

РЕЦЕНЗИЯ

на Дисертационен труд на тема: „Екстрацелуларен електронен пренос в еукариотни биоелектрохимични системи”,
представена за придобиване на научната степен „Доктор на науките”
в научна област 4. Природни науки, математика и информатика,
професионално направление 4.3 Биологически науки,
научна специалност „Биохимия”

Автор: Йолина Валентинова Хубенова

Рецензент: доцент д-р Светла Петрова
Катедра Биохимия, Биологически факултет при СУ

Актуалност на дисертационната тема. През последното десетилетие се наблюдава засилен интерес към процесите на трансформация на енергията на дискретни нива и електронен пренос в живите клетки, а биохимичните и биофизични изследвания върху структурата на редокси преносителите, механизмите на пренос и катализа, все повече се прилагат в създаването на нови биоелектрохимични системи. Живите организми са най-съвършените енергетични системи, поради високата ефективност и специфичност на окислително редукиращите процеси, катализирани от оксидоредуктази, и именно способността им да съхраняват и използват отделената при окислението енергия се превръща в обект на биокаталитични изследвания и създаване на нови „горивни елементи”. В наши дни, от биоелектрохимичните системи се очаква да предложат комплексно решаване на два основни проблема: 1) енергийната криза и необходимостта от обезпечаване с евтина, достъпна, „чиста” енергия; и 2) екологичното замърсяване. За преработката на твърди битови отпадъци вече се прилага нова перспективна и обещаваща технология, обозначена като „преход от енергия за обезвреждане на отпадъци” към „енергия от отпадъци” и целта е подобна иновационна стратегия да бъде въведена и за пречистването на отпадните води. Използвайки метаболитната приспособимост на микроорганизмите към условията на средата чрез ензимното разграждане и модифициране на съдържащите се в нея органични химични съединения, биокаталитичната технология ги превръща в микробиални горивни елементи, способни директно да трансформират химичната енергия в електрическа.

В този смисъл, дисертационният труд е изключително съвременен и интегрира научните изследвания върху механизмите на биоелектрохимичната активност на използваните организми-биокатализатори и създаването на комплексна оценка за възможностите им да генерират електрическа енергия. Досега изследванията са концентрирани основно върху прокариотни организми като *Geobacter sulfurreducens*, *G. metallireducens*, *Shewanella*

oneidensis, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и определени видове дрожди - *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* и *Arxula adenivorans*. Йолина Хубенова прилага интердисциплинарен подход за конструирането на дрождеви горивен елемент от неизследван досега щам *Candida melibiosica* 2491.

Биохимичните изследвания на механизмите на екстрацелуларен електронен пренос в присъствие на ендогенни и екзогенни медиатори заемат особено място в дисертационния труд. Чрез тях се доказва степента на метаболитна приспособимост към условията на средата, промяната в регулацията на катаболитните пътища на използваните биокатализатори и ролята на специфични оксидоредуктази за екстрацелуларния електронен пренос. В научно-приложен аспект, дисертационният труд предлага потенциални практически приложения, свързани с трансформиране на микробиалните горивни елементи в микробиални електролизни клетки, чиито бъдещи предизвикателства са генерирането на енергия от отпадни води и получаването на ценни продукти от различни изходни субстрати.

Д-р Йолина Хубенова представя ново изследователско направление в България, което има амбицията да наложи приложението на микробиалните горивни елементи в практиката след обстойно изследване, оптимизиране на условията и създаване на методология за охарактеризиране на определена биоелектрохимична система.

Структура и характеристика на дисертационния труд. Дисертационният труд на Йолина Хубенова е написан на 194 страници, последвани от 19 страници литературна справка от 234 източника (повече от 85%, от които след 2000г.) и 4 приложения, включващи математически модел за изчисляване на неопределеността на измерванията (4 стр.), и списъци с публикации, участия и цитати /20 стр./ . Целите и задачите са формулирани на 1 стр. веднага след увода (2 стр.), а най-важните акценти, резултати и потенциални приложения на интердисциплинарния подход са обобщени в Резюме от 7 стр. Дисертационният труд е илюстриран със 116 фигури и 8 таблици, като легендите им са представени и самостоятелно в отделни списъци /13 стр./.

Основната цел на дисертационния труд е комплексна оценка на възможността за генериране на електрически ток от биогоривни елементи (еукариоти като биокатализатори), за постигането на която се дефинира „специфична цел” - „оптимизиране на условията за осъществяване на екстрацелуларен електронен пренос с оглед увеличаване на изходните електрически характеристики на биоелектрохимичните системи и потенциалните им приложения”, която е реализирана с научно-изследователска програма от 7 конкретни задачи.

Д-р Йолина Хубенова е структурирала дисертационния си труд монографично в 5 основни раздела, като ролята на литературен обзор изпълняват първите два от тях, отразяващи необходимостта от изследването, развитието и постиженията на технологиите използващи микробиални горивни елементи, както и основните понятия свързани с проучването, като биоенергетика, метаболизъм, екстрацелуларен електронен пренос и принципи на действие на биоелектрохимичните системи. Тези раздели са написани много

компетентно и стегнато като показват, не само задълбочените познания на д-р Хубенова за биоелектрохимичните системи и научните подходи за тяхното изследване, но и способността ѝ да ги представи достатъчно информативно и разбираемо.

В дисертационния труд няма обособена глава „Материали и методи”, а използваните биохимични (*определяне на различни ензимни активности, кинетика, метаболитни концентрации*), аналитични, микробиологични, хроматографски, физикохимични (*за охарактеризиране на използваните нови електродни материали, включително сканираща електронна микроскопия*) и химични методи само са изброени. За първи път е разработена и приложена специална хемометрична методика за оценка на дела на източниците на неопределеност и подобряване на възпроизводимостта на получените резултати. Приложимостта на тази статистическа методика към всяка /био/електрохимична система, само по себе си, е принос на дисертационния труд.

Йолина Хубенова е разгледала в отделен раздел биоелектрохимичните методи, характеристиките на поляризационните криви, източниците на енергийни загуби и цикличната волтамперометрия, които основно използва за измерване на окислително-редукционните процеси в системата. Този раздел е написан изключително разбираемо и отразява подробно всички фактори, които биха могли да повлияят на измерването и от които зависят прецизността и достоверността на експериментите. Всички използвани методи показват високата степен на професионална квалификация на д-р Хубенова. Тъй като, в дисертационния труд са използвани много различни методи, които си взаимодействат и допълват информационно, бих предложила на Йолина Хубенова да ги публикува, под формата на самостоятелно ръководство за охарактеризиране на биоелектрохимични системи.

Основните резултати от интердисциплинарния подход са представени в 3 раздела, които не са обособени и дефинирани самостоятелно в „Резултати и дискусия”. В тях акцентите се поставят последователно, съобразно с поставените задачи, а приносите на дисертационния труд са произтичат от всички, различни по сложност, моделни системи, които използва. Основният раздел – „Интердисциплинарен подход за охарактеризиране на биоелектрохимични системи” (цел на дисертационния труд) - представя резултатите от: разработването на комплексна методология за установяване на екзоелектрогенни свойства на организми и проверка на функционалността ѝ върху прокариоти; прилагането на тази методология за изследване на биоелектрохимичното поведение на еукариоти; изясняване на механизма на екстрацелуларния електронен пренос; доказване на способностите на дрождевия горивен елемент за генериране на електрическа енергия; и конструиране на биогоривни елементи, използващи висши еукариоти /растения/ като биокатализатори.

Предварителните изследвания на електрогенността като подход изискват серия от множество експерименти и конструиране на моделна система, тествана и оптимизирана

първо на чисти прокариотни (*Bacillus cereus* - 330 mA/m², *Proteus vulgaris* - 120 mA/m², *Pseudomonas aeruginosa* G28 – 100 mA/m² и *Staphylococcus citreus* - 90 mA/m²) и еукариотни култури. В хода на тези изследвания е проследена биоелектрохимичната активност на бактериален консорциум при млечно-кисела ферментация и на дрожди при алкохолна ферментация; конструиран е растителен биогоривен елемент, използвайки горски мъх *Dicranum montanum* (Bryophyta-МГЕ); конструирани са седиментни горивни елементи (последните две с потенциални приложения); получените резултати са доразвити при тестване на технологията на микробиологичните електролизьори, чрез способностите на биогоривните елементи (*Saccharomyces cerevisiae*) да образуват електрохимично активен аноден биофилм и електрохимично отделяне на водород.

Тъй като, целта на дисертационния труд е фокусирана върху механизмите на генериране на електрически ток от еукариоти като биокатализатори, основен принос в работата на д-р Йолина Хубенова е доказването на електрохимична активност на неизследван, преди това в биоелектрохимични системи, щам дрожди *Candida melibiosica* 2491. Извършена е огромна предварителна работа по култивиране на щама, по оптимизиране на концентрациите на използваните въглехидратни източници (глюкоза, фруктоза и захароза) и състава на анолита; поддържане на жизнеността на клетките в поляризационни условия и стандартизиране на количеството инокулат.

Д-р Йолина хубенова доказва съществуването на два механизма на екстрацелуларен електронен пренос от дрождите до анода на биогоривния елемент в затворена и полупроточна система: 1) чрез ендогенен медиатор, синтезиран от самите дрожди; и 2) чрез образуване на електрохимичен активен биофилм.

Приносите в биохимичен аспект са именно изследванията свързани с установяване на оксидоредукционните медиатори на екстрацелуларния електронен пренос – ендогенни и екзогенни. Доказано е, че *Candida melibiosica* 2491 проявява електрохимична активност, както в присъствие, така и в отсъствие на екзогенен медиатор. В резултат на многобройни изследвания, върху електрохимичното поведение на потенциални претенденти за ендогенни медиатори /рибофлавин, N-метил-феназин-метосулфат (ФМС) и хидрохинон/, дисертантката установява съществуването на ендогенен медиатор /феназиново производно/ секретирани в анолита в експоненциалната фаза на растеж и развитие на културата. Това е доказателство за специфичен адаптационен биохимичен механизъм към поляризационните условия и вероятно пренасочване на метаболизма през шикиматния път.

В присъствие на екзогенен медиатор (метиленово синьо (МВ)) се наблюдава значително нарастване на генерирания ток (над 10-пъти по-високи плътности на тока) и пренасочване на катаболитните процеси от алкохолна ферментация към аеробно окисление. В *in vitro* условия МВ осъществява обмен на електрони с редокс системите NADH и сукцинат (комплекси I и II) от електрон-пренасящите вериги, което д-р Йолина Хубенова доказва чрез циклична

волтаперометрия. Тези резултати и позволяват да предложи вероятен механизъм за екстрацелуларния електронен пренос в системата – „проникване на екзогенния медиатор метиленово синьо и осъществяване на електронен обмен не само в цитоплазмата, но и в митохондриите на дрождените клетки” (представен на фиг. 84). За да докаже електронен пренос от NADH оксидоредуктазата към MB, Йолина Хубенова задълбочава изследванията с използването на класическия инхибитор на NADH оксидоредуктазния комплекс на митохондриите – ротенон и наблюдава редукция на образуваната биомаса с 20%, както и значително намаляване на генерирания ток при постоянна поляризация.

Към изследванията свързани с изучаване на механизмите на електронен пренос са включени и експерименти в присъствие на метали, които недвусмислено показват, че *Candida melibiosica* се адаптира лесно към нови условия и успешно пренасочва метаболизма си, и съответно електронния трансфер. Така, в присъствие на желязо дрождите секретират в средата съединение с електрохимична активност и желязо-хелатиращи свойства, а в присъствие на никел електрохимична активност проявяват самите клетки. Получените високи стойности на генериран ток и мощност, при използването на наномодифицирани с никел аноди, дават основание на д-р Хубенова да направи предположение за участие на мембранно-асоциирани комплекси (металопротеини) с двойна функция - секвестриране на никела и осъществяване на екстрацелуларния електронен пренос (в качеството им на редокс системи).

Научно-приложните приноси на дисертантката по конструирането на двукамерен горивен елемент с протон-обменна мембрана и въвеждането и използването на наномодифицирани анодни материали (Ni, NiFe и NiFeP, охарактеризирани чрез сканираща електронна микроскопия (SEM) и енергийно-дисперсионна рентгенова спектроскопия (EDS)), също са впечатляващи. В това направление е извършена абсолютно необходимата проверка на тяхната биосъвместимост, корозионна устойчивост и приложение в системата, както и усъвършенстването на крайния акцептор на електрони в биоелектрохимичната система (окислител с висок редокси потенциал като калиев хексацианоферат ($K_3[Fe(CN)_6]$), калиев перманганат ($KMnO_4$), водороден пероксид (H_2O_2), амониев ванадат (NH_4VO_3) и хромофора фериин $[Fe(o-phen)_3]_2(SO_4)$). Това доказва отличните познания на Йолина Хубенова за свойствата на използваните досега анодни материали и възможностите за тяхното модифициране, както и за свойствата на металите като редокси системи и катализатори. Тези изследвания директно се превръщат в приноси свързани с повишаване на ефективността на използваната биоелектрохимична система и намаляване на енергийните загуби.

Бих открила и приносите на д-р Йолина Хубенова за прилагането на разработения интердисциплинарен подход при растителни горивни елементи, защото за първи път е доказано, че висши растения от семейство *Lemnaceae* притежават екзоелектрогенни свойства и така могат да бъдат използвани като биокатализатори от нов тип, за което свидетелстват

получените стойности на плътността на тока с *Lemna minuta* и *Lemna valdiviana* - най-високи от всички досега цитирани в литературата за растителни биогоривни елементи.

Публикации, свързани с дисертационния труд. В дисертационния труд са включени резултати от 28 научни публикации в специализирани за областта списания (2 статии в *Bioelectrochemistry* (IF 3.759), *Fuel Cells* (IF 3.32), *International J. Hydrogen energy* (IF 4.47) (2 се реферират), които са цитирани 68 пъти. Общият IF от 13 статии е 23,364, а две от публикациите без IF също са цитирани. Част от резултатите са включени в 30 изнесени доклади и научни съобщения, представени на национални и международни научни форуми.

Авторефератът отговаря напълно на изискванията, вярно отразява съдържанието на дисертационния труд и в съкратен вид представя най-важните резултати и приноси на разработения подход за изследване на биоелектрохимични системи.

Препоръки. Това, което ме заинтригува като биохимик са изследванията свързани с установяване на вида, структурата и евентуалния механизъм на действие на ендогенния посредник в електрон-пренасящата верига. Бих насочила интереса на д-р Хубенова към предварителни изследвания за активността на някои от ензимите от биосинтетичния път на феназиновите производни, тъй като се предполага участие на шикиматния път в синтезата на ендогенен медиатор. Чрез използване на ротенон, д-р Хубенова доказва участието митохондриалната NADH-убихинон оксидоредуктаза, но при дрождите има и друга (external) различна от митохондриалната. Тя участва в обмяната на електрони с цитозола и не се инхибира от ротенон, и може би по-ниските стойности на генериран ток в присъствие на ротенон доказват участие на подобна редокс система. Много интересно би било да се проследи активността на някоя от совалките – глицерол-3-фосфатна, малат-оксалацетатна, малат-аспартатна или малат-пируватна.

Личното ми отношение към дисертационния труд на Йолина Хубенова е положително и със създадения интердисциплинарен експериментален подход се поставя началото на ново научно направление за оценка на екзоелектрогенни свойства, откриват се нови възможности, както в приложен аспект, така чрез задълбочаване на фундаменталните изследвания върху механизмите на електронен транспорт в клетките (установяване на структурата и вида на редоксисистемите и совалките за пренос, начините за пренасочване на метаболити в зависимост от условията на средата и степента на метаболитна приспособимост). Ние разглеждаме като биокатализатор целите клетки, взаимодействията и преноса на информация между тях в изкуствено създадена система, но ефективността им зависи от ензимите с техните редокси системи, от скоростта на пренос и най-вече от регулацията на метаболитните процеси в тях. В този смисъл, остават открити за следващи изследвания особеностите на биохимичните механизми на екстрацелуларния пренос.

Заклучение. Смятам, че дисертационният труд на Йолина Хубенова представлява значителен по обем и качество научен продукт, със стойностни приноси, което се потвърждава от публикациите, свързани с дисертацията и техните цитирания.

Той характеризира д-р Хубенова като отлично подготвен в теоретично и практическо отношение учен в областта на биоелектрохимичните системи и за мен бе удоволствие да се запозная с резултатите и перспективите на това ново биокаталитично направление. Дисертационният труд на д-р Йолина Хубенова отговаря на изискванията на Закона за развитие на академичния състав, Правилника за неговото приложение и препоръките на Биологическия факултет при СУ.

Създаденият и приложен, в различни биоелектрохимични моделни системи, интердисциплинарен подход, получените резултати и приносите в представения дисертационен труд ми дават основание да заявя пред членовете на Научното жури моето положително мнение и убедено да препоръчам присъждането на научната степен „Доктор на науките” по направление 4.3. „Биологични науки” (Биохимия) на д-р Йолина Хубенова.

4 Декември, 2013г.

Автор:

Доц. д-р Светла Петрова