

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема: „**Изолиране, пречистване, скрийнинг и имобилизиране на ензими от растителни източници**”
представен от **Имен Лахмар** за присъждане на образователната и научна степен „**доктор**” по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия и химия на физиологичноактивните вещества)
от **доц. д-р Иво Георгиев Лалов**, катедра „Биотехнология”, ХТМУ-София

Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата.

Както може да се установи от документите представени от кандидатката за присъждане на ОНС „доктор”, докторантката Имен Лахмар е родена през 1986 година в Тунис. През 2009 придобива бакалавърска степен по Геобиологични науки (Geolife Sciences) в Университета в Сфакс, Тунис. След като продължава обучението си в същия университет през 2012 тя придобива и магистърска степен по специалността „Биология и екофизиология на растенията”.

През октомври 2013, на основание Европейски образователен проект Erasmus Mundus Green IT, Имен Лахмар е зачислена като редовна докторанка по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия и химия на физиологичноактивните вещества) към катедра „Биотехнология” на ХТМУ с научен ръководител проф. д-р инж. Любов Йотова. През следващите две години и половина докторантката е положила успешно всички изпити и е осъществила необходимите дейности съгласно изискванията на закона, в резултат на което на 1 юни 2016 година е отчислена с право на защита.

Доколкото може да се прецени от образователната квалификация и изследователската дейност на докторантката тя притежава доста разностранни научни интереси, обхващащи различни области от биологията, екологията и биотехнологиите. По конкретно те са насочени към изолиране и пречистване на ензими и биологично активни съединения от растителни източници, кинетични изследвания на ензимно катализирани реакции, имобилизиране на ензими към различни носители, разработване на биосензорни системи и др.

Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите.

Представеният ми за рецензия дисертационен труд представлява интересно широкообхватно пручване на възможностите за използване на две средиземноморски растения като потенциален източник на ценни растителни ензими. Неговата актуалност

допълнително се подчертава от факта, че в хода на това изследване са осъществени серия имобилизации на един от изолираните ензими (β -амилаза) към различни синтетични матрици с последващо охарактеризиране и детайлни кинетични изследвания на новополучените биокатализатори.

Дисертацията е добре структурирана като общият обем от 100 страници е разпределен между няколко основни раздела: Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и Методи, Резултати и Дискусия, Изводи, Приноси и Литература. Приложени са списъци на публикациите и участията на докторантката в научни форуми, както и списъци на използваните съкращения, таблиците и фигурите в дисертацията. Изследването е подходящо онагледено с помощта на 22 фигури и 20 таблици. Цитирани са 356 използвани източника.

В литературният обзор много подходящо е обобщена голяма по обем разностранна информация за изследваните растителни източници включваща ботаническа класификация и описание, географско разпространение, етномедицински приложения, фитохимичен състав и свързаните с него различни биологични активности (антибактериална, антигъбна, инсектицидна, противотуморна и т.н.) и др. Втората част е посветена основно на растителните ензими, при което е акцентирано върху β -амилазите. Подробно са дискутирани широк спектър от проблеми свързани с ензимната структура, клетъчната им локация, механизма на катализираните от тях реакции, източниците на изолиране и различните приложения, които намират в практиката. Във финалната част на обзора са разгледани методите за ензимна имобилизация като са обсъдени техните предимства и недостатъци, както и проблемите свързани с избора на подходящ носител. Цитирани са редица примери за имобилизация на ензими с амилазна активност.

В резултат на изводите направени от литературния обзор, по достатъчно коректен и прецизен начин, са формулирани целта и конкретните задачи на дисертационния труд.

Използваните при изследването аналитични методи и апаратура са достатъчно съвременни и осигуряват постигането на поставените задачи. Раздела „Материали и Методи“ съдържа обстоен списък на използваните химикали и материали. Достатъчно подробно са описани повечето от аналитичните процедури за определяне на различните ензимни активности както и тези за приготвяне и охарактеризиране на синтетичните матрици за имобилизация. При оформянето на този раздел се наблюдават и някои пропуски, които ще бъдат дискутирани по-подробно в точката „Критични бележки и коментари“ на настоящата рецензия.

Централният раздел на дисертацията „Резултати и дискусия“ може условно да бъде разделен на три части. В първата от тях е осъществен широкообхванат скрининг на различните ензимни активности, които могат да бъдат установени в екстракти и латекс от

изследваните растения. Тук добро впечатление правят многобройните сравнения на получените от докторантката резултати с тези постигнати от други изследователи при проучванията на други растителни източници. Заслужава да се отбележи и сполучливата дискусия на някои по общи проблеми като ролята на съответните ензими за жизнения цикъл на растенията, различните приложения, които намират те в практиката и др. В резултат на обстояния скрийнинг е установено присъствието на доста широк спектър от ензими отразяващ се в наличието на: β -амилазна, протеиназна, L-аспарагиназна, липоксигеназна, полифенолоксидазна, тирозиназна, липазна и други активности проявени от изследваните растителни материали. Осъществено е и електрофоретично разделяне на протеините съдържащи се в извлеките от трите растителни източника: соя, *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium*, съпроводено с определяне на тяхната молекулна маса.

Втората част е посветена на изследвания свързани с имобилизацията на β -амилаза от различни източници към различни синтетични матрици. След първоначално сравнение на резултатите от свързването на β -амилаза към три вида носители както със и така и без предварителната им активация за по-нататъшни изследвания е избрана CAB+pANpAA+TBOT матрицата, като имобилизацията на β -амилазите от различните растителни източници е осъществявана без предварителна активация на носителя.

Изследването на възможностите за многократно използване на новополучения биокатализатор е демонстрирало, че дори при използването на този тип имобилизационна процедура имобилизирания ензим запазва над 60% от първоначалната си активност след 5 реакционни цикъла. При имобилизирането на β -амилази от трите цитирани по-горе растителни източника върху избраната матрица е забелязана зависимост на имобилизационния добив от вида на растението като след имобилизационната процедура соевия ензим запазва активността си в най-голяма степен. При изследването на рН оптимумите на трите имобилизирани β -амилази е установено отмествнето им към алкалната област в сравнение с тези на свободните ензими. Установено е също така отместване на температурните оптимуми към по-високи температури както и известно повишаване на термостабилността на имобилизираните ензимни препарати, което е безспорно доказателство за практическия смисъл от прилагането на имобилизационната процедура.

Финалната част на раздела е посветена на кинетични изследвания на процесите на ензимна хидролиза на нишесте катализирани от свободна и имобилизирана β -амилаза изолирана от *Pergularia tomentosa*. Изследванията са осъществени при различни температурни режими като е наблюдавано увеличение на степента на конверсия при повишаване на реакционната температура. Оценена е и адекватността на различни моделни кинетични уравнения използвани при описанието на изследвания ензимен процес като е

намерено, че ензимната конверсия на нишесте се описва най-добре от модифицираното топохимичо уравнение на Prout – Tompkins както и че свободната и имобилизираната β -амилази следват един и същи кинетичен модел.

Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд.

Представеният от докторантката автореферат е в обем от 33 страници като в него са включени въведение, целта и задачите на изследването и използваните материали и методи. Авторефератът съдържа също така основните резултати, тяхното обсъждане, направените изводи и приносите на дисертационния труд. Включени са списъци на свързаните с изследването публикации както и на участията на докторантката в научни конференции и симпозиуми.

Така, авторефератът отразява съдържанието на дисертационния труд коректно и в достатъчна степен като напълно удовлетворява нормативните изисквания за неговото изготвяне.

Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд.

Считам, че научната значимост на резултатите от осъществените изследвания е отразена адекватно в раздел „Приноси” (Contributions) на представения дисертационен труд.

Тези приноси могат да бъдат обобщени накратко по следния начин:

1. Осъществен е широкообхванат скрининг на ензимни активности детектируеми в екстракти и латекс от две, типични за средиземноморския регион, растения *Pergularia tomentosa* и *Ecballium elaterium*, при което са оценени възможностите им да служат като суровинен източник за изолиране на серия ценни растителни ензими с широко практическо приложение.
2. Установено е, че имобилизацията на β -амилаза върху определен тип матрица води до подобряване на операционните характеристики (рН оптимум, температурен оптимум, температурна стабилност, възможност за многократно използване) на новополучения биокатализатор, което значително повишава потенциалния ефект от приложението му при промишлени условия.
3. Използването на различни моделни кинетични уравнения при кинетичните изследвания на ензимно катализирани процеси, осъществявани със свободна и имобилизирана β -амилаза, допринася както за изясняването на механизма тези процеси така и за осигуряване на техния по-добър контрол и прогнозируемост при евентуалната им реализация в промишлен мащаб.

Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд.

Резултатите от изследванията в дисертационния труд са представени в 2 научни публикации в специализирани научни списания съответно в:

- Годишник на Софийския Университет „Св. Климент Охридски” (Annuaire de l'Université de Sofia “St. Kliment Ohridski”, Faculte de Biologie)

- Journal of Chemical Technology and Metallurgy.

Едновременно с това докторантката е взела участие в 3 научни конференции. Заслужава специално да се отбележи факта, че при едно от тези участия докладът на Имен Лахмар е удостоен с награда.

По този начин публикационната дейност на докторантката удовлетворява изискванията на чл.11 (4) от ППНСЗД на ХТМУ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”.

Критични бележки и коментари.

Критичните ми забележки са свързани най-вече с допуснатата на отделни места небрежност при оформянето на дисертационния труд и макар и в по-малка степен, на автореферата. Срещат се някои не особено коректни или непълни и неточни изрази като „wide range mediterranean plants”, стр. 31 (има се предвид широко разпространени (widespread) растения), “ β -amylase was slowly higher”, стр.60 (има се предвид, че активността на β -амилазата е малко по-висока (slightly higher)) и др. Като неточно може да се определи и твърдението на стр.45: „Amylase activity present in latex of *Pergularia* at approximately 1.108 U/mg is lower that one founded in the latex of *Ecballium* (0.575 U/mg protein)...”. Като техническа грешка може да бъде отбелязано използването на буквено означение „d” вместо „c” в легендите на фигури 11, 12 и 13, някои печатни грешки и др.

Въпреки, че като цяло в методичната част както и в раздела „Резултати и Дискусия” условията на експериментите и различните анализи и процедури са описани достатъчно подробно и коректно трябва да се отбележи, че допълването на някои от тези описания е необходимо и би допринесло за по-добро осмисляне на резултатите. Най-забележителни в това отношение са както липсата на описание на имобилизационните процедури, посредством които β -амилаза от различни източници е свързана към различни активирани или неактивирани матрици така и отсъствието на каквото и да е упоменаване на процес, свързан с предварителното изолиране и пречистване на този ензим от изходните материали (растителни екстракти или латекс). Макар, че част от детайлите по тези процедури бяха изяснени в хода на дискусията при предварителното представяне на изследването пред разширения катедрен съвет на катедра „Биотехнология”, считам, че включването им в

писмен вид би допринесло за пълнотата дисертационния труд и едновременно с това би повишило ценността му за бъдещи изследователи в същата област. В същият смисъл бе отправена и изрична препоръка от страна на катедрения съвет и лично от научния ръководител на докторантката.

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Правени ли са опити за оценка на потенциалните добиви на β -амилаза при изолирането ѝ от изследваните растителни източници и срещали ли сте литературни данни по този въпрос?

2. Доколкото в работата си сте обосновали достатъчно добре и подробно избора на имобилизационна процедура без предварителна активация на матрицата, какво е Вашето мнение за ефекта от такава активация върху възможността за многократно използване на новополучения биокатализатор? Срещали ли сте подобни сравнения между активирани и неактивирани матрици по отношение на този операционен параметър в литературните източници?

Заклучение.

В заключение, считам, че представеният дисертационен труд е доказателство за успешното развитие на докторантката както в образователно така и в научно отношение.

В процесът на планиране, подготовка и провеждане на значителен брой експерименти, както и при интерпретиране на получените резултати докторантката неизбежно е задълбочила теоретичната си подготовка в редица научни области, свързани с обекта на дисертацията. Едновременно с това тя е придобила и ценни умения свързани с усвояването и прилагането на редица лабораторни техники и методи широко използвани в съвременната изследователска практика.

Считам, че по актуалност, обем на изследванията, постигнати научни приноси както и публикационна дейност, дисертационният труд напълно удовлетворява изискванията на ЗРАСБ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”.

Всичко изложено до тук ми дава основание да предложа на почитаемото Научно жури да присъди на инж. Имен Лахмар образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия и химия на физиологичноактивните вещества).

София, 26.09.2016

Рецензент:


Доц. д-р И. Лалов