

До Председателя на научното жури
(Определено със заповед № РД 38-131/
05. 03. 2020 на ректора на СУ „Св.
Климент Охридски” София)

РЕЦЕНЗИЯ

относно дисертационен труд за придобиване на научната и образователна
степен “доктор” по професионално направление 4.3 „Биологически науки“,

Научна специалност “Биофизика”, шифър 01.06.08

Автор на дисертационния труд: Бояна Димитрова Ангелова,

Тема на дисертационния труд: “Електроиндуцирано освобождаване на
биологично активни вещества от дрожди чрез проточно третиране с
импулно електрично поле”, научен ръководител: доц. Валентина Ганева

Рецензент: проф. дбн, Яна Христова Цонева, Институт по биофизика и
биомедицинско инженерство – БАН

Бояна Ангелова е завършила Софийски университет „Св. Климент Охридски“, София, Биологически факултет, магистърска степен по специалността Биофизика. Зачислена е за редовна докторантка към катедра „Биофизика и радиобиология“ от 10. 01. 2013-10. 01. 2016, след което докторантурата е трансформирана в задочна форма на обучение. По процедурата Ангелова е представила всички необходими документи в съответствие с Правилника за приложението на ЗРАСРБ за откриване на процедура по защитата.

Описание на дисертационния труд: Представеният дисертационен труд е написан на 141 страници, 48 фигури, 3 таблици, 2 схеми и е структуриран по

стандартния начин, състоящ се от разделите: Увод , I. Литературен обзор, II. Цел и задачи, III. Материали и методи, IV. Резултати и дискусия, V. Изводи, VI. Приноси, VII. Участия в конференции, VIII. Публикации по дисертацията и IX. Литературна справка, включваща 206 литературни източника.

Актуалност на тематиката: Разработване на методика за ефективна екстракция на биологично активни вещества от дрожди чрез необратима електропорация, която е биофизичен метод и има редица предимства пред конвенционалните методи. Електропермеабилзацията е неувреждаща термонестабилните молекули, дава висок добив, липсва разкъсване на третираните микроорганизми, улеснено е пречистването на отделените биологично активни молекули и други.

Литературният обзор е подходящо систематизиран, балансиран и представлява добър научен преглед на съвременните литературни данни, свързани с тематиката на докторантурата. Представеният обзор е онагледен с 3 фигури, цитирани са актуални и съвременни литературни източници, някои от които от 2019 г. Всичко това показва, че докторантката има добра теоретична подготовка. Литературният обзор е написан във връзка с целите на проведените изследвания.

Цел и задачи: Целите и задачите са ясно формулирани, свързани с екстракция на макромолекули и нискомолекулни съединения от вътреклетъчното съдържание на различни видове дрожди при проточно високоволтово импулсно електрично въздействие. Те са оформени в 4 конкретни задачи, отговарящи на целите: изследване на тотален белтък, селективна екстракция на супероксид дисмутаза, аминокиселини, антиоксиданти и витамини, както и на екстракцията на разтворими и нативни белтъци при комбинация на електрично поле и последваща инкубация с литичен ензим.

Материали и методи: Използваните в дисертационния труд методи са адекватни на поставените цели и задачи. В дисертацията подробно са описани методиките относно определянето на витамини като пиридоксин и ниацин, антиоксидантна

активност, пуринови нуклеотиди, супероксид дисмутаза и литиказен тест. Данните са статически обработени при голям брой (от 3 до 7) повторения на всеки един вид изследване.

Резултатите и дискусията са дадени в една глава. Получените резултати са представени на 31 цветни графики в дисертацията, което улеснява четенето. Оптимизирани са електричните параметри за различните цели на изследването - интензитет, брой и продължителност на монополярните правоъгълни импулси. Използвани са също камери за поточно електротретиране с различни размери. Тъй като различните видове дрожди имат различия в порьозитета на клетъчната стена се е наложило вариране на параметрите на импулсите, което е доста трудоемко и време консумиращо. Добавянето на тиолово съединение (дитиотреитол), което разкъсва дисулфидните мостове между манобелтъците, изграждащи външния слой на клетъчната стена, улеснява екстракцията на макромолекули – фиг. 9, 13, 14 и 15. Допълнително са проведени изследвания в присъствието на ензима зимолиаза или литиказа (литичен тест). Литичните ензими водят до получаване на протопласти от дрожди или до „разхлабване” на порьозитета на клетъчната стена. Това третиране може да доведе обаче и до лизис на някои видове дрожди – фиг. 19.

Спорен е въпроса относно взаимовръзката на електричното поле и високата концентрация на клетките, тъй като са възможни допълнителни електро явления като електродеформация, диелектрофореза или електроориентация. Тук авторите установяват, че повишената екстракция на белтъци при по-голяма дрождева концентрация (в подходящ диапазон до 85 g DW/ml) се дължи на снижаване на енергията, която е изразходвана за индуциране на необратима електропермеабилзация.

Проведени са подробни оптимизационни експериментални изследвания относно екстракцията на важни ензими, приложими в медицината и хранително-вкусовата промишленост като супероксид дисмутаза в присъствие на осмотичен стабилизатор глицерол – фиг. 25.

Тъй като необратимата електропоруция при дрожди като цяло не води до лизис на клетките, тя би могла да се използва за екстракция с висока концентрация на доста

ценни нискомолекулни вещества като аминокиселини, антиоксиданти и витамини от В група като пиридоксин и ниацин – фиг. 29-42.

Намерени са по-меки и щадящи условия на екстракция на рекомбинантни белтъци чрез електротретиране и последваща инкубация с литичен ензим. Тези експерименти са проведени със съвременен моделирани щамове: **S. serevisie** щам **W303-1A [pBIVU02-1]**, който експресира **LYTAG-B-галактозидаза** от *E. Coli* и **H. polymorpha pEE.5-1/RB11#2-1**, експресиращ тежката верига на феритина – фиг. 43-48. Електротретирането и последващата инкубация с литиказа имат синергичен ефект при освобождаването на рекомбинантни белтъци.

Изводи: Приемам направените 10 извода, както са формулирани. Те са добре обосновани от експерименталните данни. Професионално са интерпретирани.

Приноси: Приемам справката за направените приноси и начина на тяхното обобщено представяне. Приноси 1- 4 се отнасят към област получаване и доказване на нови за науката факти. Направени са два научно-приложни приноса, свързани с разработка на метод и протокол. Приложните приноси биха могли да намерят реализация в медицината и хранително-вкусовата промишленост.

Участие в конференции: Докторантката е участвала в постери с материали от дисертацията в 6 научни мероприятия.

Публикации по дисертацията: Част от материалите, включени в дисертацията, са публикувани в 2 статии в списания с импакт фактор: Applied Biochemistry Biootechnology, 2018, 184, 1286-1307, IF-2.14, Q2 и Journal of Biotechnology, 2015, 211, 12-19, IF 3.163, Q1. Резултатите от изследванията са намерили добър отзвук в литературата. Общо забелязаните цитирания са 7.

Познавам докторантката и работа ѝ през годините и приемам, че по-голямата част от резултатите са неин личен принос.

Авторефератът съответства по съдържание на дисертацията.

При оформянето на дисертацията могат да бъдат направени малко забележки, макар че не липсват в литературния обзор някои печатни грешки, които биха могли да се избегнат. Терминът „интрацелуларни” би могъл да се замени с думата вътреклетъчни. Тези дребни неточности в никакъв случай не развалят доброто ми общо впечатление от стила на докторантката при оформяне на дисертацията и автореферата.

Заключение:

Смятам, че дисертационният труд е обемно и коректно изследване, в голяма степен лично дело на докторанта, което заслужава безспорно положителна оценка. Дисертационният труд по актуалност на изследванията, количеството и качеството на проведените експерименти, броя на публикациите и на цитиранията по темата на дисертацията и значимостта на приносите, напълно отговаря на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за приложението му, както и на препоръките на академична колегия в Биологическия факултет. Всичко това ми дава основание убедено да препоръчам на членовете на уважаемото Научно жури да присъдят на Бояна Димитрова Ангелова образователната и научна степен „доктор” по професионална направление 4.3. „Биологически науки”, научна специалност 01.06.08 „Биофизика”.

Дата: 29. 03. 2020

Подпис:

Проф. Яна Цонева