

## РЕЦЕНЗИЯ

**На Дисертационен труд: Изследване на механизма за биосинтеза на цитринин при  
гъби от род *Monascus***

**За придобиване на научната и образователна степен „доктор”  
от Емилия Иванова Писарева,  
катедра Обща микробиология, БФ, СУ „Климент Охридски”**

**Научен ръководител: Доц. А. Куюмджиева**

**Рецензент: доц. Маргарита Камбурова, Институт по микробиология, БАН**

Гъбите са добре познати продуценти на важни за човека продукти, сред които представителите на род *Monascus* са особено ценни със способността си като вторични метаболити да синтезират пигменти, метилкетони и монаколини, намиращи приложение съответно като естествени оцветители, ароматизатори и препарати за намаляване на холестерола. Предимство на такива процеси е използването на евтини хранителни среди, понякога и на отпадъчни продукти, а основен недостатък е синтезата като ко-продукт на микотоксина цитринин, характеризиращ се с мутагенен, канцерогенен и тератогенет ефект, което налага необходимостта от непрекъснат контрол на нивата му при промишлено производство на целевите метаболити. Представеният ми за рецензиране дисертационен труд „Изследване на механизма за биосинтеза на цитринин при гъби от род *Monascus*” с автор докторант Емилия Писарева е написан съгласно стандартните изисквания за докторска дисертация с основни раздели: Литературен обзор (45 стр.), Цел и задачи (2 стр.), Материали и методи (11 стр.), Резултати и обсъждане (98 стр.). Въз основа на получените експериментални данни, както и на проведения *in silico* анализ на ензимните гени, са формулирани осем извода, отразяващи най-важните получени резултати и са посочени пет научни приноса на дисертационния труд. Материалът е много добре онагледен с 50 фигури и 19 таблици. Включени са 316 литературни източника, от които 313 на латиница. В дисертационния труд са цитирани редица работи на лабораторията, в която е разработван дисертационния труд, свидетелстващи за заслуженото място на колектива като водеща лаборатория в проучване на биосинтезата на ценни за промишлеността вторични метаболити от гъби, а полученият резултат за биосинтеза на

свободни от цитринин пигменти от щам *M. pilosus* C<sub>1</sub> е с изключително индустриално значение.

В частта **Литературен обзор** стегнато и логично са описани особеностите на род *Monascus* - неговата таксономия, морфология и физиология, както и на синтезираните от него вторични метаболити. В предвид индустриалната насоченост на получените в работата резултати е обърнато специално внимание на токсичното действие на микотоксина върху широк спектър живи организми. Докторантката описва подробно гените, свързани с вторичния метаболизъм.

Въз основа на направения обзор, отразяващ недостатъчно изяснената и често спорна регулация на синтеза на цитринин се оформя и **Целта** на работата - изследване на метаболитните и генетични особености на цитринин несинтезиращи гъби от род *Monascus*, за изпълнението на която са формулирани пет взаимно свързани и логично следващи основни задачи.

Частта **Материали и методи** представя богата гама от методи, подбрани в съгласие с поставените цели - класически и модерни микробиологични, биохимични, и биоинформатични, включително морфологични и физиологични изследвания на щамовете, ферментационни процеси и тяхното характеризиране с кинетични параметри, ПАГ електрофорези, хроматографски техники, *in silico* анализ. Усвоеният набор от техники очертава добрата микробиологична, биохимична и биоинформатична подготовка на докторанта.

В частта **Резултати и обсъждане** е представен значителен по обем експериментален материал, задълбочено анализиран и интерпретиран. Тази част се състои от четири основни раздела:

1. Характеризиране на кинетичните параметри на растеж и продукция на пигменти и цитринин от 16 щама, отнесени към три вида от род *Monascus* с цел избор на перспективен щам за по-нататъшна работа. Изолирани са два щама, които синтезират задоволителни количества пигменти, без да синтезират цитринин. Показалият по-висока продуктивност, *Monascus* sp. C<sub>1</sub> е таксономично определен въз основа на морфолого-културалните и някои физиологични свойства като принадлежащ към вида *M. pilosus*.
2. Ферментационни процеси за доказване невъзможността за синтеза на цитринин от щам *M. pilosus* C<sub>1</sub> при всички тествани условия. Представен е значителен обем експериментален материал, касаещ проучването на редица физични и химични фактори върху биосинтезата на пигменти и (не)синтезата на цитринин,

съпроводени с подробен анализ на редица кинетични параметри. Изследваните за присъствие на цитринин над 120 проби показват, че никой от изпитаваните физични и химични фактори (състав на среда, рН, различно количество разтворен кислород) не провокира синтеза на ензима поликетид синтаза, свързан със синтеза на микотоксина, което е основен принос на работата, очертаващ перспективите за индустриалната му експлоатация. Доброто познаване на метаболитните пътища позволява на докторантката творческа интерпретация на резултатите относно влиянието на различните въглеродни и азотни източници и обяснения на степента на синтеза на вторични метаболити на молекулно ниво.

3. С помощта на биоинформатични и биохимични методи е направена оценка на относителната роля на ензимите от централния въглероден и азотен метаболизъм, както и на тези от антиоксидантната ензимна защита в продукцията на вторични метаболити, с техните изо-форми и тяхната експресия. Сравнени са 18 броя гени в четири щама на род *Monascus*: *M. pilosus* C<sub>1</sub>, *M. purpureus* АКС, *M. purpureus* 94-5 и *M. purpureus* M<sub>12</sub>. Прилагането на биоинформатичния алгоритъм свидетелства за доброто усвояване от докторантката на съвременните биоинформатични технологии, умело обяснявайки различията между биоинформатичния анализ и експерименталните резултати, например разликата в определения от геномния анализ брой на гените, кодиращи даден ензим и установения чрез електрофореза брой изоензими. След проведените биохимични и *in silico* анализи на цитринин и пигмент образувачи и необразувачи видове от род *Monascus*, авторката стига до извода, че не е установена съществена разлика във функционирането на ключови ензими от централния метаболизъм и ензимната антиоксидантна защита и кодиращите ги гени при четирите сравнявани щама.
4. *in silico* анализ на гена, кодиращ белтъка, изпълняващ ролята на активатор на ензима поликетид синтаза. Опитвайки се да стигне до генетичната основа на цитрининовата синтеза, докторантката доказва въз основа на *in silico* анализ висока хомоложност на активатора на гена за поликетид синтаза при видовете *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae* и *Monascus purpureus*. На генетично ниво се доказва липса на ген за активатора на ензима в *M. pilosus* C<sub>1</sub>.

Направените от докторантката осем извода отразяват значимостта на основните получени резултати.

Докторантката е първи автор на четири публикации, в три от които са отразени резултати от дисертационния труд, което демонстрира активното ѝ участие в разработваните проблеми. Работите са публикувани в списания с Импакт Фактор, което е признание за значимостта на получените резултати от научната общност. Съавтор е и на подадена заявка за патент. Тя е първи автор и на постерните работи, представени в пет научни форума. Представеният автореферат много добре отразява дисертационния труд и е изключително добре илюстриран. Доказателство за научната активност на докторантката е участието ѝ в изпълнението на девет проекта, част от които образователни, а друга част - научни, свързани не само с гъбите, но и с дрождите, свидетелстващо за всестранната ѝ микробиологична подготовка. Понастоящем тя е ръководител на проект към НИС-СУ „Св. Кл. Охридски“.

#### **Въпроси:**

1. Впредвид важноста на направените изводи и постигнатите приноси, смята ли докторантката да продължи изследванията в това направление?
2. Защо не е включена температурата като фактор, влияещ върху синтеза на вторични метаболити?
3. Авторката посочва, че разработеният *in silico* модел за сравнителен анализ на ензимни гени е приложим и към поликетид синтазните гени, пряко свързани със синтеза на цитринин. След като е идентифициран гена за поликетид синтазния ензим в три вида от рода, защо той не е включен в *in silico* анализа?
4. Въз основа на малкия брой идентифицирани СОД при *M. pilosus* C<sub>1</sub> е предположено участие на синтезираните от щама пигменти като алтернативен механизъм за детоксикация. Предвиждат ли се експерименти за повишаване синтеза на пигменти от този шам чрез действие с фактори на стреса?

#### **Препоръки:**

1. Бих препоръчала включването и на генетични методи при таксономичното определяне на щама.
2. Би било хубаво съобщените за растежа и продукцията на *M. pilosus* C<sub>1</sub> кинетични параметри да бъдат сравнени с получените за други продуценти на пигменти, за да се добие представа за перспективността за индустриална експлоатация на щама.
3. Впредвид възможността за индустриално използване на щама бих препоръчала провеждането на експерименти, за да се установи при каква стойност на

остатъчен кислород се наблюдава максимално количество пигменти и дали при този щам е същата като описаните в литературата 60%.

4. Тъй като докторантката доказва невъзможност за провокиране на цитрининова синтеза само при един от щамовете на вида *M. pilosus*, препоръчвам това свойство да не се определя като видов белег, докато не се докаже и при други щамове от вида, още повече че различни щамове от един и същи вид могат да имат различна способност за синтеза на вторични метаболити, както се вижда от табл. 2 и 4.
5. Впредвид липсата на експерименти, свързани с гена, кодиращ синтеза на цитрининовата биосинтеза (pksCT), извод 7 и принос 4 да бъдат формулирани като хипотетични.
6. Да не се ползва изразът „в условията, индуциращи биосинтезата на цитринин при щам *M. pilosus* C1» (стр. 153, 155), тъй като такава синтеза не е индуцирана.
7. Фиг. 47 – изразът „белтъците, определящи регулатора на цитрининовата биосинтеза” да се замени с „белтъците, регулиращи цитрининовата биосинтеза”.

#### **Новост на работата:**

Предложената ми за рецензиране научна разработка се характеризира със солидни научно-приложни приноси, подредени в следния ред въз основа на моята оценка за тяхната значимост:

- Селекционираният щам *M. pilosus* C1 синтезира значителни количества пигменти, свободни от микотоксина цитринин.
- При проучване влиянието на редица химични и физични фактори върху синтеза на вторични метаболити от щама е установено, че никой фактор не провокира цитрининовата биосинтеза.
- Създаден е биохимичен и *in silico* модел за сравняване на ключови гени за ензими от централния метаболизъм и свързани с антиоксидантната защита, отговорни за поддържане на клетъчния пул от прекурсорни молекули. Чрез този модел е доказано, че липсва пряка връзка между тези ензими и синтеза на цитринин.
- Доказано е, че активирането на цитрининовата биосинтеза е свързано с наличието или мутирането на специфичен ген.
- Получените в труда резултати за влиянието на рН върху продукцията и типа на синтезирани пигменти са съществен принос в проучване на регулацията на

пигментната синтеза, тъй като такова влияние е проучено при други гъби, но не при род *Monascus*. Чрез вариране на рН може да се регулира видът на синтезираните пигменти според индустриалните нужди.

### **Заклучение**

Представеният ми за рецензиране труд оценявам като цялостна, логично поставена и прецизно изпълнена работа върху актуален проблем, водеща до изключително важен за промишлеността извод, а именно способността за биосинтеза на свободни от цитринин пигменти от щам *M. pilosus* C<sub>1</sub>. Използването на класически микробиологични и биохимични методи, както и на модерните *in silico* методи за анализ очертават докторантката като добре подготвен и много надежден млад микробиолог, поради което си позволявам да препоръчам на уважаемите членове на журито, назначено със заповед Д038-2/07.01.2013 на Ректора на Софийски Университет „Климент Охридски”, да присъди на Емилия Иванова Писарева образователната и научна степен „доктор” по научна специалност 01.06.12 – Микробиология, професионално направление 4.3. – Биологически науки.

20 февруари 2013 г.

София

Рецензент:

/доц. М. Камбурова/