

## СТАНОВИЩЕ

**Относно:** дисертационен труд за придобиване на научната и образователна степен „Доктор“ по професионално направление 4.3 „Биологически науки“ (Биофизика), представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед №РД-38-131/05.03.2020г. на Ректора на Софийски университет „Св. Кл. Охридски“

**Автор на дисертационния труд:** Бояна Димитрова Ангелова

**Тема на дисертационния труд:** „Електроиндуцирано освобождаване на биологично активни вещества от дрожди чрез проточно третиране с импулсно електрично поле“

от доц. д-р **Валентина Йорданова Ганева**, СУ „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, катедра Биофизика и радиобиология, ръководител на докторанта

Дрождите са индустриални микроорганизми използвани широко за производство на редица биологично активни вещества, повечето от които с интрацелуларна локализация – витамини, антиоксиданти, ензими, нуклеинови киселини, белтъци и др. Понастоящем дрождите (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *H. polymorpha*) са и една от най-използваните системи за производство на рекомбинантни белтъци с разнообразни приложения. Основен метод за извличане на интрацелуларни компоненти от дрожди в биотехнологичната практика е механичната дезинтеграция (хомогенизиране при високо налягане). Независимо от своята висока ефикасност, този метод води до неселективно освобождаване на интрацелуларно съдържимо, получените лизати се характеризират със значителна фрагментация на клетъчните компоненти и повишен вискозитет, което затруднява процеса на пречистване.

Това прави актуално разработването и внедряването в биотехнологичната практика на нови, алтернативни методи за извличане на интрацелуларни биопродукти от дрожди, които биха позволили по-висока селективност на освобождаване при запазване на ефикасността, характерна за механичната дезинтеграция.

През последните години се натрупаха редица данни, показващи приложимостта на проточното третиране с импулсно електрично поле като алтернативен метод, за екстракция на интрацелуларни биологично активни компоненти от микроорганизми и растителни тъкани. Електроиндуцираното освобождаване се дължи на мембранна пермеабилзация (електропермеабилзация/електропорация) и като правило не е съпроводено от разрушаване на клетъчната стена. Третирането с импулсно електрично поле при използване на проточна система е техника, която е напълно приложима за обработка на значителни количества биомаса, поради което този нов метод има потенциала да се развие и внедри в биотехнологичната практика.

Основната цел на дисертационния труд на докторанта Бояна Ангелова бе 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.

Докторската дисертация на Бояна Ангелова е написана на 141 страници и включва главите: Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Изводи, Приноси, Научни публикации по темата на дисертационния труд.

В литературния обзор докторантът Бояна Ангелова е направила задълбочен анализ на литературата, отнасяща се до използването на дрожди като източник на биологично активни вещества, особеностите и приложенията на импулсното електрично поле в биотехнологичната практика, съществуващите данни за действие на импулсно електрично поле върху дрожди.

За да се получи една цялостна картина за възможностите, които дава този метод, са проведени експерименти с 8 различни дрождеви системи, от които два рекомбинантни щама – *S. cerevisiae* и *H. polymorpha*.

Проследен е ефектът на клетъчната концентрация и специфичната електропроводимост на средата по време на прилагане на електрични импулси.

Изследвано е влиянието на условията, при които се инкубират пермеабилзираните клетки, върху ефикасността на екстракция на тотален белтък и ензими от бирени, хлебни дрожди и дрожди от род *Kluyveromyces*.

На базата на получените данни относно ефекта на рН върху ефикасността на освобождаване на тотален белтък е разработен и протокол за селективна екстракция на ензима супероксид дисмутаза от електропермеабилзирани дрожди *K. marxianus*.

Изследвано е освобождаването на редица нискомолекулни биологично активни съединения – аминокиселини, витамини, антиоксиданти, от бирени и хлебни дрожди.

Проследен е ефектът на електрично поле върху клетъчната стена на рекомбинантни дрожди.

Резултатите от проведените изследвания са представени на 48 фигури и 3 таблици.

Получените данни показват, че оптимизиране на електричните условия за пермеабилзация при използване на различни дрождеви системи и различни клетъчни концентрации, може да се прави сравнително лесно при вариране само на един електричен параметър – интензитета на електричното поле. Показана е възможността за ефикасно третиране на гъсти клетъчни суспензии при сравнително висок (150 мл/мин) дебит.

За първи път е показано:

- Възможност за ефикасна и бърза екстракция на антиоксиданти от бирени и хлебни дрожди и получаване на водни екстракти с ниско съдържание на пуринови нуклеотиди
- Влиянието на рН на инкубационната среда върху ефикасността на освобождаване на тотален белтък от дрожди (бирени, пресовани хлебни, *Kluyveromyces*)

- Възможност за селективно изолиране на макромолекули или нискомолекулни вещества в зависимост от средата, в която се инкубират пермеабилзираните клетки
- Увеличаване чувствителността на третираните с електрично поле клетки от рекомбинантни щамове дрожди към литичен ензим. Показана е възможността за освобождаване на рекомбинантни белтъци от дрожди чрез комбинация на електрично и ензимно третиране.

Потвърдени са данни, получени при експерименти с микроводорасли, съгласно които увеличаване на клетъчната концентрация на третирана суспензия е съпроводено от намаляване на електричната енергия, необходима за индуциране на мембранна пермеабилзация.

Част от данните, представени в дисертационния труд, са публикувани в две списания с IF 3.16 и 2.14 респективно. Резултатите от тези изследвания са представени на наши и международни научни форуми.

### **Заклучение:**

Представеният дисертационен труд е посветен на актуална област от науката и е изпълнен на високо методично и теоретично ниво.

По време на работата върху дисертационния труд Бояна Ангелова вложи много усилия и ентузиазъм за усвояване на редица методи – биофизични, микробиологични, биохимични. Тя се научи да планира и провежда експериментална работа, да обработва и анализира получените резултати.

Убедена съм, че въз основа на опита, натрупан при осъществяването на този дисертационен труд, Бояна се изгради като учен със знания и умения в областта на Биофизиката и с подчертан интерес към редица други области на Биологията. Всичко това ми дава основание да подкрепя предложението да ѝ бъде присъдена научната и образователна степен „доктор“.

26.05.2020г.  
София

Член на научно жури:

доц. д-р Валентина Ганева  
катедра Биофизика и радиобиология  
при БФ на СУ“Св. Кл. Охридски“