

## РЕЦЕНЗИЯ

От проф. дбн Искра Витанова Иванова, Софийски университет „Свети Климент Охридски”, Биологически факултет

**На дисертационен труд на тема: „Биосинтеза ,изолиране и охарактеризиране на колагенази от мезофилни и термофилни актиномицети”,**

Автор на дисертационния труд: Детелина Христова Петрова

Научни ръководители: проф. дбн Стоян Влахов

### **1. Актуалност и значимост на дисертационната тема**

Микробни колагенази са получили специално внимание в медицината и биотехнологията, поради способността им да се хидролизират тройно спиралната структура на нерастворимия природен колаген на малки фрагменти. Следователно, те са широко използвани в хранителната, козметичната, фармацевтичната и кожарската промишленост. В последните години, колагеназите имат клинични и терапевтични приложения, особено за лечение на болестта на Dupuytren's Дюпюитрен и различни видове деструктивни фибрози, като цироза на черния дроб. Колагеназите също се използват като хидролизиращи агенти за получаване на колагенови пептиди с важни биологични активности, сред които антиоксиданти, функционални храни за облекчаване на дефицит на паметта, свързани със стареенето и ингредиенты за хранителни материали и продукти за парентерално хранене.

Продукцията на колагенази от бактерии е добре документирана и описана, но малко внимание е отделено на изучаването на стрептомицетите, познати основно като продуценти на антибиотици. Почвените стрептомицети участват активно в деградацията на белтъчни отпадъци в природата и притежават способност да синтезират комплекс от протеолитични ензими с

широк спектър на действие. Тази особеност на стрептомицетите ги прави естествен резервоар на перспективни продуценти на колагенази.

## **2. Оценка на структурата на дисертационния труд**

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със следните раздели. Дисертационният труд обхваща 203 страници стандартен компютърен текст с 48 фигури и 38 таблици. В библиографската справка са включени 355 заглавия, от които 18 на кирилица и 337 на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Обща и промишлена микробиология на СУ „Св. Кл. Охридски“. Той е структуриран по стандартния начин: Увод – 2 стр., Литературен обзор – 56стр., Материали и методи” – 13 стр., Резултати и изводи - 108стр., Списък на цитираната литература – 359 автора. Необходимо е да се отбележи, че представената литературна справка е един задълбочен анализ на състоянието на проблема и дисертантката го познава изключително добре.

### **2.1. Литературен обзор**

Смятам, че литературният обзор е правилно структуриран и има пряко отношение към целите на дисертацията и поставените задачи. Обзорът на дисертационния труд засяга интересни и важни аспекти от съвременната микробиология. Той може условно да бъде разделен на три части. В първата си част се предлага информация за микробниалните протеази и тяхната класификация. Втората основна част е посветена на колагеназите, техните субстрати, механизъм на действие, видове и значение. В третата част са предложени данни за оптимизиране на синтеза на колагенази, както и технологични схеми за пречистването им.

### **2.2. Цел и задачи**

Дисертационният труд на Детелина Христова Петрова е посветен на изучаването на микробниални колагенази от мезофилни и термифилни актиномицети, тяхното изолиране и охарактеризирането им. Трудностите при изолирането на колагенази и тяхната очистка до хомогенно състояние е, че те се синтезират в комплекс с голям брой други хидролази и са незначителна част от общото им количество. Ето защо докторантката формулира задачи, които включват всички задължителни етапи на такъв експериментален подход с едно изключително подробно проучване и получените резултати биха имали важно значение за практиката.

### 2.3. Материали и методи

Това е една важна част от дисертационния труд, която показва нивото на научните изследвания. Представени са съвременни микробиологични, молекулно-аналитични, така че самото им овладяване и успешно прилагане е вече един безспорен успех. Заслужава да се подчертаят методите изолиране на колагенази чрез ултрафилтрация, хроматографски методи, електрофоретични анализи. Методите са описани прецизно, без подробности, но достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени.

### 2.4. Резултати и обсъждане

Смятам, че получените резултати са убедителни и тяхната достоверност не подлежи на съмнение. Следвайки логичната последователност на поставените задачи авторката:

1. Разработва схема за изпитване на 51 мезофилни стрептомицетни щамове за способността им да синтезират конститутивно извън клетъчни хидролази. Най-висока активност има *S. cremeus* 3Б. Изолираните колагенази от този щам, са металопротеази, постигната е степен добра степен на пречистване. Трябва да се подчертае, че е проведена огромната работа по оптимизиране на средите за култивиране на изучавания щам.
2. След скрининг на 6 термофилни актиноцитети е избран Щам 21Е, който на базата на морфологични, културални и физиолого-биохимични характеристики показва сходство с вида *Thermoactinomyces sacchari*. Този щам синтезира екстрацелуларна колагеназа. И в тази част на разработката се повежда работа по оптимизиране на условията за синтезата на ензима. Изолираната и охарактеризирана колагеназа се отнася към сериновите протеази и добива от проведеното хроматографско пречистване е 21%. Необходимо е да се отбележи, че термофилната колагеназа от *Thermoactinomyces sacchari* 21Е е с по-висока термостабилност от известните термофилни колагенази.

### 2.5. Изводи и приноси

Въз основа на огромната експериментална работа дисертантката прави 10 извода, които произтичат логично от получените резултати. В дисертационният труд са отразени 4 приноси с научен и научно-приложен характер, които приемам. За най-съществен приемам приноса: *Разработени са достъпни и евтини методи за изолиране и висока степен на пречистване*

на колагенази от мезофилен стрептомицетен щам *Streptomyces cretensis* 3B и термофилен актиномицетен щам *Thermoactinomyces sacchari* 21E.

### **3.Участие на докторанта в изработването на дисертацията**

Имам лични впечатления от докторантката и считам, че изпълнението на дисертационния труд е нейно дело, както и предвид нейната позиция в излезлите от печат публикации, свързани с дисертационния труд.

### **4.Препоръки, забележки и въпроси**

Към докторантката имам следните въпроси:

- a. Кои са основните аминокиселини участващи в структурата на колагена и към които е насочено действието на колагеназите?
- b. От значение ли е нативността на колагена за действието на колагеназите?
- c. Какво е значението на колагеназите за самият продуцент?
- d. На какво може да се дължи разнообразието от различни молекулни маси на известните колагенази?

### **5. Публикации във връзка с дисертационния труд**

Изследванията във връзка с дисертацията са отразени в две научни публикации с импакт фактор. Това е причина дисертационният труд да получи международно признание. Една от публикациите е цитирана седем пъти. Докторантката е на първо място във всички статии, което означава, че има важно участие в изработването на дисертационния труд.

### **6.Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”**

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантката Детелина Христова Петрова е придобила компетенции и умения, които могат да бъдат групирани по следния начин:

- разширила е теоретичната си компетентност в областта на микробиологията
- придобила е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научна информация.
- обогатила е методичните си умения, особено в частта на прилагането на

редица съвременни методи

- придобила е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите, получени в хода на разработването на дисертацията, както и да прави изводи на базата на тях

Всичко това ми дава основание да смятам, че докторантката е придобила компетенциите и уменията, които се изискват за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

## **7. Заключение**

Представеният дисертационен труд е едно завършено изследване, което предоставя ценна научна информация и разкрива възможности за практическо приложение. Много добрата теоретична подготовка е дала възможност на докторантката да подбере и съчетае набор от класически съвременни микробиологични, биохимични и аналитични методи, които осигуряват изпълнение на поставените задачи и постигането на целта. Смятам, че обемът на този труд е внушителен, направени са много анализи, получени са ценни резултати, направени са важни изводи, а изследването има научно-приложни приноси. Авторефератът е направен по изискванията и отразява вярно основните резултати и изводи на дисертационния труд.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академичния състав в Република България и този на Софийския Университет „Св.Кимент Охридски” считам, че настоящият труд отговаря на изискванията за докторска дисертация, оценявам го положително и препоръчвам на Научното жури, сформирано със заповед на Ректора на СУ No PД 38-306 / 12. 05. 2015 г. да присъди на Детелина Христова Петрова образователната и научна степен „доктор” по Професионално направление 4.3 Биологически науки Научна специалност (Микробиология).

31.05.2015 г.

Рецензент: .....

София

(проф. дбн И. Иванова)