

РЕЦЕНЗИЯ

**Върху дисертационен труд на ас. Орлин Цветанов Гемишев
от катедра Биотехнология на Биологическия Факултет
Софийски Университет „Св.Климент Охридски”**

**на тема „Оптимизиране синтезата и получаване на
целулазни ензими от микромицетни продуценти”**

**рецензент: Проф. дбн Милка Кръстева
от ХТМУ - София**

Целулозата представлява един от най разпространените биополимери в природата, който се отличава, с изключително компактна „опакровка” на полизахаридните ѝ вериги. Нейната биоконверсия до разтворими олигозахариди и глюкоза се катализира от ензими наречени целулази, различаващи се по своята специфичност. Последните се продуцират главно от гъби, бактерии и актиномицети. Икономическата зависимост от изкопаеми горива, както и промените в климата, водят до интензивни изследвания за използване на възстановяеми източници на енергия на основата на целулоза.

Докторският труд на ас. Орлин Гемишев представлява научно изследване посветено на важните фактори, които контролират интимния механизъм на ензимния синтез и оптимизиране на тяхното влияние с цел намиране на условия за висок добив на ензимите при запазване на тяхната активност, както и възможности за практическото им приложение. Това прави докторския труд интересен и дисертабилен.

Докторският труд е написан на 179 страници и съдържа 32 таблици и 34 фигури. Той е структуриран по обичайния начин включващ: литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, заключение, изводи, приноси, използвана литература и публикации свързани с дисертацията

Литературният обзор е изложен на 49 страници. В него са разгледани субстратът- целулоза и целулазният ензимен комплекс. Показана е съвременна представа за сложната молекулна постройка на целулозата и са дискутирани трудностите, които тя създава при ензимното ѝ разграждане. Отделено е особено внимание на продуцентите на целулазните ензими и предимно тези, които имат приложно значение.

Основно разглеждане е направено на род *Trichoderma*. Съществуват онлайн база данни, за нейната идентификация, а публикуваните данни за целия геном на *Trichoderma reesei*, позволява да се анализира генетичния контрол и експресия на целулазните ензими. Анализирани са трите целулази от комплекса, които катализират разграждането на целулозата в синергизъм. Представени са интересни данни за ендоглюканазата, която притежава два отделни домена-единят отговорен за свързването към субстрата и другият с каталитична функция. Целобихидролазата, която за разлика от първата е много по специфична, притежава въглехидратни вериги и се отличава с наличие на 12 дисулфидни моста. Разгледан е и последния ензим β -глюкозидаза, която съдейства за получаване на крайния продукт- глюкоза. Наред с класическите методи за повишаване на целулазната биосинтеза, като мутагенез, скрининг и др. са представяени и съвременни рекомбинантни техники, водещи до получаване на стабилни щамове. Докторантът предлага и интересни литературни

изследвания за продукцията от *Trichoderma* на метаболити с фитохормонално действие, стимулиращи развитието на различни части от определени растения. В литературния обзор са разгледани и фактори, които оказват влияние върху ферментационния процес при синтезата на целулазните ензими. Последният раздел от обзора е посветен на разнообразното приложение на целулазните ензими от *Trichoderma reesei*. Обзорът обхваща 332 литературни източника, които в голямата си част са от последните 10-15 години. Той е изложен в много добър научно-аналитичен стил.

След изложението на литературния преглед докторантът излага целта на дисертационния труд, а именно- Охарактеризиране и оптимизиране целулазната биосинтеза на щамове от род *Trichoderma*, и изследване влиянието на химични и физични фактори върху целулитичната активност, която включва 7 основни задачи и 6 под задачи.

В раздела **Материали и методи** са описани много добре и подробно отделни методи, които докторантът е събирал от различни източници или сам е изготвил. Освен това има подробно описани методи, отнасящи се до гена идентификация, влияние на статично магнитно поле върху биопродукти, облъчване на споров материал с плазмен фокус и т.н., съвременни и интересни методи. Позволявам си да препоръчам на докторанта, да оформи тези методи в практическо ръководство, което би било много полезно, както за студенти, така и за докторанти и други изследователи.

В раздела **„Резултати и Обсъждане“** докторантът описва намерените от него резултати, които биха могли да се сумират така: 1. от изследваните работни щамове M7, QM9414, M27G и M17 с най-високи целулазни активности в техния максимум показва щам M7 при който

ендоглюканазата показва 30,4 IU/ml; целобихидролаза-3.79FPU/ml; β -глюкозидаза – 1,51 IU/ml. като значителна степен на полиморфизъм (40%) е намерена между щамове M7, QM9414, M27G и M17. Установена е принадлежността на щам M7 към вида *Trichoderma reesei*;

2. Доказано е значението на въглеродния компонент в агаризираните среди за поддържане на щам *Trichoderma reesei* M7 и влиянието му върху синтеза на целулазни ензими във ферментационни условия. При съхранение върху кристална целулоза и проведен ферментационен процес са отчетени максимални целулазни активности, докато при използване на безцелулозен такъв, щам M7 от *Trichoderma reesei* понижава експресията на целулозни ензими;

3. намерено е, че комбинираното въздействие на растежните хормони изопентинил аденин и индолил оцетна киселина в съотношение 1 към 3, води до повишение на биосинтетичния потенциал на *T. reesei* M7 и специфичната ендоглюканазна активност нараства с около 11%. на 120 час от ферментационния процес. Изучено е и въздействието на статично магнитно поле върху синтеза на целулазни ензими и е намерено, че специфичната ендоглюканазна активност нараства с около 20% при умерен интензитет на полето. По-нататъчно увеличение на интензитета на полето има за резултат отрицателен ефект. Прилагане на импулсно високо енергетично рентгеново излъчване върху *T. reesei* M7 има за резултат повишена продукция на хидролазни ензими, която се запазва и след няколко препосоявания.

4. Намерено е, че в процеса на целулазна ферментация на изследвания щам се отделят биологично активни вещества, с фитохормонално действие, подобно на растенията,

Научната значимост на резултатите получени в докторския труд, виждам в намиране на нови факти чрез прилагане на модерни подходи при изследване на *Trichoderma reesei*, като: таксономичното определяне на щам М7 към *T. reesei*, използвайки секвенционен анализ по ITS рибозомални гени; повишение на биосинтетичния капацитет на *T. reesei* М7 е постигнато чрез използване на импулсно високо-енергетично рентгеново излъчване, както и чрез прилагане на статично магнитно поле с умерен интензитет; *T. reesei* М7 може да поглъща големи дози йонизирано лъчение, което създава възможности за неговото използване при ремедиация на радиационно замърсени участъци; Синтезираните от *T. reesei* М7 фитохормони във ферментационната среда, имат положителен ефект върху растежа на семена от *Pisum sativum* и това може да се използва в растениевъдството.

Тези научни резултати мога да отнеса към обогатяване на научните знания за биосинтетичните възможности на *Trichoderma reesei* М7 на целулазни ензими, намиране нови факти относно тяхната повишена продукция в резултат на различни въздействия.

Научните резултати в докторския труд са изложени в 5 научни статии публикувани, както следва: 3 статии в *Biotechnology&Biotechnological Equip.*, 1 статия в *Radiation Protection Journal* и 1 статия в *Annuaire de L'Universite de Sofia "St Kl. Ohredski"*. В 4 от тях докторантът е първи автор, а в една от тях е на 4-то място.

Орлин Гемишев е роден през 1974г в Кюстендил. Висшето си образование завършва през 1997г в СУ „Св.Климент Охридски“-Биологически Факултет като Магистър по специалност-Екология с мн.добър успех (5.33) от следването и отличен (6.0) от дипломна

работа. От 1999г до 2002г. работи в Института по Микробиология-БАН като специалист и в „Кераминженеринг” АД- София, като еколог.

През 2002 до 2005 е редовен докторант в катедра Биотехнология на Биологическия Факултет СУ, с научен ръководител Проф.д-р Атанас Атев. Докторантът е положил всички изпити от индивидуалния си план с отличен успех. През 2006 е избран за асистент в същата Катедра и отчислен от докторантурата с право на защита. Ас. Орлин Гемишев владее отлично руски и английски език и има компютърни умения на много добро ниво. Докторантът е участвал в две международни и една българска конференции с научни доклади. Към докторанта имам следният въпрос:

1. Наблюдавани ли са множествени форми при целулазните ензими продуцирани от *Trichoderma reesei* и ако има, дали са на генетична основа или са вследствие пост-транслационни причини.

Авторефератът отговаря на съдържанието на дисертационния труд и е изготвен много добре.

Заклучение

Предложеният дисертационен труд притежава качества на научно изследване, включващо оптимизиране условията на целулазната биосинтеза от *Trichoderma reesei* M7. Това е направено с два подхода. Чрез първият подход е осъществено двуетапно култивиране, при което вегетативният посевен материал се натрупва върху лесно усвояем въглероден източник, а същинската ферментация е извършена върху кристална целулоза. Вторият подход на оптимизация е свързан с използването на химични и физични фактори на влияние като фитохормони, магнитно поле, плазмен фокус и др.върху биосинтезата

на целулазните ензими. Намерените положителните резултати в дисертацията позволяват в бъдеще, те да се използват за получаване на целулазните ензими с продуцент *Trichoderma reesei* M7 в оптимизирана технологична схема в по-големи мащаби. Научните резултати са публикувани в специализирани научни списания и са докладвани на международни и български конференции.

Чрез усвояване на нови методи и използване на модерни техники, докторантът Орлин Гемишев е повишил квалификацията си и е изградил много умения, необходими за един добър изследовател. Смятам, че докторският труд отговаря напълно на изискванията на закона за придобиване на докторска степен, както по отношение на научната и приложната му значимост, така и на излагането и онагледяването на резултатите.

Предлагам на Почитаемото Жюри да присъди на Орлин Цветанов Гемишев научната степен **доктор**.

17.04. 2016г.

Рецензент:

Проф. дбн Милка Кръстева

