

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Емилия Димитрова Найденова, катедра „Органична химия“, ХТМУ

ОТНОСНО: Дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ от инж. Спаска Атанасова Янева

Научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества).

Тема на дисертационния труд: **„Биосензори за фенол и допамин“**

Научен ръководител: проф. д-р инж. Любов Константинова Йотова.

1. Кратки биографични данни

Докторантката инж. Спаска Атанасова Янева е завършила висшето си образование в ХТМУ, гр. София като **бакалавър:** специалност „Органичен синтез“, задочно обучение през 2004 г и като **магистър:** специалност „Биотехнологии“, задочно обучение през 2007 г с отличен успех от дипломната защита. От 13.03.2008 е зачислена като задочен докторант при катедра „Биотехнологии“ с научен ръководител проф. д-р инж. Любов Йотова. От 2003 година до сега, тя работи в ХТМУ, катедра „Основи на Химичната Технология“ като лаборант, инженер-химик, асистент, старши асистент, а от 2012 г. до момента е главен асистент.

Научните интереси на инж. Янева са областта на имобилизация на ензими, носители за имобилизация получени чрез зол-гелен синтез, конструиране на биосензори за определяне на токсични съединения.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Дисертационният труд е написан на 115 стандартни страници, от които въведение - 1 стр.; литературен обзор - 30 стр., като той завършва с изводи взети под внимание при поставяне на основната цел и задачи на дисертацията. (~35%); цел и задачи на дисертационната работа - 1 стр., Материали и методи – 15 стр., резултати- 43 стр., дискусия- 9 стр.; изводи и приноси- 2 стр., цитирана литература - 13 стр. Използваната литература съдържа 191 източника, от тях само 3 са на

кирилица, останалите са на латиница. Отлично впечатление прави, че основна част от литературните източници са от последните 5 години.

В дисертацията са включени 66 фигури и 26 таблици, като резултатите са отразени в 46 фигури и 20 таблици. Дисертацията има списък на използваните съкращения и списък на фигурите и таблиците, което значително улеснява четенето.

2.1 Актуалност на тематиката

Представеният дисертационен труд от инж. Спаска Янева разглежда изключително важен и актуален проблем за съвременната биотехнология. Създаването на нови биосензори през последните години се утвърждава като една перспективна област в развитието на чувствителни техники за анализ и контрол на ксенобиотици. Биосензорите намират все по-широко приложение при определянето на замърсители на околната среда, контрол на лекарства и храни, бързо определяне на минимални количества метаболитни продукти в кръвта и др.

Настоящото изследване е насочено към създаване на нов биосензор с оптични влакна, на основата на ковалентно имобилизирана тирозиназа върху новосинтезирана група хибридни мембрани с потенциалното приложение за определяне на фенолни съединения и допамин в отпадъчни води, храни и козметика. Целта е точно и ясно формулирана, а конкретните задачи за реализирането и са много добре подбрани.

2.2 Познаване на проблема

В литературния обзор са разгледани съвременните методи за анализ на ксенобиотици и ефективността на биосензорите на основата на имобилизирана тирозиназа за контрол и определяне на полифеноли. Съпоставени са предимствата и недостатъците на оптичните биосензори. Задълбочено са разгледани техниките за имобилизация на ензими в зависимост от носителя и конструкцията на биосензора. Особено внимание е обърнато на подбора на мембрани и по-специално на зол-гел хибридните материали. Показано е, че въпреки техните предимства, крехкостта и чупливостта им са основна пречка за приложението им като носители на биомолекули. Това мотивира изследователите

да търсят създаване на органично/неорганични хибридни мембрани преодоляващи описаните ограничения. Много добро впечатление прави, че литературният обзор е написан компетентно. Направена е солидна библиографска справка и е обработена голяма по обем информация, която е интерпретирана с разбиране, което ме убеждава, че докторантката познава литературния материал по темата. Използваната литература е предимно от последните години, което показва, че инж. Янева е добре запозната със съвременните биосензори, както и с възможностите, които дава използването на кварцово кристална микровезна (QCM) и сканираща електронна микроскопия (SPR) за изясняване на взаимодействието между носителя и ензимните молекули. На базата на обширния и съвременен литературен обзор и направените от него изводи, коректно са формулирани целта и задачите на изследванията в дисертационната работа.

2.3 Методика на изследването

В материали и методи подробно е описано получаването на хибридни материали по зол-гел метода, приложения метод за получаване на тънки покрития и съвременните методи за охарактеризиране на синтезираните хибридни материали. Изследваната голямата група матрици е наложила необходимостта от оптимизиране на технологията за имобилизация върху носителите. За целта е конструирано устройство за имобилизация на ензими, което има редица предимства подробно описани в дисертацията.

Всички избрани методи за изследване позволяват постигане на поставената цел и получаване на адекватен отговор на задачите, поставени за решаване в дисертационния труд. Много и разнообразни методи усвоени от докторантката показва, че тя се е изградила като много добър експериментатор и изследовател в областта на биосензорите.

3. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

Докторантката е насочила изследванията си към един от важните за биотехнологията проблеми, а именно синтезирането на нови хибридни мембрани за имобилизация на ензими и конструирането на биосензор с практическо

приложение. Безспорно, изследванията ѝ до голяма степен са предопределени от опита и постиженията на научния ѝ ръководител проф.Л.Йотова, която има сериозни успехи в тази област и по-конкретно в разработването на биосензори.

Разделът „Резултати“ и последвалата „Дискусия“ в научния труд на инж. Янева показват, че това е едно сериозно изследване. Получените експериментални резултати са представени в таблици и добре оформени фигури, така че да позволяват извличане на максимална информация от тях. Те са интерпретирани коректно, на високо научно ниво Дискусията е задълбочена, като собствените резултати се съпоставят с наличните данни в литературата.

Както беше вече отбелязано инж.Янева си поставя за цел да разработи и оптимизира оптични биосензори за определяне на фенол и допамин, на основата на имобилизирани моно и двуензимни системи, върху получени по зол-гелен метод хибридни мембрани.

Изследванията са съсредоточени най-напред върху получаване по зол-гелен метод на нови хибридни мембрани на основата на тетраетокси силан (TEOS) и тетраметокси силан (TMOS)- целулозен ацетат бутират (CAB) и съполимер на акриламид/акрилонитрил. Получените хибридни мембрани са прозрачни, пластични и механично устойчиви и са охарактеризирани с сканираща електронна микроскопия. Те са използвани за имобилизация на моделни ензими – глюкозооксидаза (GOD) и пероксидаза (POD), като са изследвани кинетичните параметри на свободните и имобилизираните ензими и каталитичните им свойства. Изследвана възможността за конструиране на амперометричен биосензор. Времето за отговор на амперометричния биосензор е много кратко, а стандартната крива е с широк линеен диапазон и с висок коефициент на корелация, напълно удовлетворяващ един аналитичен метод.

На следващ етап от изследванията новосинтезираните мембрани са модифицирани, като са променени източника на силициев диоксид и целулозното производно. Модифицираните мембрани са използвани за имобилизация на пероксидаза. Получените резултати за специфична и относителна активност са много добри, като е установено че влияние оказват целулозните производни, а не

вида на силициевия прекурсор. След установената биосъвместимост между трикомпонентните хибридни мембрани и моделния ензим – пероксидаза е проведена имобилизация на тирозиназа. Изследвани са каталитичните свойства на имобилизирания ензим спрямо два моделни субстрата:

L- тирозин и L-DOPA. Установено е че имобилизираната върху хибридни матрици тирозиназа проявява по-високо сродство към L-DOPA, в сравнение с L-тирозин като субстрат.

Зол-гелните хибридни матрици са термично стабилни, химически инертни и запазват високата каталитична активност на ензима.

Конструиран е оптичен биосензор на основата на ковалентно имобилизирана тирозиназа върху хибридната мембрана, показала най-добри показатели. Конструираният оптичен биосензор, измерващ консумацията на кислород на основата на ковалентно имобилизирана тирозиназа показва широк линейен диапазон на действие за L-DOPA и за фенол, кратко време за отговор до 30 секунди, и добра възпроизводимост в период от 30 дни.

Един от съществения приноси на дисертацията е, че новосинтезираните мембрани са приложени за носители на двуензимната система – тирозиназа/пероксидаза при което ензимните молекули повишават каталитичната активност на реакцията. Това се дължи на по-ефективното запълване на повърхността на матриците, а от там се подобряват и работните параметри на биосензора.

Новите биосензори показват отлична оперативна стабилност и висока чувствителност по отношение консумацията на кислород при ниски субстратни концентрации.

Проведени са изследвания за инхибиторното действие на класически за тирозиназите инхибитор – бензоена киселина и галантанин модифициран с пептиди. Инхибиторното действие е определено спрямо субстрат L-DOPA при различни концентрации.

За конструирането на биосензори с добри работни параметри, особено важно е получаването на мембрани и покрития с точно определена дебелина на слоя. За първи път са получени тънки (до 300 nm) и ултратънки (12 nm) полимерни

покрития от съполимер на акриламид/акрилонитрил. Доказана е ефективна ковалентна имобилизация на тирозиназа.

Дисертацията е много добре оформена и структурирана, като отделните части в собствените изследвания са представени в хронологична последователност.

Формулирани са 4 приноси на дисертационния труд, които точно отразяват получените резултати. Те имат оригинален характер и обогатяват съществуващите знания в областта.

4. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Авторефератът, който е 53 страници, съответства на съдържанието на дисертацията и представлява съкратен вариант на нейната същност, отразява напълно и достоверно резултатите, постигнати в дисертацията, както и техния анализ.

5. Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд

Научните резултати от дисертационния труд са представени в 4 публикации, две от които в списания с IF- *Biotechnology & Biotechnological Equipment* и *Bulgarian Chemical Communication*, една в журнала на ХТМУ- *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* и една в *Bioautomation*.

инж. Спаска Янева е участвала с доклади и постери на 13 национални и международни конференции. Публикациите отразяват напълно получените експериментални резултати.

6. Критични бележки

Имам следните забележки:

- Подфигурния текст на фиг.39 не е пълен.;
- На стр 98 има грешка при изписването на аминокиселината левцин.
- Не съм съгласна с използвания от докторантката израз – „Белтъчни производни на галантамина“. Тя използва модифициран галантамин, който

включва пептидна верига. Във връзка с това имам следния въпрос: Каква е разликата между пептид и белтък? Има ли белтъчна молекула в галантамина?

- При изследванията с производни на галантамина не става ясно дали е работено само с имобилизиран или със свободен ензим. Има ли различия в отнасянията на имобилизирания ензим?

Направените забележки имат редакционен характер и не намаляват научната стойност на дисертационния труд.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Дисертационният труд на инж. Спаска Янева е посветен на актуален за практиката проблем. Синтезирани са нови нови трикомпонентни хибридни мембрани, за имобилизация на ензими въз основа на които е конструиран оптичен биосензор с много добри показатели и практическо приложение за определяне на фенол и допамин в отпадъчни води, храни и други реални проби.

При изпълнението на задачите докторантката показва много добро познаване на литературата по проблема, на експерименталните постановки и методики, възможности за самостоятелна научно-изследователска работа, зрялост при представянето и интерпретирането на резултатите.

Предвид добре проведеното изследване, достатъчният по обем материал, цялостното оформление на разработката и научните публикации във връзка с дисертационния труд, с убеденост препоръчвам на почитаемите членове на Научното жури да гласуват положително за присъждането на образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества) на инж. Спаска Атанасова Янева

9.09. 2013 г.



Проф.д-р Емилия Найденова