

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Илия Николов Илиев,

катедра „Биохимия и микробиология” при ПУ „Паисий Хилендарски” – Пловдив

Относно: дисертационен труд на тема „**Биосинтеза, изолиране и охарактеризиране на колагенази от мезофилни и термофилни актиномицети**” представен от докторант Детелина Христова Петрова от катедра „Обща и промишлена микробиология” към СУ „Св. Климент Охридски“ за придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР” по професионално направление по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Микробиология.

Получени материали: Дисертация, автореферат, списък с публикации по дисертацията, CD с материали по дисертацията. Всички материали са в съответствие с изискванията на Закона за развитие на академичния състав в РБ и Правилника за неговото приложение.

Със заповед № РД 38-306/12.05.2015г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ съм определен за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” от докторант Детелина Христова Петрова на тема „**Биосинтеза, изолиране и охарактеризиране на колагенази от мезофилни и термофилни актиномицети**”. Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в лабораториите на катедра «Обща и промишлена микробиология» към СУ „Св. Климент Охридски“. Дисертацията е оформена по стандартен за България формат, написана е на 202 стандартни машинописни страници и съдържа следните основни глави: Увод – 1 стр., Литературен обзор – 56 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 14 стр., Резултати и обсъждане – 90 стр., Дискусия – 15 стр., Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Публикации и цитирания – 2 стр., Литература – 18 стр. Литературният обзор е онагледен с 4 таблици, и 7 фигури, а резултатите с 38 фигури, 2 схеми и 34 таблици. Докторантката Детелина Петрова е използвала твърде голям брой литературни източници общо 355, от които 18 на кирилица.

Детелина Петрова се е дипломирала през 1995г след завършване курса на обучение в специалност „Биотехнологични процеси“ в Биологически факултет на

СУ „Св. Кл. Охридски“. Редовен докторант е от 1997 до 2000г, след спечелен конкурс в катедра „Обща и промишлена микробиология“, Биологически факултет при СУ „Св. Кл. Охридски“. От 09.07.2000г. е отчислена с право на защита, поради изтекъл срок. В момента е главен асистент в Биологическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“.

Представеният дисертационен труд е по тематика, която според мен винаги да бъде актуална, поради стратегическото значение на протеолитичните ензими от различни природни източници, включително от микроорганизми и възможностите и необходимостта от използването им в различни отрасли на индустрията, включително и във фармацията и медицината. Изучаването многообразието на протеазите има и фундаментално значение. Да се проучат механизмите на трансформация на протеините, като биоинформационни молекули би хвърлило светина върху процесите на еволюционно закрепване на приспособителни механизми в живата природа. Актуалността на темата е осъзната от докторантката, което личи както от добре структурирания обзор, така и от акцентите на проведената от нея експериментална работа.

Литературният обзор включва обобщена информация за протеолитичните ензими и конкретна информация за колагенази, касаеща микробниални източници, механизъм на действие, технологични схеми на получаване на пречистени препарати от колагенази и техните свойства.

Целта на дисертацията е ясно дефинирана и конкретизирана за изучаване на колагенази от мезофилини стрептомицети и термофилни актиномицети, изолирани от различни източници. За постигане на поставената цел, докторантката е формулирала шест задачи, някои от които с няколко подзадачи. Те обхващат различни етапи от изучаването на протеазите от скрининг на щам-продуцент до пречистване и охарактеризиране на свойствата на ензимите, водещи до евентуално бъдещо индустриално приложение.

В раздел „Материали и методи“ са описани основните методи, които са прилагани при изпълнението на поставените задачи в дисертацията. По време на разработването на дисертационния труд Детелина Петрова е усвоила различни класически и съвременни микробиологични, биохимични, ензимни, хроматографски и биотехнологични методи, което е основание да се счита че е придобила необходимия методичен опит при извеждане на научен експеримент.

Цялата изследователска програма в дисертацията е построена на базата на скринингова програма за подбор на продуцент на колагеназа от мезофилни стрептомицети и термофилни актиномицети. В първите два етапа от изследователската програма авторката е скринирала 51 щам-продуцента и е

провела оптимизиране състава на хранителната среда и някои показатели, касаещи условията на култивиране за секретиране на протеази. Докторантката логично е провела и няколко класически експеримента за моделиране на различни параметри на ферментационния процес. Прави впечатление избраният подход, чрез първоначално използване на 4 различни субстрата (казеин, еластин, колаген, желатин) за проверка възможностите на щамове да секретират протеолитични ензими, което дава повече първоначална информация за типа протеази. В резултат на проведения скрининг са изолирани следните активни продуценти на колагеназа: *S. cremeus* 3В и *Thearmonoactinomyces sacchari* 21Е, като вторият щам е таксономично определен от докторантката.

Втората част от изследването е посветена на изолиране и пречистване на секретираните извънклетъчни колагенази, като се използват много различни стандартни хроматографски техники. Докторант Детелина Петрова е установила, че щам *S. cremeus* 3В секретира 80% екстрацелуларна колагеназа, а щам *Thearmonoactinomyces sacchari* 21Е – 83%. Докторантката умело е организираща схемата на пречистване на колагеназния комплекс от щам *S. cremeus* 3В и успешно е разделила две колагенази – колагеназа 1 и колагеназа 2, които е използвала при провеждането на анализи за охарактеризиране на основните им свойства, рН- и температурен оптимум, температурна стабилност. Изолиран, пречистен и охарактеризиран е колагеназен ензим и от щам *T. sacchari* 21Е. Проследявайки тази част от експерименталната работа на докторантката, аз оставам с приятното впечатление на прилагане на оригинален научен подход, чрез който се получават важни резултати не само за охарактеризирането на изследваните ензими, но и търсене на възможности за продължаване на експерименталната работа в перспективното направление на тяхното бъдещо приложение.

Всички резултати са представени в отделни глави от раздела „Резултати и обсъждане“, които логично следват хода на решаването на поставените задачи. Докторантката е дискутирала своите резултати в специална глава „Дискусия“. В резултат на експерименталната работа са формулирани 10 извода.

Основни научни приноси на дисертационния труд според мен са:

1. Получени са и първоначално охарактеризирани две колагенази от актиномицетен щам *S. cremeus* 3В и една термостабилна колагеназа от щам *T. sacchari* 21Е след оптимизиране на състава на хранителната среда и параметри на култивиране.

2. Получени са първоначални данни за свойствата на ензимите и вероятния механизъм на действие, които са важна предпоставка за последващи изследвания върху молекулярния им механизъм на действие.
3. На базата на получените резултати е предложена технологична схема за производство на колагеназите при доказване на перспективното им приложение.

Дисертацията е написана на ясен и стегнат научен език. Авторефератът отговаря на целите, задачите и постигнатите резултати в дисертационния труд.

Резултатите от дисертацията са публикувани в две научни публикации, една от които е в списание с импакт фактор и е цитирана 16 пъти, което е атестат за качеството на извършеното изследване.

Към докторатката имам следните въпроси:

1. Как установихте с използвания от Вас скринингов метод, че протеазите се секретират извънклетъчно?
2. Защо насочихте вашето изследване само върху колагеназната активност на щам-продуцентите и това не крие ли риск при последващи изследвания за приложението им за фармацевтични цели?

Към докторатката имам следните препоръки:

1. В раздел „Материали и методи“ не са подробно описани ензимните методи за анализ, което би затруднило сравнението на резултатите с други автори.
2. В раздел „Материали и методи“ неправилно е поставено заглавие „Хидролизни анализи“. Според мен по – точно заглавие е „Хидролиз на специфични субстрати“.
3. Съществуват раздели „Резултати и обсъждане“ и „Дискусия“. Според мен е подходящо първият раздел да е само „Резултати“.
4. В таблица 6 е записана „специфична колагеназна активност“, но единиците са за милилитър. По-правилно е да остане само „колагеназна активност“.

Заключение:

Оценката ми за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и научните приноси на докторантката Детелина Христова Петрова е изцяло положителна. Въпреки направените препоръки, бих искал да отбележа още веднаж достойнствата ѝ – на първо място една

изследователска работа, която включва всички етапи на едно биотехнологично проучване при създаване на технологична схема за получаване на ензими, надхвърляща необходимия минимум за една дисертация, съдържаща голямо количество резултати с научно и приложно значение. Докторантката правилно интерпретира и обобщава резултатите в предложената технологична схема.

Представената дисертация напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане. Постигнатите резултати ми дават основание да предложа да бъде присъдена образователна и научна степен „доктор” на **Детелина Христова Петрова** по професионално направление по област на висше образование 4.Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Микробиология.

01.06.2015г.

Изготвил:

Пловдив

(проф. д-р Илия Илиев)