

## РЕЦЕНЗИЯ

по Дисертация на тема **“Повърхностна реология на адсорбционни слоеве от протеина хидрофобин и от негови смеси с други протеини: експеримент и теоретичен модел”**; представена от **Гергана Милкова Радулова**, за получаване на образователната и научна степен **“доктор”** – 4.2. *Химически науки* (Теоретична химия).

**Рецензент:** Проф. д-р х.н. Емил Деянов Манев, пенсионер (до 2007 година: професор в катедрата по физикохимия, Факултет по химия и фармация на Софийския Университет “Св. Климент Охридски”).

Рецензираният дисертационен труд **“Повърхностна реология на адсорбционни слоеве от протеина хидрофобин и от негови смеси с други протеини: експеримент и теоретичен модел”** е представен за получаване на образователната и научна степен **“доктор”** от **Гергана Милкова Радулова**, редовен докторант в Катедрата по Инженерна химия при Факултета по химия и фармация на Софийския Университет “Св. Климент Охридски”.

### **Формални наукометрични показатели на дисертацията:**

Рецензираната дисертация съдържа 121 страници оригинален текст, включващ 49 фигури, 59 уравнения и 12 таблици. Цитирани са 110 литературни източника. Изложението е организирано в пет глави – всяка, от които с множество подзаглавия. Добавени са и още няколко допълнителните заглавия: “Основни приноси в дисертацията”, “Публикации по дисертацията”, “Друга публикация на дисертанта”, “Цитати на публикациите по дисертацията”, “Списък на научните доклади по темата на дисертацията” и “Списък на цитираните литературни източници”.

Дисертацията е построена върху научни резултати, представени в три публикации: две отпечатани през 2012 и третата – през 2015 год. И трите представляват статии в престижни научни списания с висок импакт фактор (*Langmuir, Faraday Discussions, Adv. Colloid Interface Sci*). Всички публикации включват за съавтори двамата научни ръководители и двамата научни консултанти на докторанта, както и общо четирима други съавтори в различни съчетания. По реда на публикациите дисертантът фигурира съответно на първо, второ и трето място сред авторите, което считам като указание за нейното активно участие и приноси. В периода на работа по докторантурата дисертантът има публикувана още една статия, също в престижно издание (*Soft Matter*, 2014), и 13 доклада свързани с дисертацията, повечето представени на международни научни форуми. Цитатите от чужди автори на включените в дисертацията статии са общо 19 за период по-малко от четири години, включително два цитата по най-новата публикация от 2015 година.

От броя на работите, местото на тяхното публикуване и интересът към тях в международната научна литература, може отсега да се прецени, че те надхвърлят (и количествено, и качествено) предписаните в критериите на СУ-ФХФ изисквания спрямо една докторска дисертация. Като достойнство на дисертацията ще посоча и съчетаването на експерименталното изследване с развитието на теоретичния модел.

### **Предмет и изследователска цел на дисертацията**

Дисертацията е посветена на структурата, свойствата и поведението на адсорбционни слоеве на междупазна границата вода/въздух. Главният обект на

изследване е протеинът хидрофобин: самостоятелно и в смес с други повърхностноактивни агенти. Така, по-конкретно предмет на изследване е ефектът на хидрофобин и неговите смеси с три други (млечни и яйчен) протеини, както и с нискомолекулно ПАВ (Tween 20), върху структурата и реологичното поведение на съответните изследвани системи.

**N.B.:** Тук ще отбележа, че от гледна точка на предмета на работа, формално заглавието на дисертацията, ако не неточно или чак подвеждащо, е все пак „юридически“ – непълно, защото според него обект на изучаване са единствено протеини!

Основната цел на дисертацията е формулирана така: „...Да се изследва повърхностната реология на адсорбционни слоеве от протеина хидрофобин, негови смеси с други протеини и смес на хидрофобин и ниско-молекулно ПАВ на границата вода-въздух. Да се използва адекватен реологичен модел, чрез който от получените експериментални данни да се определи повърхностната еластичност и вискозитет при прехлъзване на смесените адсорбционните слоеве. Да се изследва структурата на смесените адсорбционни слоеве и да се изясни връзката между структура и реологични свойства.” Предложената пространна формулировка включва и съответните изследователски задачи на дисертацията.

Изборът на темата на дисертационния труд и поставените цел и задачи са логично обосновани. Те безспорно притежават както приложна, така също и фундаментална актуалност за съвременната технологическа практика в управлението на устойчивостта на дисперсни системи. Добре известно е, че нискомолекулни ПАВ и протеини намират резултатно приложение в хранителната, химическата и фармацевтична промишленост като естествени стабилизатори на различни дисперсии. Практическото значение на тези обекти стимулира и изследователския интерес към тях. Потвърждение е погледът към специализираната научна литература. Респективно, повърхностните свойства и стабилизиращата способност на смеси от протеини (и ПАВ) в последно време са обект на изучаване в различни лаборатории по света, а са съществено застъпени и от изследователския екип на катедрата, откъдето се представя дисертантът. Работите в областта, публикувани от екипа на тази катедра, надхвърлят десет през последните пет-шест години.

Изборът на основния изследван агент също не е случаен. Ценните свойства на хидрофобина са познати от литературата: силно повърхностно активен, добър стабилизатор на дисперсии, образува повърхностни слоеве с висока еластичност, потиска Оствалдовото зреене и коалесценцията. Хидрофобинът обаче е скъп агент. Ето защо намирането на подходящи смеси с други компоненти, в които се запазват качествата му и при по-ниско съдържание, е важна практическа цел.

По-нататъшната ни дискусия е съобразена със структурата на рецензирания труд. **Глава 1 (Увод)** на дисертацията започва с кратък обзор и формулировка на основната цел. Специално внимание е отделено на познатите от литературата уреди (реометри) за изследване реологичните свойства на адсорбционните слоеве и на специфичните свойства на хидрофобин HFBI. Структурата на дисертацията е детайлизирана, с формулиране на поставените цели (задачи) по отделните части, свързани със съответните изследвания.

Както може да се очаква, уводът включва раздел наречен „Литературен обзор“. С риск да прозвуча като прекален формалист, ще отбележа, че постройката на този раздел, обхващащ поне 3/4 от главата, ми се видя странна.

От него, 1/3 е посветена на описанието на най-различни “Типове реометри, използвани при изследване на повърхностните реологични свойства на адсорбционни слоеве”, като от всичките дисертацията всъщност борави с един-единствен... За сравнение, още толкова е обемът, третиращ съществения аспект “Специфичните свойства на протеина HFBIII хидрофобин”, а “Връзка между повърхностната реология на адсорбционните слоеве и стабилността на пени” е още по-кратка. В допълнение, озадачи ме и фактът, че раздел със задължаващото заглавие “Литературен обзор” посочва едва дваайсетина от цитираните в дисертацията 110 литературни източника, а дори цялата уводна част – под половината.

При все това, макар цитираните литературни източници да не са съсредоточени в т.нар. “Литературен обзор”, а се появяват повече в следващите глави – на места, където е конкретното им обсъждане – не усетих това да създава пречки. Съдейки по броя и характера на източниците, моето заключение е, че авторът е компетентен изследовател, който познава задълбочено литературата в областта, така че проучването, което представя е достатъчно пълно, за да предложи цялостна картина в дисертацията.

По-нататък в дисертацията (**Глава 2**) са описани работните вещества и основните експериментални методи, използвани за охарактеризиране на изследваните системи. Адекватно и детайлно са охарактеризирани използваните протеини с различен тип и структура и нискомолекулното ПАВ Tween 20. Описани са процедурите за приготвяне на работните разтвори, методите и устройствата за определяне свойствата и характеристиките на изучаваните адсорбционни слоеве.

Работни вещества. Изследванията са проведени с четири протеина, подбрани с различна структура и свойства за изучаване на поведението им в адсорбционния слой:

**Хидрофобин клас II (HFBIII):** глобуларен протеин с молекулна маса  $M_w = 7.2$  kDa, притежаващ редица ценни за практика свойства.

**$\beta$ -casein:** неструктуриран протеин,  $M_w = 24$  kDa.

**$\beta$ -lactoglobulin (BLG):** глобуларен протеин с  $M_w = 18.4$  kDa, образуващ димери.

**Овалбумин (OVA):** протеинът с най-голяма молекула:  $M_w = 45$  kDa.

**Ниско-молекулното ПАВ** е нейонният полиоксиетилен 20-сорбитан монолаурат (Tween 20), с  $M_w = 1228$  Da и критичната концентрация на мицелообразуване (CMC)  $\approx 50$   $\mu$ M.

**Н.В.:** Според текст в дисертацията (стр.18-19) за експериментите с участие на Tween 20 са използвани концентрации под и над CMC, за което ще стане дума по-нататък (вж. при **Глава 5**).

**Електролит (10 mM NaCl)** е използван в експериментите с тънки течни филми за частично(?) екраниране на електростатичното отблъскване.

**Н.В.:** Това, което чувствам да липсва като информация е обяснение на подхода при избора на концентрациите за провеждане на експериментите. Например, как е получено “магическото число” 0.005 (wt % HFBIII)? Знаещите може би го приемат като даденост, известна по условие, но за останалите читатели на дисертацията това сведение е интригуващо и заслужава да присъства – тук и/или по-нататък.

Експериментални методи. За охарактеризиране на повърхностни свойства на изследваните разтвори е приложено съчетание от експериментални методи, целящо взаимното им допълване в изследването:

**Ротационен реометър с биконична приставка.** С него са проведени два типа реологични измервания: в стационарен режим и в осцилаторен режим.

**Клетка на Шелудко-Ексерова** е използвана в експериментите за единични пенни филми (при “затворена” и “отворена” клетка).

**Клетка на Майселс-Джоунс**, известна още като “**Thin-film\_Presure-balance**“, позволява да се измерят изотермите на разклинящото налягане в зависимост от дебелината на филма по микроинтерферометричния метод (Scheludko & Exerowa, 1959; Scheludko, 1967).

**Н.В.:** Струва ми се, че щеше да е полезно дисертацията да съдържа по-детайлни схеми и/или описания на използваните устройства, както напр. за “затворена/отворена” клетка и ролята на двата режима.

Считам, че **Глава 2** е достатъчно информативна и, заедно с уводната част (въпреки необичайната форма и съдържание на последната) изграждат основата за развитието на следващите раздели.

Останалите три глави от дисертацията представят проведените експериментални и теоретични изследвания.

**Глава 3** представя изследванията на повърхностното реологично поведение при деформации на прехлъзване в адсорбционни слоеве от хидрофобин HFBI и  $\beta$ -казеин – два протеина съществено различни по структура и свойства – поотделно и в смеси. Експериментите са проведени посредством ротационен реометър в стационарен режим (постоянна скорост на деформация) и последваща релаксация. Въз основа на получените данни е установен реологичният модел, който е в най-добро съгласие с експеримента. **Глава 4** представя резултатите от изследванията на адсорбционни слоеве, образувани от същите системи, както в Глава 3, но в осцилаторен режим. Реологичният модел, разработен при стационарен режим е доразвит съответно и за режим на осцилации. Изследванията в тези два раздела са дали няколко нови резултата:

Според автора, тук е “...първото изследване, в което повърхностната реология на прехлъзване на хидрофобинови адсорбционни слоеве на границата въздух/вода, е изследвана в стационарен и релаксационен режими и получените данни са интерпретирани в рамките на реологичен модел”. Главното предимство на стационарния режим е, че позволява да се идентифицира реологичният модел, описващ количествено поведението на системата. Резултатът е, че при фиксирана скорост на деформацията на прехлъзване е получено добро съгласие с модела на Максвел като последователно свързани еластична и вискозна съставляващи.

Съответстващ нов резултат е, че зависимостта на напрежението от времето се подчинява на модела на Максвел в стационарен режим, а в релаксационния режим следва модифицирания закон на Андраде (с две релаксационни времена). Това разграничаване е обяснено чрез различните процеси във вискоеластичния адсорбционен слой: (1) разрушаване/възстановяване на междумолекулните връзки при стационарен режим; (2) втвърдяване на адсорбционния слой при режим на релаксация.

Високите стойности на повърхностната еластичност на прехлъзване при HFBI +  $\beta$ -казеин са намерили обяснение с образуването на двоен повърхностен слой: от по-хидрофобния HFBI към въздушната фаза и от по-хидрофилния  $\beta$ -казеин към водната фаза.

Съответно, предложен е самосъгласуван реологичен модел за вискоеластични протеинови адсорбционни слоеве, който позволява да се определят повърхностните еластичност и вискозитет на прехлъзване като универсални функции на скоростта на деформация, независимо от използвания кинетичен режим (стационарен или осцилаторен). Така е постигнато пълно съгласие между резултатите, получени в двата различни кинетични режима.

**Глава 5** от дисертацията представя изследванията на повърхностната реология на адсорбционни слоеве от смеси на хидрофобин HFBII с  $\beta$ -лактоглобулин, овалбумин и нейното повърхностно-активно вещество Tween 20. Отново е проверена приложимостта на разработения реологичен модел. Проведени са и експерименти с тънки течни филми, образувани от разтвори на всички изследвани в дисертацията системи.

Тук най-напред имам няколко въпроса, на които ще очаквам отговори от автора:

- Защо за смесите е избрано/предпочетено нейонно ПАВ? – По-конкретно, освен приложните достоинства на Tween 20, такъв избор има ли други специални предимства?

- Още в началото (вж. Глава 2, стр.18) е заявено, че "...в експериментите в дисертацията са използвани разтвори на това ПАВ с концентрации **под и над ККМ**". Тук, в Глава 5, концентрацията, с която видях да се борави основно беше "4.8  $\mu$ M Tween 20" (са. 0.1 ККМ). Открих при филмите още една концентрация, маскирана като "0.005wt% Tween 20", която е по-висока, но все още под ККМ. Така остава висящо: били ли са предвиждани въобще експерименти с Tween 20 над ККМ, или те са плод на случайна неточност в израза?!

- Пак там в началото (Глава 2, стр.19) пише: "В експериментите с тънки течни филми сме използвали...електролити: NaCl (10 mM) за **частично екраниране** на електростатичното отблъскване...". Не открих обяснение – нито там, нито тук: защо електростатичното взаимодействие в тънкия филм трябва да се "екранира частично". – Каква е била целта и какви са предимствата му, вместо напр. с малко повече електролит да се екранира напълно?

- Въз основа на измерената дебелина на пенни филми, в дисертацията са формулирани важни изводи за структурата на адсорбционните слоеве от различните смеси. Заявени са стойности за дебелината на филмите от порядък на 14-10-6 nm... За човек запознат с подобни измервания по микроинтерферометричния метод звучат впечатляващо установените фини разлики между тези миниатюрни стойности. Не е посочена обаче прецизността, с която са определени те. Важно е следователно да се знае – каква е точността в измерването на дебелината и каква е оценката за надеждността на получените стойности, което рефлектира върху заключенията за адсорбционните слоеве.

- Към предишното: каква е ролята на експериментите с пенни филми с "отворена" и "затворена" измерителна клетка и има ли съответно резултатна разлика?

Ще си позволява да задържа още вниманието към експериментите с тънки течни филми и резултатите от тях. Сред "Основни резултати в Глава 5" за тях има едно изречение, сгушено в първа точка, и още едно изречение в самия край на последната пета точка от "Основни приноси в дисертацията". Така остава усещането, че – въпреки впрегнатите сериозни ресурси (микроинтерферометричният метод с два различни типа измерителни клетки) – тези резултати са по-скоро придатък към главните (реологични) приноси.

Вероятно известна роля за такова впечатление играят и личните предпочитания – на рецензента и автора на дисертацията, но вярвам, че няма и не бива има подценяване на значението им. Все пак, благодарение именно на резултатите от експериментите с тънките течни филми е установена (потвърдена) структурата на изследваните смесени адсорбционни слоеве!

Глава 5 наистина добавя съществени нови резултати:

Установено е, че ефектът от смесването на хидрофобин HFBII с добавки (BLG, OVA,  $\beta$ -казеин, Tween 20) е разнопосочна, в зависимост от природата на добавката:

При смеси с глобуларни протеини (BLG или OVA) повърхностният реологичен отклик на адсорбционни слоеве остава висок чак до са. 95 wt% добавка спрямо HFBII. Определените в експериментите с пенни филми дебелини показват, че ефектът се дължи на образуването на двуслойни структури на двете повърхности, като по-хидрофобният HFBII образува горен слой обрънат към въздушната фаза, докато глобуларните протеини (BLG, OVA) образува втори адсорбционен слой, прилепнал към хидрофобиновия откъм водната фаза (вж. Фигура 5.11A).

В контраст на предишното, добавянето на неструктурирания  $\beta$ -казеин или нейонния ПАВ Tween 20 води до флуидизиране на адсорбционния слой при нива на добавките сравними и по-високи от тези на HFBII. Ефектът е обяснен с проникването на хидрофобните вериги на  $\beta$ -казеина и Tween 20 между молекулите на HFBII на повърхността, което разрушава целостта на еластичната повърхностна хидрофобинова мрежа.

Вискоеластичният тиксотропен модел, които се основава на уравнения (5.1) и (5.6), се оказва адекватният реологичен модел, съответстващ на получените резултати.

#### Общи изводи

Представената дисертацията представлява системно експериментално и теоретично изследване на смесени адсорбционни слоеве върху водна повърхност, насочено към изясняването на съществени страни от структурата и реологията на слоевете от протеини (и ПАВ). Използваната в дисертацията комбинация от методи за определяне на повърхностни свойства и пенните тестове се допълват взаимно, за да предложат нов поглед към адсорбцията и реологичното поведение в смесени системи. Получена е значителна по количество и качество нова информация, която има фундаментална, а също и приложна стойност.

В основните научни и научно-приложни приноси на рецензираната дисертация има резултати в няколко насоки, включващи формулиране и обосноваване на нови хипотези за възможната структура на смесените слоеве; доказване с нови средства на нови страни на съществуващи проблеми; получаване и доказване на нови и потвърдителни факти.

Резултатите в настоящата дисертацията, могат да допринесат за количествено характеризирание и по-дълбоко разбиране на факторите, които контролират повърхностната реология на протеиновите адсорбционни слоеве с потенциално приложение в създаването на стабилни пенни и емулсионни системи с фини дисперсни частици.

Техническото оформление на дисертацията е отлично и заслужава похвала за грижливото оформление, особено по отношение на фигурите.

Дисертацията е написана на добър български език: от литературна и научна гледна точка. Рядкост са грешки като: не-по-български-звучащ словоред (стр.

22, 64, 99), тронав термин (стр.27), пропуснат пълен член (стр.45), “пени” – като мн.ч. от “пяна” (Съдържание; стр.13), случайна десетична точка (която прави молекула Tween 20 да тежи колкото един водороден атом! Стр.18).

Общото ми впечатление от дисертационния труд е изцяло благоприятно. Изложението ме убеждава, че **Гергана Радулова** е изследовател с отлична университетска подготовка и много добро равнище на компетентност в областта на физикохимията, повърхностните явления и дисперсните системи. Рецензираният труд показва, че кандидатът притежава задълбочени теоретични знания по специалността. Смятам също така, че трудът е в достатъчна степен лично дело на дисертанта.

В заключение ще подчертая, че представеният ми за рецензиране дисертационен труд съответства напълно на изискванията за получаване на образователната и научна степен “доктор”.

Въз основа на гореизложеното убедено препоръчвам: на **Гергана Милкова Радулова**, редовен докторант в Катедрата по Инженерна химия при Факултет по Химия и Фармация на Софийския университет “Св. Климент Охридски”, да бъде присъдена образователната и научна степен “**доктор**”.

София, 18 март 2016

Рецензент:

(Проф. д.х.н. Емил Д. Манев)