

## **РЕЦЕНЗИЯ**

на Дисертационен труд на тема: „ Изследване на биосинтезата на хидролазани ензими от имобилизирани микромицетни продуценти ”,  
представена за присъждане на образователната и научната степен „Доктор”  
в научна област 5.11. Биотехнологии: Технология на биологично активни вещества

**Докторант: Мария Стефанова Абаева**

**Научен ръководител: доц. д-р Светла Илиева**

**Катедра Биотехнологии, Биологически факултет при СУ „Св. Климент  
Охридски”**

***Рецензент: проф. д-р Светла Петрова***

***Катедра Биохимия, Биологически факултет при СУ „Св. Климент  
Охридски”***

**Актуалност на дисертационната тема.** Дисертационният труд на Мария Абаева е фокусиран върху едно от най-бързоразвиващите се биотехнологични направления - имобилизирането на ензими, клетки и микроорганизми. Високата ефективност и специфичност на биокаталитичните процеси, недостижима с химически катализатори и многообразието от области за практическо приложение на получените продукти, налагат непрекъснато развитие и оптимизиране на: условията и методите за имобилизация, използваните носители, стимулирането на определени ензимни системи или цели метаболитни пътища, методите за изолиране и модифициране на желаните продукти и др. През последните години имобилизирането на живи микроорганизми се превръща в основен биотехнологичен подход за ензимен дизайн, който разширява границите на приложния потенциал на ензимите и предоставя следните предимства: поддържане на висока клетъчна плътност и висока ефективност на биокаталитичните системи включително и мултиензимни системи (без необходимост от тяхното изолиране и пречистване), непрекъснатата регенерация на кофакторите, образуване на вторични метаболити, използване на контактно-зависими клетки или имобилизиране на смесени

култури със синтрофичен растеж или метаболизъм и др. В този смисъл, дисертационният труд е изключително актуален и представя биосинтетичните възможности на имобилизирани култури на различни щамове от род *Rhizopus* и *Aspergillus* като продуценти на липазни, амилазни и ксиланазни ензими.

**Структура и характеристика на дисертационния труд.** Дисертационният труд на Мария Абаева е написан на 151 страници и е структуриран в следните раздели: Литературен обзор (68 стр.); Материали и методи (16 стр.), Резултати (65 стр.); литературна справка от 277 източника (повече от 73 %, от които след 2000г.), а целите и задачите са формулирани на 2 стр. Дисертационният труд е илюстриран с 39 графики, 16 фигури и 10 таблици.

Поставената основна цел на дисертационния труд – „Оптимизиране на технологичните параметри за култивиране на щамове от род *Rhizopus* и *Aspergillus*, продуценти на липаза, амилаза и ксиланаза и изследване на биосинтетичните им възможности като имобилизирани култури в неорганични и орвано-неорганични носители“, налага изпълнението на 4 основни задачи, които са конкретизирани по отношение на оптимизиране на условията на култивиране на определените щамове, методите за имобилизиране и подбора на матриците оптимални за всеки метод.

*Литературният обзор* следва определена, съответстваща на темата, логическа последователност, което прави запознаването с различните щамове и съпоставянето на техните свойства сравнително леко. В първата част са разгледани подробно класификацията, свойствата и методите за определяне на изследваните хидролитични ензими, представен е сравнителен анализ на продуцентите микроорганизми, таксономична и морфологична характеристика, условия и среди на култивиране и оптимизиране, като се подчертават предимствата на избраните родове микромицети за биотехнологично приложение. Мария Абаева е поставила специален акцент на използването на математически модели като изключително важен инструмент при оценката на всяка една стъпка от биопроцесирането – от оптимизацията на хранителните среди, през избора на биореактор, конфигурацията, контрола и дизайна на лабораторната технология, до анализ на техническата и икономическа рентабилност. За всеки от изследваните ензимни комплекси са дадени най-важните съвременни приложения в различни области, което определя смисъла от тяхното изследване и насочва вниманието към целта на дисертационния труд. Втората част на литературния обзор е посветена на методите за имобилизиранена клетки и ензими, видовете носители, техните предимства и недостатъци пряко свързани с целта на изследването. Литературният обзор определено демонстрира

много добрите познания на Мария Абаева за свойствата на микромицетните щамове, които използва като продуценти и за възможността каталитичната активност на определени ензимни комплекси да бъде контролирана и стимулирана, което ги превръща в ефективни клетъчни биокатализатори при имобилизиране. Мария Абаева анализира и обобщава научната информация и представя своето разбиране за научния проблем достатъчно информативно и убедително, дефинира работната хипотеза, целта на работата и произтичащите от нея задачи.

В обособения раздел „*Материали и методи*”, докторантката е представила подробно описание на всички използвани методи: култивиране на различните щамове при дълбочинни условия (с подробен състав на различни варианти хранителни среди и получаване на посевен материал); методи за определяне на изследваните хидролазни ензимни активности – липазна, ксиланазна и  $\alpha$ -амилазна); централен композиционен план за моделиране и оптимизиране на средата за продукция на обща липазна активност; методи за имобилизиране – адсорбционен (неорганични носители и луфа) и включване в различни зол-гелни носители (хибридни матрици); хроматографски методи (анализи на фитохормони и биоактивни вещества); и *in vivo* методи за изследване на влиянието на метаболитната активност на изследваните щамове *Rhizopus* и *Aspergillus* върху физиологичното състояние на соеви семена.

Експерименталните протоколи са описани точно, разбираемо и отразяват всички фактори, които повлияват процеса на имобилизиране и от които зависи достоверността на всеки от експерименталните варианти и повторения.

Основните *Резултати* са представени в 3 части, обособени от трите основни подхода, по които се сравняват биосинтетичните възможности на щамове от родовете *Rhizopus* и *Aspergillus* – свободни, неимобилизирани култури и имобилизирани чрез адсорбция и включване в зол-гелни матрици. Първата част показва резултатите от кинетиката на култивиране при дълбочинни условия и определянето на екстрацелуларните общи ензимни активности - липазна, ксиланазна и  $\alpha$ -амилазна. Целта на тази група изследвания - да се оптимизират условията и състава на средата така, че да се стимулират екстрацелуларните ензимни активности – е постигната чрез създаване и прилагане на математически модел. В резултат на проведените експерименти е установена висока степен на точност и коефициент на корелация от 98.625%. Експериментално определените общи липазна активност на щам *Rhizopus arrhizus* KB-2 (60.72 IU/ml на 72<sup>PH</sup> час от култивирането),  $\alpha$ -амилазна активност на щам *Aspergillus oryzae* PP (3011.28 SKB U/ml на 168<sup>MH</sup> час от

култивирането) и ксиланазна активност на щам *Aspergillus awamori* K-1 (33.83 U/ml, определени на 72<sup>-ри</sup> час) са максимални и близки до изчислените по метода стойности.

За имобилизиране на изследваните щамове-продуценти, Мария Абаева прилага физически методи, чиито предимства е представила аргументирано. Голяма част от работата в това направление е свързана с намиране на най-подходящия носител, създаващ най-биоадаптивни условия за микромицетите при висока степен на адсорбция или включване в матрицата и позволяващ най-ефективна биосинтеза и продукция на екстрацелуларни хидролитични ензими. Експерименталната част включва използването на природен и модифициран с железни и медни йони зеолит, луфа, хибридни матрици с индуктор тетраалкил ортосиликати (TEOS/TMOS), съдържащи различни концентрации на Са-алгинат и полиетилен оксид/гликол, и допълнителното оптимизиране на ферментационните хранителни среди. Основният извод, който се налага, че избраните методи и носители стимулират продукцията и запазването на активността на общите екстрацелуларни амилазна и ксиланазни активности след продължително култивиране - при неорганичните модифицирани носители максимални стойности за  $\alpha$ -амилазна активност са определени на 216<sup>-ти</sup> час от култивирането (за ксиланазна активност на 648<sup>-ми</sup> час), докато при органо-неорганични хибридни матрици максимални стойности са определени на 720<sup>-ти</sup> час, т.е. силно изместване на кинетичната крива на синтез и отделяне на ензимите в средата в сравнение с оптималното време за максимална продукция в свободните култури – 72<sup>-ри</sup>/168<sup>-ми</sup> час. Независимо от по-ниските измерени стойности на общи амилазна и ксиланазна активности (около 35%) в сравнение с тези на неимобилизираните култури, би могло да се каже, резултатите доказват предимствата на този имобилизационен метод за запазване и стабилизиране на ензимната активност и микромицетната култура за по-дълъг период от време, т.е. повлияване на стабилността на ензима. Относно липазната активност на *Rhizopus arrhizus* KB-2, имобилизиран върху модифициран с медни йони зеолит, максимални активности (6x по-високи от контролните на свободни култури) се детектират на 72<sup>-ри</sup>, 96<sup>-ти</sup> и 120<sup>-ти</sup> ч. от култивирането, което докторантката обяснява с добрата адсорбция и активиращ ефект на металните йони върху развитието на щама. Тук ясно се наблюдава положителен ефект на имобилизацията върху активността на липазните ензими до 120<sup>-ти</sup> час от култивирането спрямо свободните. При използването на хибридните матрици се запазва тенденцията за максимална липазна активност на 72<sup>-ри</sup>, 96<sup>-ти</sup> и 120<sup>-ти</sup> час от култивирането, но със значително по-ниски стойности на активността на неимобилизирани култури. Това превръща зеолитите в особено подходящи носители за биосинтеза на екстрацелуларна липазна активност.

Експериментите по оптимизиране на условията за имобилизиране в хибридни матрици (варианти с 5% неорг. прекурсор TEOS, 10% Са-алгинат и индуктор царевичак) на *Aspergillus awamori* K-1 (ксиланазни ензими) и *Aspergillus oryzae* PP (амилазна активност) водят до запазване на изследваните активности до 744<sup>ри</sup> час от култивирането и достигане на максимални стойности, близки до тези на неимобилизираните култури. Първоначалните изследвания върху способността на изследваните щамове да продуцират растежни хормони и биоактивни вещества като вторични метаболити, повлияващи физиологичните процеси в растения са обещаващи и трябва да се задълбочат. Мария Абаева анализира получените експерименталните данни в същия раздел и не е представила отделен раздел „Дискусия“, но е представила „Заключение, в което обобщава получените резултати чрез сравнителен анализ (таблица), който показва кои от използваните методи на имобилизиране и носители са по-добри за *Rhizopus* или *Aspergillus*. Това първоначалното изследване е ценно и е абсолютно необходимо като методология, която може да се следва при други носители и открива различни изследователски възможности.

Изводите отговарят напълно на направените изследвания, но биха могли да бъдат структурирани по-добре, за да се акцентира върху приносния характер на всеки използван метод и носител за имобилизиране.

**Публикации, свързани с дисертационния труд.** В дисертационния труд са включени резултати от 3 научни публикации в списания с IF (BBE<sub>q</sub> и VJAS), 3 публикации от участия в международни конференции в непълен текст и 3 публикации от участия в български конференции в пълен текст. Изследванията в дисертационния труд са предмет на 2 проекта, подкрепени финансово от Фонд научни изследвания към МОН и СУ“Св. Кл. Охридски“.

**Препоръки.** В дисертационния труд са допуснати някои пропуски, които биха могли да се избегнат, като: грешки във форматирането; съдържанието на дисертационния труд би могло да се представи по-детайлно и да отразява точно всяко тематично разделение, особено в частта „Резултати“; целта на дисертационния труд е дефинирана като „Оптимизиране на технологичните параметри за култивиране на щамове от род *Rhizopus* и *Aspergillus*, продуценти на липаза, амилаза и ксиланаза и изследване на биосинтетичните им възможности...“, но по-точно и научно би било да се дефинира като „...продуценти на екстрацелуларни липазни, амилазни и ксиланазни ензимни комплекси и изследване на биосинтетичните им възможности/ или „... продуценти на екстрацелуларни хидролитични ензими - липази, амилази и ксиланази и изследване на биосинтетичните им възможности“, защото не се синтезира само една единствена определена липаза (амилаза или ксиланаза,

съответно), а различни изоформи (стр.7 – увод); и др. Бих поставила въпроси относно: 1) определянето на екстрацелуларните протеиназни активности в хода на култивирането, което е маркер за стабилността на екстрацелуларните белтъци; 2) в табл. 10 са представени синтезираните вторични метаболити, открити в средата на изследваните шамове – тъй като има големи концентрационни разлики при различните шамове, може ли да се направи извод дали имобилизирането на микромицетите може да си използва като метод за синтез на тези метаболити – напр., гибералинова киселина, флурпримидол, зеатин, тидиазурон при *Rhizopus arrizus* KB-2; или гиберилин А4 при *Aspergillus aryzae* PP. 3) Бих препоръчала да се направи анализ на влиянието на метални йони върху ензимните активности (Са, Си, Fe), след като се работи с модифицирани носители, за да се разграничи ефекта им върху: екстрацелуларните ензимни активности (амилазата и липазата са Са-активируеми, напр.); върху метода на имобилизиране; растежа на микромицетите; и биосинтезата на ензими.

**Заклучение.** Смятам, че дисертационният труд на Мария Абаева е перспективно научно изследване, със стойностни приноси, които потвърждават значимостта на използвания метод за имобилизиране на микромицетни продуценти и необходимостта от практическото му приложение в търсене на начини за повишаване на ефективността на биокаталитичните им способности.

Мария Абаева се представя като подготвен в теоретично и практическо отношение млад биотехнолог и смятам, че получените резултати определят няколко насоки за продължаване и задълбочаване на изследванията по имобилизирането на цели клетки и микроорганизми, което е принос към развитието на това направление в Катедрата по Биотехнология. Дисертационният труд и научните публикации по темата отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав, Правилника за неговото приложение и препоръките на Биологическия факултет при СУ, което ми дава основание да заявя моето положително мнение и убедено да гласувам за присъждането на образователната и научната степен „Доктор” в научна област 5.11. Биотехнологии: Технология на биологично активни вещества.

06.02. 2015г.

Автор:

проф. д-р Светла Петрова