Р Е Ц Е Н З И Я

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”
по професионално направление 4.3 Биологически науки (микробиология)

Тема: **„Биосинтетичен потенциал на дрожди за продукция на фитазни ензими“**
Автор: редовен докторант **НАДЕЖДА ДИМИТРОВА НАНКОВА**
Научни ръководители: **доц. д-р Венцислава Петрова и доц. д-р Анна Томова**
Рецензент: **доц. д-р Траяна Недева**
Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с нормативните документи – Закон за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и Препоръките на Факултетния Съвет на Биологически Факултет за критериите при придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ за професионално направление 4.3 Биологически науки, съобразени с тях.

1. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

Фитатът е сол на мио-инозитол хексакисфосфат, която обикновено се определя като антихранителен фактор поради способността да хелатира метални катиони (Fe^{3+}, Zn^{2+}, Ca^{2+} и Mg^{2+}), намалявайки тяхната биодостъпност и абсорбция. Фитатните комплекси не се абсорбират в човешкия ГИТ, освен ако не бъдат разградени от фитази - клас фосфатази (подсемейство на киселинните хистидинови фосфатази), които катализират хидролизата на фосфата от фитиновата киселина.

Поради широкото практическо приложение, фитазите са обект на задълбочени изследвания с цел намаляване на количеството фитати в храните и фуражите. Така, фитазата привлича все по-голямо внимание, най-вече като добавка към животинските храни. Изследванията в областта на производството на фитаза са полезни за подобряване на ефективността на животновъдството, намаляване на въздействието върху околната среда и допринасят за развитието на устойчиви и ефективни селскостопански системи.

Една алтернатива на обогатяването със и добавянето на синтетични фитази, е намаляване на съдържанието на фитати в храните чрез използване на микроорганизми с висока фитазна активност. През последните години интересът към фитазата, продуцирана от дрожди нараства, за което свидетелстват все по-големия брой публикации. Доказано е, че синтезата на фитази от дрожди се регулира от външната концентрация на фосфат и

фактори, като pH, температура, източници на въглерод и наличие на метални катиони. Ензимната секреция може да бъде вътреклетъчна, периплазматична, директно в културалната среда или свързана с клетъчната стена. Необходими са обаче, по-нататъшни изследвания, съсредоточени върху подбора на подходящи условия, които увеличават биосинтезата на ензима, което е от значителен технологичен и практичен интерес.

Във връзка с гореизложеното, проучването на капацитета на автохтонни щамове дрожди за хидролиза на фитати и подборът на представители с висок потенциал за производство на фитаза представлява актуална научна задача. Решаването й може да бъде отправна точка за разработването на различни методологии за повишаване на функционалната стойност на растителните хранителни продукти и приложението им в хранително-вкусовата промишленост. Именно върху този проблем е фокусиран настоящия дисертационен труд.

2. Оценка на структурата, специфичните задачи и тяхното съответствие с поставения научен проблем

Дисертационният труд е с обем 213 стр., от които основен текст 152 стр., списък на използваните литературните източници – 44 стр. (354 заглавия, повече от половината от които са цитирани при обсъждане на резултатите) и други приложения – 17 стр. (в т.ч. подробно съдържание, списък на използваните съкращения, изводи и справка за приносите в дисертацията). Работата е структурирана по общоприетия за такъв вид труд схема, като включва частите „Увод“ (1 стр.), „Литературен обзор” (40 стр.), „Цел и задачи” (1 стр.), „Материали и методи” (21 стр.), „Резултати и обсъждане” (89 стр.), „Изводи“ и „Приноси“ (4 стр.). Научните доказателства са представени с фигури (32 бр.), таблици (18 бр.), снимки (20 бр.) и диаграми (3 бр.). Съотношението на текст към илюстративен материал е приблизително 2,5:1, което е очаквано за една експериментална работа. Представени са 10 извода и 8 обобщаващи приноса.

Приложеният към дисертационния труд Автореферат с 40 стр. основен текст на български език е изготвен съгласно изискванията и отразява същността на дисертацията.

В работата е формулирана ясна цел и 6 основни задачи, една от които с 2 специфични подзадачи. Те очертават логичната последователност от изследователски подходи, формулирани за реализиране на споменатата цел. Задачите отразяват континуума от общоприети в съответното ниво на техниката стъпки по скрининг на обещаващи щам-продуценти, тяхното таксономично определяне, сравнителна оценка на потенциала за продуциране на целевия ензим и апробиране на този потенциал в реални ферментационни процеси, изолиране, пречистване и характеризиране на крайния продукт, практическо приложение на този продукт в симулирани условия от обхвата на растителната физиология.

Структурирането на експерименталната част от работата в последователност от ясно формулирани задачи и подзадачи оценявам като умение на докторантката да планира рационално и далновидно като демонстрира широк поглед върху основните научни проблеми на работата си и аргументирана преценка за техните възможни решения.

3. Оценка на съответствието на методичните подходи с поставените цели

За реализиране на поставената цел в научния труд са използвани методи и техники, съобразени както с конкретните изисквания на експерименталните задачи, така и с цялостния подход, възприет за решаването им. Разделът „Материали и методи“ включва разнообразие от микробиологични, биохимични, физикохимични, ензимологични, молекулярно-биологични техники за изолиране и морфологично, физиологично, биохимично и генетично охарактеризиране на щамове дрожди; култивационни техники, аналитични биохимични и физикохимични методи за изолиране, пречистване и характеризиране на ензими, методи за оценка на ензимни активности и провеждане на растителни тестове за оценка на биометрични показатели.

Този комплексен методичен подход (15 типа методични подходи, включващи над 40 методи и тестове) е гаранция за рационално разрешаване на научните задачи. В допълнение, приложеният от докторантката методичен подход позволява да се проследи последователно и в детайли хода на изследователския процес и да се систематизират получените експериментални данни, продукт на сериозен обем аналитична работа, в достоверни резултати и изводи.

Разделът „Материали и методи“ е представен в подробен, добре структуриран вид и отразява в детайли всички използвани материали, методи и апаратура. Описанията са достатъчни и позволяват повторяемост на представената методология.

4. Оценка на съответствието на теоретичната обосновка с експерименталните решения, резултати и приноси

Увод и Литературен обзор

Уводът предоставя в синтетичен вид информация за необходимостта от проучване на потенциала на дрождеви представители като продуценти на ензима фитаза. Посочени са техните предимства и научното предизвикателство пред използването им за справяне със сериозни проблеми на нашето настояще, като замърсяване на околната среда и подобряване на храненето и качеството на живот. В този смисъл уводът е фокусиран и насочва към необходимостта от разработването на дисертационния труд.

Литературният обзор е написан въз основа на над 300 заглавия на публикации от тематичния обхват на дисертацията. Те отразяват световните постижения и съвременни тенденции по научната проблематика – една трета от цитираните публикации са излезли от печат през последното десетилетие. Тези факти показват, че докторантката се е съобразила с изискванията за актуалност на използваната информация и е приложила принципа на изчерпателност и библиографска точност. Литературната справка е подредена с изключителна точност и коректност, съгласно правилата за академично писане.

В структурно отношение, съгласно съдържанието си обзорът е съставен от 7 основни части. Пет от тях са фокусирани върху фитазите и техния субстрат фитиновата киселина, природните източници на фитази и подходите за повишаване на биологичната наличност

на фосфор в почвата. В последните две е направен преглед на приложението на фитазите в хранително-вкусова промишленост и се очертани перспективите за бъдещите им изследвания. Разделът е вътрешно балансиран по структура и съдържание. Представени са достатъчно научни факти, логично обобщени в тенденции и заключения. Те запознават читателя с научната проблематика на дисертацията като постижения и нерешени проблеми. Обзорът е написан логично, разбираемо и въпреки сложната биохимична материя - четимо. Излагането на научните факти е в академичен стил, независимо от наративната природа на раздела. Онагледен е с подходящ илюстративен материал, авторско творчество на докторантката. С удоволствие отбелязвам факта, че в обзора няма нито фактологични, нито технически грешки - факт, който поддържа същностната му ценност. Убедено определям този раздел от дисертацията като добра теоретична обосновка на експериментите, резултатите и приносите.

Експериментални решения, резултати, анализи и изводи

Получените резултати са изложени последователно, с аргументирани обсъждания и логични заключения. Те са представени и интерпретирани в логическата връзка на поставените задачи и подзадачи и могат да се обособят в три направления: 1) скрининг на дрождеви изолати за продукция на фитаза и подбор и таксономична идентификация на потенциален продуцент на ензима 2) оптимизиране на култивационния процес на подбрания продуцент за биосинтеза на фитаза и аранжиране на процедура по изолиране, пречистване и охарактеризиране на ензима и 3) изследване на ефекта на дрождевата фитаза върху развитието на моделна растителна култура. В този ред ще бъдат коментирани в рецензията.

1. ***Скрининг на дрождеви изолати за продукция на фитаза и подбор и таксономична идентификация на потенциален продуцент на ензима. (стр. 77 – 122)***

В тази част от дисертационния труд са отразени резултатите от провежането на 3 скрининг процедури за търсене на фитазни ензими с функционални свойства, които да гарантират ефективност при индустриалната обработка на фитинова киселина, а именно широк диапазон на pH действие, по-високата термо- и pH стабилност и по-добра ефективност при разграждане на субстрата. Потенциалът (в качествен и количествен аспект) на дрождеви представители да биосинтезират ендо- и екзоклетъчна фитаза е оценен на 34 чисти култури. От тях, 13 колекционни култури, принадлежащи към родовете *Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida, Pichia* и *Debaromyces*, 13 изолата от 4 вида квас и 8 изолата от 4 вида боза. Последните 21 изолати са идентифицирани таксономично до вид въз основа на полифазен таксономичен подход, който включва микро-, макроморфология, физиолого-биохимичен профил, анализ на 18S рРНК гени и филогенетичен анализ.

Експерименталната постановка и логика на този подраздел, както и получените резултати относно видовата принадлежност на изследваните култури позволяват на докторантката да направи аргументираното заключение, че най-перспективни за продукция

на фитаза, оценена както по качествени, така и по количествени показатели са щамове *Pichia fermentans* B4-1 и B4-2, изолирани от боза. Поради тази причина тези новоидентифицирани видове са обект на следващия експериментален етап от разработката – оптимизация на ензимната реакция по показатели концентрация на субстрат, pH и T°C. В резултат на тази процедура щам *P. fermentans* B4-1 е определен като-най-обещаващ за фитазна продукция.

Този подраздел от дисертационния труд е с представителен обем и фактология – реално отражение на сериозната експериментална работа. Обобщението на получените по него експериментални данни е направено в 4 от 10-те извода и 3 от научно-приложните приноси на труда. Той включва експерименти, посветени на комплексна (таксономична и ензимологична) оценка на потенциала на 34 щама за продукция на фитаза, съобразна с добре известни в науката качествени и количествени показатели. Проведени са обемни изследвания и е положен сериозен експериментален труд за покриване на критериите на полифазната таксономия на микробни обекти. Аранжирани са комплексни двуфакторни експерименти, които позволяват на докторантката да направи аргументиран подбор на комбинацията моделен щам – оптимални физико-химични условия за протичане на ензимната реакция. Това позволява гъвкав подход при последващото аранжиране на култивационния процес и избор на съответната комбинация щам-субстрат-физико-химични условия за биосинтеза на фитаза.

На пръв поглед, представените допълнителни таксономични характеристики на щам *P. fermentans* B4-1 би трябвало да се включат в частта по таксономичната характеристика на изолатите от боза (т. 3.4). От друга страна, приемам решението на докторантката да акцентира върху допълнителни морфологични и физиологични свойства, свързани с оптимизиране на условията за растеж, поради тяхната важност и логична връзка със следващия подраздел на резултатите – оптимизиране на култивационния процес.

Като значим принос към тази част от дисертационния труд оценявам.

- Изолирането и идентифицирането на 21 нови дрождеви щама от квас и боза, принадлежащи към 5 семейства, като потенциални индустриални продуценти на фитазни ензими;
- Подборът на перспективен дрождеви щам, принадлежащ към вида *Pichia fermentans* като продуцент на извънклетъчна фитаза въз основа на неговите физиологични и биохимични характеристики;
- Създаването на методологична схема на базата на двуфакторен анализ за оптимизиране на физико-химичните параметри на ензимната реакция за определяне на фитазна активност.

2. Оптимизиране на култивационния процес на подбрания продуцент за биосинтеза на фитаза и аранжиране на процедура по изолиране, пречистване и охарактеризиране на ензима. (стр. 122 – 152)

Тази част от дисертацията е посветена на аранжиране на оптимална по състав хранителна среда за проследяване на динамиката на синтеза и продукцията на фитаза от

щама-продуцент. Въз основа на подбор на C и N източник и фактори на растежа и оценка на ефекта на параметрите киселинност и температура е аранжирана такава хранителна среда, която осигурява висока продукция на екзоклетъчна фитаза.

В този подраздел на труда е представена и процедура по изолиране и пречистване до електрофоретична хомогенност на фитаза от *Pichia fermentans* B4-1. Тази процедура е три-степенна, основана на ултрафилтрационен и хроматографки подход и водеща до 8-кратно пречистване на ензима с добив от 11%. Тя позволява технологично мащабиране. Пречистеният ензим е характеризиран за своите физико-химични и кинетични свойства по класическа за такъв вид анализи схема: структура на протеина и молекулна маса, pH и температурен оптимум и стабилност, влияние на неспецифични ензимни инхибитори. Особено внимание е отделено на спектъра на повлияване на ензимната активност от въздействието на метални катиони, като са установени факти с потвърдителен характер за разнопосочния и зависим от условията ефект на това влияние. Изведени са закономерности за седем метални катиона с концентрация 1 M (K^+, Na^+,Ca^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} и Zn^{2+}). Генериран е кинетичен паспорт на фитазата като са определени субстратнанта му специфичност и концентрация, а така също и Km и Vmax.

Фактологичните данни от този подраздел свидетелстват за сериозна експериментална работа. Оптимизирането на различни параметри изисква разработване на експериментална схема за вариантност, което е особена заслуга на докторантката и труда, защото се базира на рационален, но същевременно и широкообхватен подход за планиране и реализиране на значително количество експерименти. Получените резултати са подкрепени с 21 фигури, таблици и снимки, които онагледяват изведените тенденции и обобщения. От тях с приносен характер могат да се посочат следните:

- Оптимизирани параметри (субстрат и физико-химични условия) на култивационен процес на щама-продуцент за ефективна биосинтеза на екзоклетъчна фитаза;
- Разработена 3-стъпална лабораторна процедура за ефективно пречистване на фитазен ензим, биосинтезиран от дрождеви микрорганизми;
- Характеризирани в детайли физико-химичните свойства на пречистения ензим фитаза и доказан потенциал за биотехнологично приложение като препарат, подпомагащ разграждането на фитиновата киселина.

3. Изследване на ефекта на дрождевата фитаза върху развитието на моделна растителна култура (стр. 152 – 165)

В този подраздел на дисертационния труд е направена оценка на способността на фитаза, продуцирана от *Pichia fermentans* B4-1 да стимулира растежа на тиквени растения *Cucurbita pepo* L. Получените резултати недвусмислено насочват към потенциалното приложение на фитазата като биологичен фактор, стимулиращи растежа на растенията и възможност за директното й приложение като инокулант или за включване в биостимулантни препарати, насочени към подобряване на растителната продуктивност.

В този подраздел като резултат с приносен характер може да се посочи доказаният стимулиращ ефект на ензима както върху кълняемостта на семената, така и върху развитието на наземните части на моделния растителен вид и физиологичния и метаболитния му статус. Тези данни определят фитазата от *Pichia fermentans* B4-1 като обещаващ подходящ кандидат за употреба в земеделието.

5. Коментари от общ характер, допълнения и въпроси

Дисертационният труд е написан на литературен български език, с използването на адекватен професионален лексикон. Звучи логично, разбираемо и четимо, с демонстриран опит в детайлната и задълбочената интерпретация на получените резултати. Технически е оформен прецизно в пълно съответствие с общоприетия формат на труда по обем и баланс между отделните части. Това е биохимичен труд върху ензим, чието проучване е научно и експериментално предизвикателство и изисква огромен емпиризъм. Докторантката се е справила отлично с това и демонстрира научни постижения, обобщени в 10 изводи и 6 приноса. Те следват логичната последователност на основните проблеми в труда и отразяват както обхвата на проведените изследвания, така и тяхната значимост във фундаментален и приложен аспект.

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Публикационната дейност изцяло съответства на нормативните документи – ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и Препоръките ФС на БФ за критериите при придобиване на научни степени, съобразени с тях. Подробности от публикационната дейност са отразени коректно в автореферата. Статистиката в цифри показва 2 публикации в реферирани и индексирани издания (Q3), 5 научни съобщения на 4 международни и 1 национален научни форуми, участие в 3 национални научни проекта.

7. Съответствие на придобитата компетентност с изискванията на образователната и научна степен „доктор”.

Знания: Докторантката е усвоила нови знания в конкретна научна област: изолиране, идентифициране и таксономично определяне на дрождеви видове, продуценти на целеви ензими и получаване на тези ензими в чист вид и тяхното комплексно охарактеризиране като потенциални биопрепарати за приложение в земеделието.

Умения: Докторантката е придобила умения за прилагане на разнообразен методичен подход за разрешаване на конкретни изследователски задачи. Тя е усвоила микробиологични, физико-химични, биохимични, ензимологични и молекулярно-биологични методи и методология в областта на растителната физиология. В допълнение на специализираните техники докторантката е придобила умения за анализ, интерпретация и оценка на експериментални данни. Тези умения са принос към съществуващите практики в професионалното направление.

Самостоятелност и отговорност: Докторантката демонстрира висока работоспособност и мотивираност, самостоятелност при разработването на новаторски идеи и последователност при провеждането на научни изследвания в работен контекст; висока прецизност при експерименталната работа и написването на дисертационния труд, независимост и поемане на отговорност при разрешаване на научни проблеми, успешно адаптиране към работна среда и екип.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на посочените по-горе аргументи изразявам подкрепа на актуалността на проблемите, обект на дисертационната работа. По отношение на структура, специфични задачи за разрешаване на поставения научен проблем, методични подходи, експериментални решения, реализирани резултати и тяхната интерпретация, изразявам мнение, че дисертацията на докторант НАДЕЖДА НАНКОВА е напълно завършен авторски труд, който изцяло отговаря на критериите обем, съдържание и творчество.

Във връзка с това, препоръчвам почитаемото Научно Жури, назначено със Заповед № РД 38-625/25.09.2025 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“, да присъди на **НАДЕЖДА ДИМИТРОВА НАНКОВА** образователната и научна степен „доктор”.

04.11.2025 г. рецензент:

София (доц. д-р Траяна Недева)