

РЕЦЕНЗИЯ

На дисертационния труд на тема:
**„ЕЛЕКТРОИНДУЦИРАНО ОСВОБОЖДАВАНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ
ВЕЩЕСТВА ОТ ДРОЖДИ ЧРЕЗ ПРОТОЧНО ТРЕТИРАНЕ С ИМПУЛСНО
ЕЛЕКТРИЧНО ПОЛЕ“**

по конкурс: за присъждане на ОНС „Доктор“
на задочен докторант *Бояна Димитрова Ангелова*,
с научен ръководител: доц. Валентина Ганева
по научно направление **4.3. Биологични науки (специалност Биофизика)**

РЕЦЕНЗЕНТ: доц. д-р Светла Трифонова Данова, дбн
Департамент по Обща микробиология,
Институт по микробиология „*Стефан Ангелов*“ - БАН

ОТНОСНО ПРОЦЕДУРАТА:

На основание Решение на Факултетния съвет на Биологически факултет (*Протокол № 5/25.02.2020 г.*) и Заповед (*№ РД 58-131/05.03.2020 г.*) на Ректора на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ съм избран за член на Научно жури по горепосочения конкурс. На първото заседание на Научното жури съм определена за рецензент.

Декларирам, че не съществува конфликт на интереси между мен и кандидата в конкурса за ОНС „Доктор“.

ДАНИ ЗА КАНДИДАТА:

Бояна Ангелова, от 2016 г. и понастоящем е асистент в катедра Биофизика и Радиобиология на Биологически факултет при СУ „Св. Климент Охридски“. Завършила е III ПМГ „Акад. Д. Попов“ в гр. Варна, (профил Биология). Висшето образование е в тематичното направление на конкурса, а именно: Бакалавър по Молекулярна биология (през 2011 г.) и Магистър: Молекулярна биология - Биофизика (2012 г.). И двете образователни степени в Биологически факултет на СУ са защитени с отлични дипломи. Това показва ранна ориентация на кандидата към научната област на разработвания дисертационен труд и подчертан интерес в областта на Биофизиката и радиобиологията.

ОЦЕНКА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД:

1. **Актуалност и значимост на разработвания проблем**

Съвременното развитие на биотехнологиите поставя сериозни предизвикателства пред учените. Търсят се нови чисти и ефективни технологии за производство на биологично активни вещества, при използването на микроорганизми и други биологични ресурси. В унисон с налагащите се зелени технологии и опазване на околната среда е стремежът за по-ефективна преработка и утилизация на отпадни продукти от хранително - вкусовата промишленост и биотехнологичните производства. Разработеният дисертационен труд е пряко свързан с тези две актуални тенденции и търсенето на научно - обосновани решения на актуалните биотехнологични проблеми. Докторантката търси нови подходи за ефективно получаване на различни екстракти, без допълнителни химични замърсители, при това от доказали значението си микроорганизми, каквито са дрождите. Специално внимание е отделено на отпадните дрожди от конкретни биотехнологични производства. Всичко това ми дава основание да оценя работата като актуална и значима.

2. Обем и структура на дисертацията

Дисертацията е изложена на 141 стандартни страници двустранен текст, което включва и списъците на публикациите по дисертацията с участията в научни форуми. Спазена е общоприетата схема и препоръчителни съотношения между отделните части на труда, както следва: *Увод* – 2 стр., *Литературен обзор* - 33 стр., *Цел и задачи* – 2 стр., *Материали и методи* – 15 стр., *Резултати и обсъждане* – 55 стр., *Изводи* – 5 стр., *Приноси* - 2 стр.; *Използвана литература* – 12 стр. Отлично впечатление прави стегнатият научен стил, използван при написването на дисертационния труд.

В литературния обзор са представени 3 фигури, в подкрепа на научната информация по разработвания проблем. Получените резултати са илюстрирани с 44 цветни фигури и 3 таблици. Много добре е илюстриран и подреден е разделът *Материали и методи*. Бих искала да препоръчам обаозначението на таблиците да се различава от това на фигурите, а именно надписите им да са над тях.

3. Литературна осведоменост и постановка на целта и задачите

Литературният обзор е конкретен, структуриран е правилно, следвайки логическата обвързаност на информацията, като условно може да бъде разделен на 3 части:

Първият раздел разглежда различни аспекти от биологията на дрожди и тяхните субклетъчни структури, които имат отношение към разработвания нов подход на третиране на микробните клетки.

Вторият раздел представя обобщена информация за значението на дрождите за модерните биотехнологични производства и хранително-вкусовата промишленост. Докторантката познава тяхното значение за молекулярно - биологичните изследвания и коментира тяхното приложение като гостоприемник за експресия на различни гени.

Третият раздел е най-обемен и в логическа последователност разглежда методите за освобождаване на вътреклетъчни продукти от дрожди. Стегнато са представени механичните и различни немеханични методи, като най-подробно е разгледана електропорацията и възможностите на този подход при дрожди. Прави отлично впечатление критичния анализ на съществуващите подходи, използвани както за целите на научните изследвания, така и в производствени условия. Така докторантката успява закономерно да очертае необходимостта от разработка на нов метод, който да съчетава желаните параметри и да изключва нежелано използване на химически агенти или скъпо струващи ензими. Анализирайки достиженията по проблема е очертана необходимостта те да се доразвият. Така се достига до формулирането на целта на дисертационния труд, а именно:

„Да се изследва възможността за използване на проточно третиране с импулсно електрично поле, като алтернативен метод за екстракция на интрацелуларни биологично активни вещества (макромолекули и нискомолекулни съединения) от дрожди“.

За постигането на тази цел са поставени 4 ясно формулирани задачи, една от които с две подзадачи. Ключова роля има първата задача, методично правилно поставена за изпълнение при дрожди от два различни рода – род *Saccharomyces* и род *Kluyveromyces*:
1. Изследване електроиндуцираното освобождаването на тотален белтък от бирени дрожди, пресовани хлебни дрожди *S. cerevisiae*, дрожди от род *Kluyveromyces*:

- повишаване на ефикасността и скоростта на екстракция чрез оптимизиране на електричните параметри и условията на инкубация на третираните клетки;
- изследване влиянието на клетъчната концентрация и специфичната електропроводимост върху ефикасността на електрично третиране.

Въз основа на успешното изпълнение на първата задача (с подзадачите) докторантката планира да надгради търсенията, изследвайки възможностите за

получаване на важни ензими, аминокиселини, антиоксиданти и витамини. Оригинални елементи на разработката са заложените в последващите задачи експерименти:

2. Изследване на възможността за селективна екстракция на ензим (супероксид дисмутаза) от електропермеабилни дрожди *K. marxianus*.

3. Изследване освобождаването на разтворими биологично активни съединения от дрожди (аминокиселини, антиоксиданти, витамини) с цел разработване на метод за получаване на екстракти, подходящи за използване във фармацевтичната, козметична и хранително-вкусова индустрия.

4. Изследване на електроиндуцирана екстракция на разтворими рекомбинантни и нативни белтъци от дрожди *S. cerevisiae* и *H. polymorpha* чрез комбинирано третиране – проточно третиране с импулсно електрично поле и последваща инкубация с литичен ензим.

Т.е. методът, който разработва Бояна Ангелова, обхваща не само основни компоненти/активни метаболити на дрождевата клетка, но и рекомбинантни белтъци, чието получаване в чист вид е все по-широко търсено в модерните биотехнологични и фармацевтични производства. Следователно и на ниво задачи дисертационният труд доказва едно целево структуриране и насоченост строго върху разработвания проблем. Това личи добре в целия труд. Обобщени са литературни данни от един широк времеви интервал от 1976 до 2019 г. Литературният списък включва 206 заглавия, само на английски език. Литературата (както в обзора, така и в целия труд) е тясно свързана с дисертационната тема. Това доказва отлична теоретична осведоменост на докторантката, което е предпоставка за правилен подбор на методичните подходи и за последваща успешна разработка.

4. Оценка на използваните материали и методи

Използваният набор от методи е съвременен и адекватен за реализацията на дисертационния труд. Избрани са хлебни и бирени дрожди, представители от различни видове – *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*. Щамовете са обозначени правилно и са проследими до международно признат депозитариум.

Материалите и методите са описани точно и подробно, като изцяло покриват етапите на работата от подбора на обектите на изследване, през параметрите на тяхното

третиране и експерименталната постановка до методите за доказване и охарактеризиране на получените метаболити/активни вещества. Докторантката е усвоила и приложила 10 различни методи за доказване получаването на важни биологично активни продукти/ензими: Определяне на необратима пермеабилзация; Определяне на сухо тегло; Определяне на тотален белтък; Определяне на аминокиселини; Определяне на витамини- пиридоксин и ниацин; Определяне на тотална антиоксидантна активност; Определяне съдържание на глутатион; Определяне съдържание на пуринови нуклеотиди; Определяне активност на супероксид дисмутаза; Литиказен тест.

Докторантката посочва детайлно експериментално оптимизираните параметри при осъществяване на: (1) *Подготовка на клетките за електропорация* и (2) *Третиране с електрично поле. вкл. механична дезинтеграция на клетки*, което е важно с оглед на избора от тях обект –дрожди. Повечето данни към днешна дата са с микроводорасли и затова оценявам усилията на екипът да създаде работещ и възпроизводим протокол за третиране на дрожди в електрично поле.

Всички това ми позволява да дам висока ценка за отличната теоретична и методична подготовка на докторантката, която успява правилно да съчетае многообразие от класически и съвременни методи за целите на дисертацията за да реши поставените експериментални задачи.

5. Оценка на получените резултати

Извършена е значителна по обем и разнообразна експериментална работа в рамките на интердисциплинарно молекулярно-биологично и биофизично изследване на индустриално значими микроорганизми, вкл. и в качеството им на отпаден, но пълноценен продукт и като гостоприемници за получаване на рекомбинантни белтъци. Резултатите са представени стегнато и са илюстрирани с 41 цветни фигури. Докторантката следва добре структурирана и методично обезпечена експериментална схема от анализи, започвайки с разработката на ключовия за успеха на дисертацията метод за *Електроиндуцирано освобождаване на тотален белтък от дрожди*. Обосновано, Б. Ангелова е отделила внимание на важните за процеса параметри като: (1) *Условията на електрично третиране* и (2) *Влиянието на рН на инкубационния буфер*. При всеки един от обектите дрожди (пивни, хлебни, пресовани или след преработка) параметрите на процеса са оптимизирани. Поради ниския добив на белтък от пресовани хлебни дрожди допълнително е оптимизирана инкубационната среда и е оценен ефектът

на добавено тиолово съединение (ДТТ), в комбинация с различни температурни режими на третиране.

Високо оценявам стратегията на докторантката да приложи и оптимизира метода за електроиндуцирано освобождаване на биологично активни вещества, използвайки като модел различни видове дрожди. Така тя доказва по-добър добив на белтък за по-кратко време, при представители на род *Kluyveromyces*. За всеки биотехнологичен процес факторът време е много важен. Не на последно място подобаващо значение е отделено и на два други фактора на процеса - клетъчната концентрация и специфичната електропроводимост на суспензията преди и по време на електрично третиране. Част от получените данни са оригинални, което за мен е съществен методичен принос на работата, а другите са коментирани в светлината на публикувани в международни издания.

Получените резултати са анализирани задълбочено, видно от направеното обобщение, в края на подраздела представящ изпълнението на тази задача. Това е основата гарантираща успешното изпълнение на следващите задачи.

При оптималните за конкретните дрожди условия Б. Ангелова доказва успешно електроиндуцирано освобождаване на ензим супероксид дисмутаза от щам *K. marxianus*, без да има съществено влияние рН на инкубационния буфер. Отчетена обаче е ролята на добавен към буфера глицерол за запазване активността на ензима.

Много интересна и добре структурирана е експерименталната част по електроиндуцирана екстракция на нискомолекулни биологично активни вещества, направено последователно първо с бирени, а после и с хлебни дрожди. В нея отново са комбинирани различни методични подходи за постигане на оптимални параметри на проточно третиране на клетъчна суспензия с импулсно електрично поле и варианти за обработка на клетъчна маса за единица време, което показва способността на докторантката да комбинира методите за получаване на най-добрите резултати, а именно:

- При изследванията по „*Освобождаване на аминокиселини*“ вследствие на оптимизация е постигнат резултат близък до най-новите достижения за момента с бирени дрожди. Но докторантката използва отпаден продукт на пивопроизводство, което има приложно значение. В методичен аспект акцентът е поставен върху сравнение на оптималните електрични условия за освобождаването на аминокиселини от хлебни и от бирени дрожди. Б. Ангелова правилно коментира наблюдаваните различия в оптималния интензитет на полето за освобождаването на аминокиселини от бирени и хлебни дрожди.

- При изследванията за „Освобождаване на витамини (пиродоксин и ниацин) от бирени дрожди“ е получен също висок добив и е оценен метода като мек и подходящ за получаване и на други нискомолекулни витамини от група В.

- Интересна е постановката по „Оценка на електроиндуцирано освобождение на тотална антиоксидантна активност и глутатион“ при бирени и при хлебни дрожди. Коментирани са приликите и разликите.

- С практическо и методично значение са експериментите по „Определяне на пуринови нуклеотиди в супернатанти, получени от електропермеабилizирани бирени дрожди и от пресовани хлебни дрожди“. Докторантката правилно анализира получените резултати за ниско съдържание на пурины, при избраните като оптимални условия на електрично третиране и пост-импулсна инкубация на бирени дрожди. Това е важен резултат поради факта, че дава възможност за получаване на ценни продукти свободни от пуринови нуклеотиди, които са нежелани и се отстраняват трудно със утвърдените към днешна дата химически подходи. Не мога да не отбележа обаче, отсъствието на дискусия спрямо наличните данни в литературата. Оценявам иновативността на изследването, но е добре този и други оригинални резултати да бъдат обсъдени в светлината на публикуваните резултати на други екипи. За да се подчертае значимостта на получения резултат, може да се посочи проблема с тяхната очистка при другите методични подходи за мембранна пермеабилзация на клетките и за получаване на биологично активни вещества от дрожди.

Докторантката успешно обобщава получените резултати по всяка от поставените конкретни задачи. Много добро впечатление прави критичния анализ, с който завършва всеки подраздел. В същото време Б. Ангелова е пестелива в подчертаване достойнствата на проведените изследвания, а работата има безспорно оригинални елементи и резултати. Това с право може да бъде отбелязано и за последната част от дисертационния труд по изследване ефекта на електричното третиране върху проницаемостта на клетъчната стена при рекомбинантни дрожди и по освобождение на белтъци чрез комбинирано третиране – електропермеабилзация и последваща инкубация с литичен ензим. Докторантката си поставя трудната задача да реши проблем с освобожданието на високомолекулен ензим от клетките на рекомбинантен щам *S. cerevisiae* W303-1A [pBIVU02-1], експресиращ *E. coli* LYTAG- β -галактозидаза (520 кДа). За постигането на високи добиви от желания ензим тя изпитва комбиниран протокол, съчетаващ оптималните условията за третиране с променливо електрично поле и последваща ензимна пермеабилзация с литиказа. Този нов подход за получаване на рекомбинантни

белтъци е проверен и на модел метилотрофни дрожди, които в последните години са сред най-предпочитаните в индустриалното производство на рекомбинантни молекули. Докторантката изследва *Hansenula polymorpha* щам pEE.5-1/RB11#2-1, експресиращ тежката верига на човешки феритин, формираща интрацелуларни комплекси с молекулна маса 480 kDa. Изпълнението на тази експериментална задача е своеобразно доказателство за иновативността на разработения дисертационен труд. Иска ми се да вярвам, че това е в основата на липсващата дискусия, на тези безспорно интересни и с практическа насоченост резултати. Това е и основната ми критика към докторантката. Бих искала да препоръчам по-смело да коментира как получените резултати се отнасят към научните новости. Едно заключително обобщение би било полезно за да подчертае тяхната значимост. В тази връзка искам да задам един въпрос:

„Може ли на базата на получените резултати да се разработи протокол за третиране на дрождени клетки/включително отпадни продукти от биотехнологични производства, който да се предложи за получаване на биологично-активни вещества в индустриални условия и мащаби?“

6. Оценка на направените изводи, приноси и наукометричните показатели съгласно изискванията на ЗРАСРБ

В труда на Бояна Ангелова са получени важни резултати, с научно и приложно значение. Те са представени в логическа последователност, доказвайки изпълнението на всички поставени задачи в съответствие с целта на дисертацията. Направените 10 извода и 6 приноса са логично следствие от цялата разработка и дават обективна информация за стойността на проведените експерименти. Приносите са обективно разделени на Научни приноси- 4 броя и Научно-приложни – 2 броя. Очертават се оригинални научни и приложни приноси.

Резултатите от дисертационния труд са представени на 6 научни форума от които 3 у нас и 3 в чужбина и са публикувани в 2 журнални статии, в списания с висок ИФ.

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен. Темата е актуална, докторантката е усвоила съвременни методи, експериментите са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки.

Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензираният дисертационен труд представлява оригинална научна разработка, с теоретично и приложно значение. Той отговаря на всички условия на Закона за развитие на

академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на СУ “Св. Климент Охридски“.

Всичко това ми дава основание за цялостна висока оценка на дисертационния труд, въз основа на която предлагам на уважаваното научно жури да присъди **образователната и научна степен „ДОКТОР“ на Бояна Димитрова Ангелова**, по Професионално направление 4.3. Биологични науки (специалност Биофизика).

Гр. София

18.05.2020 г.

Рецензент:.....

(доц. Светла Данова, дбн)