

РЕЦЕНЗИЯ

от **Член кор. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн**

на дисертационния труд на **гл. ас. инж. Спаска Атанасова Янева** на тема **„Биосензори за фенол и допамин”**, представен за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор”** по научната специалност **5.11. „Биотехнологии”** („Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”)

1. Обща част

Със заповед на Ректора на ХТМУ-София № АД-20-344/12.07.2013 г. съм определен за член на научното жури за провеждане на процедура за защита на дисертационния труд на **гл. ас. инж. Спаска Атанасова Янева** на тема: **„Биосензори за фенол и допамин”**, представен за присъждане на образователната и научна степен **„Доктор”** по научната специалност **5.11. „Биотехнологии”** („Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества”), изработен под научното ръководство на **проф. Любов Йотова**.

Във връзка със защитата на докторската дисертация инж. Янева е представила пакет документи и научни материали, като се е съобразила изцяло с изискванията на Закона за академичното развитие в РБ и Правилника за неговото приложение. Дисертационният труд обхваща 115 страници и съдържа, 66 фигури, 26 таблици и 191 литературни източници, а авторефератът - 52 страници, 47 фигури и 21 таблици.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Инж. Спаска Янева е възпитаник е на ХТМУ-София. Получава *бакалавърска* степен от Катедра „Органичен синтез и горива”, специалност „Органичен синтез“ през 2004 г. и продължава обучението си като задочен студент в Катедра „Биотехнология”. През 2007 г. придобива *магистърска* степен по „Биотехнология” и спечелва конкурс за *задочен докторант* към същата катедра. Отчислена е с право на защита през 2012 г.

В професионално-кариерен план, от 2003 г. Спаска Янева работи в катедра „Основи на химичните технологии” при ХТМУ-София, където последователно заема длъжностите лаборант (2003-2005 г.), инженер-химик (2005-2007 г.), асистент (2007-2010 г.), старши асистент (2010-2011 г.) и главен асистент (от 2012 г.).

3. Актуалност на разработваната тема

Дисертационният труд на инж. Спаска Янева е посветен на създаването на биосензори за определяне на фенолни съединения и в частност на фенол и биогенни феноли, които да намерят приложение в медицината, а също и за анализ на хранителни продукти и замърсяване на околната среда. Като количествена мярка за актуалността на разработвания от нея научен проблем може да послужи справка от Google, където при ключови думи „Phenol biosensors” се появяват 337 000 показания. Този факт не поставя под никакво съмнение актуалността на разработваната дисертационна тема.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор обхваща 31 страници и е базиран на 191 литературни източници, от които само 10 са публикувани преди 2000 г. След кратко въведение в същността и принципа на биосензорите, докторантката разглежда детайлно свойствата на тирозиназите в аспект на приложението им за конструиране на биосензори и в частност на оптични биосензори предназначени за откриване и количествено определяне на фенолни съединения. Тъй като биосензорът освен биологичен (ензимен) компонент, съдържа и не по-малко важна за неговото действие матриксна част (т.е. носител на ензима), инж. Янева провежда задълбочено литературно проучване върху предимствата и недостатъците на използваните за целта материали, в това число наноматериали, зол-гелни хибридни матрици, синтетични и природни полимери, дендримери и др. В отделни подраздели на обзора са разгледани

биосензорите на основата на мултиензимни системи, както и такива основани на инхибирането на ензимните реакции.

Направената литературна справка и критичният анализ на литературата, позволява на докторанта да определи своята изследователска ниша и да формулира точно и ясно целите и задачите на своята дисертация.

5. Целесъобразност на поставените цели и задачи

Целта на дисертацията е формулирана лаконично: *„Да се конструират оптични биосензори за определяне на фенол и допамин на основата на имобилизирани моно- и двуензимни системи върху получени по зол-гелен метод хибридни мембрани”*. Адекватни на поставената цел са и поставените 6 задачи. Те се отнасят до планирането на методични изследвания свързани с получаването на нови трикомпонентни материали съдържащи колоиден силициев диоксид, които да послужат като матрици за имобилизация на оксидази (глюкозооксидаза, пероксидаза и тирозиназа), с цел да бъдат създадени моноензимен и двуензимни биосензори за определяне на фенолни съединения.

6. Методика на изследването

Методичният раздел обхваща 15 страници и включва подробно описание на използваните материали и методи, а именно, получаването на хибридни материали по зол-гелни методи и тяхното характеризирание чрез оптична и сканираща електронна микроскопия; получаването на тънки покрития и определяне дебелините на покритията чрез повърхностен плазмонен резонанс; подготовка на ензимите (глюкозооксидаза, пероксидаза и тирозиназа) за имобилизация и свързването им със синтетичните материали; определяне на активността и параметрите на реакциите за имобилизираните свободни ензими; конструиране на оптични биосензори с моно- и двуензимна системи, както и такива използващи бензоена киселина и пептиди производни на галантамина като инхибитори на ензимните реакции.

Методите са описани подробно, което дава възможност експериментите да бъдат възпроизведени без използването на допълнителна методична литература, а дисертационния труд да послужи като методично пособие за студенти и докторанти, специализиращи в областта на приложната ензимология, биотехнологията и биотехниката. От методичния раздел се вижда, че докторантът прилага с лекота широка гама от синтетични, биохимични, аналитични и физикохимични методи, което е една от основните цели на докторантурата в съответното професионално направление.

6. Оценка на получените резултати

Резултатите от проведените изследвания са представени на 43 страници и са илюстрирани с 46 фигури и 20 таблици. Както вече беше отбелязано, С. Янева си поставя за цел да разработи оптични биосензори за определяне на феноли чрез имобилизация на тирозиназа върху нови хибридни мембрани. Във връзка с това тя създава хибриден матрикс/матрица на основата на един неорганичен (SiO_2) и два органични компонента - целулозни естери и съполимер на полиакриламид и полиакрилонитрил. SiO_2 е с колоиден размер на частиците и е получен от органосилициеви съединения. Синтезът е осъществен в два последователни стадия – хидролиза, при която се освобождават силанолни групи (Si-OH) и кондензация, водеща до превръщане на силанолните групи в силоксанови (Si-O-Si). Тъй като размерът на SiO_2 частици зависи от природата на изходните продукти, докторантката експериментира с различни органосилициеви съединения, а именно, тетраетоксисилан (TEOS), тетраметоксисилан (TMOS), етилтриметоксисилан (ETMS) и метил триетоксисилан (MTES). От друга страна, поради това, че поръзността, прозрачността, механичните свойства и абсорбционните свойства на мембаната зависят от природата и на втория компонент – целулозните естери, инж. Янева експериментира и с няколко вида целулозни производни - целулозен ацетат-бутират (CAB), целулозен ацетат-пропионат с ниска молекулна маса (CAP/L) и целулозен ацетат-пропионат с

висока молекулна маса (CAP/H). Постоянен остава само третия компонент – съполимера полиакриламид-полиакрилонитрил, който е носител на функционални групи за имобилизация на изследваните ензими. Хибридните материали са получавани по рационална зол-гелна методика, след което са превръщани в мембрани чрез изсушаване в петриевы панички. Всички получени по този начин мембрани са изследвани макроскопски чрез светлинна микроскопия и за микрохетерогенност и порьозност - чрез сканираща електронна микроскопия. Ултратънки слоеве от хибридните материали пък са получавани по spin-coating метода, чиято дебелина е определяна чрез повърхностен плазмонен резонанс.

Годността на хибридните мембрани да служат като матрици за създаване на биосензори е оценявана по ефективността им да свързват ензими и да поддържат активността им за определен период от време. Янева експериментира с три оксидази – глюкозооксидаза, пероксидаза и тирозиназа, които по химична природа са гликопротеини. Последното помага те да бъдат имобилизирани към съответните матрици посредством въглехидратните им части, които за целта са предварително окислявани с перйодна киселина. Проведените изследвания за активност на моделните ензими глюкозооксидаза и пероксидаза показват по-висока относителна активност и запазване на рН оптимума при имобилизация върху мембраните ТМО-S/CAB/AA в сравнение с TEOS/CAB/AA.

При имобилизация на тирозиназа, по-висока относителна активност спрямо субстрат L-тирозин показват мембраните, съдържащи MTES и целулозен ацетат-пропионат с висока молекулна маса (80,1 %) отколкото с нискомолекулния компонент MTES/CAP/L/AA (54,5%). Изненадващ е ефекта на имобилизацията върху K_m на ензимната реакция. Изчисленията показват, че K_m на имобилизирана тирозиназа при субстрат L-тирозин е три пъти по-висока в сравнение с тази на свободния ензим, което се обяснява с конформационни промени в ензимната молекула или с дифузионни ограничения, водещи до понижение скоростта на образуване на ензим-субстратния комплекс. Така инж. Янева конструира оптичен биосензор с широк линеен диапазон на действие ($2,2\text{--}58 \cdot 10^{-5}$ M) за L-тирозин, кратко време за отговор (до 60 сек.), добра възпроизводимост в период от 30 дни, корелационен коефициент на стандартната права $R^2=0,9397$ и относително стандартно отклонение R.S.D. = 3,13.

Конструиран е и оптичен биосензор измерващ консумацията на кислород на основата на ковалентно имобилизирана тирозиназа с широк линеен диапазон на действие ($0,8\text{--}8 \cdot 10^{-5}$ M) за L-DOPA и фенол, с време за отговор до 30 секунди и добра възпроизводимост в период от 30 дни. Неговото основно предимство е високата чувствителност по отношение консумацията на кислород при ниски субстратни концентрации.

Важен предимство на имобилизацията върху новите хибридни мембрани е по-високата стабилност на ензима при съхранение в сравнение със свободния ензим. Така например, имобилизираната тирозиназа съхранявана активността си във фосфатен буфер при 4°C до 80 дни.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

По-важните научно-технологични приноси на дисертацията са формулирани в последния раздел – Изводи и Приноси. Докторантката за първи път синтезира по зол-гелен метод трикомпонентни хибридни мембрани съдържащи колоиден SiO_2 , целулозни естери и съполимер на акриламид/акрилонитрил, използвайки като източник на SiO_2 органосилициевите съединения TEOS, TMOS, ETMS и MTES. На тази основа тя създава оптични биосензори съдържащи имобилизирана тирозиназа, както и тирозиназа + пероксидаза за определяне на фенол и биогенни феноли в отпадъчни води, храни и други проби. За първи път тя получава тънки (до 300 nm) и ултратънки (до 12 nm) полимерни покрития от съполимер на акриламид-акрилонитрил.

8. Публикации по дисертационния труд

Резултатите от изследванията свързани с дисертацията са отразени в 4 научни статии в рефериращи се списания, от които 2 са с ИФ. В една от публикациите инж. Янева е водещ автор. Резултатите са докладвани и на 13 национални и международни научни форуми, в 8 от които тя е първи автор.

9. Автореферат

Запознат съм с проекта за автореферат и намирам, че той отразява адекватно съдържанието и постиженията на дисертацията.

11. Критични забележки и препоръки

Дисертационният труд е написан с вещина на точен и ясен научен език и с минимална употреба на чуждици. Към проекта за дисертация имах някои критични бележки и препоръки, поставени по време на апробацията, които са взети предвид при окончателното оформяне на дисертационния труд. В рецензирания вариант обаче откривам една нова неприятна грешка, която съм склонен да приема като техническа.

Настоящото заглавие на дисертацията е „Биосензори за фенол и допамин“, но в дисертацията никъде *допамина* не е използван като субстрат за тирозиназата, а вместо него е използвана L-ДОПА (която е киселина, а не амин!). За *допамин* отново се говори в Изводи и Прлиноси (Принос № 3).

12. Лични впечатления

Познавам гл. ас. Спаска Янева като студент-задочник по биотехнология, която е положила при мен 2 изпита с отличен успех. Отлични са и впечатленията ми от защитата на нейната дипломна работа, както и от сега рецензираната докторска дисертация.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на гл. ас. инж. Спаска Янева е пример за научна разработка с подчертан приложен характер. При нейната реализация са използвани знания и умения от различни сфери на фундаменталните природни науки, като органична химия, аналитична химия, физикохимия, биохимия и др., както и инженерни познания свързани с конструирането на оптични и амперометрични биосензори и оптимизация на биолотехнологичните процеси. Изследванията, проведени със съвременна методология и модерна експериментална техника, са довели до резултати публикувани в 4 научни статии и 13 доклада. Чрез своите научни постижения и научна продукция докторантката се представя като зрял изследовател и преподавател, който напълно удовлетворява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника на ХТМУ-София за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“. Въз основа на всичко казано, убедено препоръчвам на уважаемото Научно жури определено да проведе защитата на дисертационния труд на С. Янева *да ѝ присъди образователната и научна степен „Доктор“* в професионално направление 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества).

25.07.2013 г.

Рецензент:



/Член кор. Проф. дбн Иван Г. Иванов/