъци с различна локализация в гъбните клетки.

Описаните методи са подходящо избрани и дават възможност за изпълнение на задачите. Това са съвременни методи, изискващи сериозна теоретична подготовка и практически умения, които очевидно докторантът притежава.

2.4. Резултати и обсъждане

В този раздел (102 стр.) са изложени и обсъдени получените от докторанта резултати по реда на поставените задачи. Докторантът е осъществил скрининг на 16 щама, принадлежащи към род *Monascus* за продукция на цитринин и пигменти като установява, че два от тези щамове не синтезират пигменти. За останалите 14 щама подробно е анализирал типа на продуцираните пигменти и условията при които те

се синтезират. Установено е, че при два от щамовете тези пигменти не са екстрацелуларни.

Подробно е анализирана способността на щамовете да синтезират цитринин и е установено че само 4 от тях не притежават свойството да синтезират този микотоксин. При един от щамовете е доказано, че синтезира пигменти без да продуцира цитринин. Това е повод за обстоен анализ на литературните данни за връзката между пигментообразуването и биосинтезата на цитринина.

Сериозна част от резултатите представляват таксономичните изследвания на щама, не синтезиращ цитринин. Тези изследвания за осъществени по перфектен начин и дават убедителни доказателства, че изследваният щам принадлежи към вида *Monascus pilosus*. За тези изследвания са използвани методи на класическата таксономия, но това не намалява тяхната стойност тъй като молекулно генетичните подходи в таксономията на гъбите са все още изключително слабо застъпени.

В раздела са представени и резултатите от задълбоченото изследване на влиянието на различни физични и химични фактори върху биосинтезата на пигментите и цитринина като е изучено влиянието на състава на хранителната среда - ниско молекулни въглеродни източници, азотните източници и други. Задълбочено е изследвано влиянието на рН върху двете биосинтези като са проследени ефектите на голям брой стойности на този параметър. Анализирана е кинетиката на растеж на щама в зависимост от промяната на рН. Проследено е влиянието на концентрацията на разтворен кислород върху биосинтезата на пигменти и цитринин, включително хипокси- и анокси условия. На базата на тези изследвания са направени логични заключения за влиянието на

посочените фактори както върху растежа на щама така и върху биосинтетичния му потенциал.

Резултатите са дискутирани компетентно в сравнителен аспект и представляват фундаментален интерес както и добра основа при евентуално разработване на технология за продукция на пигменти.

Съществена част от работата на докторантката е свързана с изследване на ключови ензими от централния метаболизъм на щамовете от род *Monascus*. Използвани са два подхода – биохимични анализи и *in silico* биоинформатичен анализ. Обект на анализ са 4 щама – безцитрининовия *Monascus pilosus* C1 и три щама, продуциращи пигменти и цитринин. За охарактеризиране на клетъчната пластичност и механизмите на регулация на вторичния метаболизъм са изследвани осемнадесет гена и тяхната експресия. Целевите гени са свързани с ензими, участващи във въглеродния и азотния метаболизъм и антиоксидантната защитна система. Сравнителният анализ на биоинформатичните данни дава възможност да се направят важни заключения за пластичността на метаболизма и механизмите на регулация. В този раздел са представени убедителни данни че видът *Monascus pilosus* C-1 има нарушена регулация на биосинтезата на цитринин. На базата на получените резултати и задълбочения анализ на литературните данни са предложени модели за регулацията на биосинтезаната на пигменти и цитринин и ролята на вторичния метаболизъм в адаптационните механизми при гъбите от род *Monascus*.

Получените резултати са сполучливо анализирани и обобщени в заключителната част и е представен модел за ролята на вторичните метаболити в клетъчните адаптационни стратегии.

Отлично обобщение на резултатите е представено и в представеният автореферат на дисертацията.

2.5. Изводи и приноси

Въз основа на огромната по обем експериментална работа са направени 8 основни извода. Те са логично следствие от получените резултати. Същевременно обаче трябва да отбележа, че изводите 1-3 са прекалено общи и имат по-скоро характер на приноси и се нуждаят от прецизиране.

Дисертационния труд има както фундаментални така и приложни приноси :

- Проведен е скрининг на щамове от род *Monascus* за продукцията на пигменти и цитринин. Селекциониран е щам, продуциращ пигменти и не синтезиран цитринин.
- Селекционираният щам е идентифициран на базата на класическата таксономия на гъби като представител на вида *Monascus pilosus*
- Използван е оригинален алгоритъм за изследване на влиянието на състава на хранителната среда, рН и количеството на разтворения кислород върху биосинтезата на цитринина.
- Чрез биоинформатичен анализ на гените, кодиращи ключови ензими от въглеродния и азотния метаболизъм и антиоксидантната ензимна защита е установено, че генотипните особености на щама *Monascus pilosus*-C1 не възпрепятствуват продукцията на цитринин. Създаден е биохимичен и *in silico* модел за сравнително изследване на вторичния метаболизъм при аскомицетните гъби.
- Установено е, че изследваният щам се характеризира с висок адаптационен и quorum sensing потенциал, дължащ се на генни дупликации
- Доказано е, че биосинтезата на цитринин при изследваните видове е свързана с наличието на специфичен ген, отговорен за пост-транслационната модификация на синтезираните вече поликетидни съединения.

3 Препоръки, забележки и въпроси

Към дисертационния труд могат да бъдат направени някои забележки. Значителна част от тях са предимно от технически характер и няма да бъдат дискутирани. Забележките по същество бяха отразени в предварителната рецензия и с удоволствие констатирам, че докторантът напълно се е съобразил с тях.

Към докторанта имам следните въпроси:

1. Въз основа на проведения изоензимен анализ върху централния въглероден и азотен метаболизъм, както и върху антиоксидантната защитна система може ли да се направи обобщаващ извод кой от четирите изследвани щама от род *Monascus* притежава най-висок потенциал за адаптация към променящите се фактори на средата?
2. В своята работа докторантката посочва, че генният клъстер за биосинтеза на цитринин при гъби от вида *Monascus purpureus* е добре изучен и е изграден от цитрининова поликетид синтаза (*pksCT*) и пет отворени рамки за четене (*orf1-orf5*). Правени ли са подобни изследвания при други гъбни микроорганизми и има ли информация за нивото на консервативност между различните цитринин синтезиращи видове?
3. Какво е значението на аскомицетните гъби за биотехнологичните производства и как вижда докторантката бъдещото използване на селектирания от нея щам,непродуциращ цитринин?

4 Публикации във връзка с дисертационния труд

Докторантът е представил списък на научните публикации и участия в научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд. Той включва четири излезли от печат публикации, които са в списания с импакт фактор и една заявка за патент. Във всички публикации Емилия Писарева е първи автор. Първи автор е и в 5 участия в научни форуми.

Докторантът е участвувал активно в 9 научно-изследователски и образователни проекти, финансирани от фонд “Научни изследвания” и ЕС, което е гаранция за възможността ѝ за научно-изследователска дейност и работа в екип.

6. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантката Емилия Писарева е придобила компетенции и умения, които могат да бъдат групирани както следва:

- Разширила е теоретичната си компетентност в областта на микробиологията, молекулярната биология и биоинформатиката.
- Изградила е умения за изучаване на метаболизма на гъби с различен таксономичен статус
- Изградила е умения за таксономични изследвания на гъби
- Изградила е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научната информация
- Придобила е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите, получени в хода на разработването на дисертацията, както и да прави изводи на базата на тях.

Всичко това ми дава основание да считам, че тя е придобила компетенции и умения, които се изискват за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

7. Заключение

Извършването на експерименталната работа, оформянето на дисертационния труд, включващо представянето и дискутирането на резултатите, ми дават основание да считам че, Емилия Писарева е

усвоила теоретични знания и методични умения, напълно съответстващи на тези за третата степен на обучение и се е изградила като надежден млад изследовател с високи методични умения в областта на микробиологията и в частност еукариотни микроорганизми, молекулярната биология и биоинформатиката.

Дисертационният труд представлява комплексно научно изследване по актуална тема и осъществено на високо научно ниво, със съществени фундаментални приноси и потенциална възможност за практическо приложение на получените резултати.

Направените забележки имат повече технически характер и по-малко се отнасят към същността на работата. Относително малко познавам Емилия Писарева, но и при оскъдните ми контакти с нея съм с впечатлението за амбициозен млад специалист, притежаващ добра подготовка особено по таксономия на гъби, човек последователен и отговорен в работата си. Същевременно добре познавам нейният научен ръководител, който е добре утвърден специалист в изучаване на гъбния метаболизъм както и лабораторията, в която е разработена дисертацията. Очевидно е че тя е част от младия и амбициозен екип на лабораторията утвърждаващ в последните години биоинформатичното направление в изучаване на гъбния метаболизъм, което е актуално както в световен аспект така и за катедрата.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академични състав в Република България считам, че настоящият труд отговаря напълно на изискванията за докторска дисертация.

Убедено препоръчвам на научното жури, сформирано със заповед № РД38-2/07.01.2013 на Ректора на СУ” Св.Климент Охридски” да оцени по достойнство настоящия научен труд и присъди на

докторантката Емилия Иванова Писарева образователната и научна степен „доктор” по научната специалност Микробиология шифър 01.06.12.

Рецензент:

(проф. д-р В.Грудева)

25.02.2013

София