

РЕЦЕНЗИЯ

от доц.д-р Соня Костадинова Трифонова
катедра „Биохимия и микробиология“
Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'
в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика
професионално направление 4.3. Биологически науки
докторска програма Микробиология

Автор: Айше Сейхан Селим

Тема: „Оптимизиране ензимния синтез на олигозахариди с гликозилтрансферази от *Leuconostoc mesenteroides*”

Научен ръководител: проф.д-р Илия Николов Илиев – ПУ „Паисий Хилендарски“

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-3750 от 21.07.2017 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема „Оптимизиране ензимния синтез на олигозахариди с гликозилтрансферази от *Leuconostoc mesenteroides*” за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Микробиология.

Автор на дисертационния труд е Айше Сейхан Селим – редовен докторант в катедра „Биохимия и микробиология“ с научен ръководител проф.д-р Илия Илиев от ПУ „Паисий Хилендарски“.

Представеният от Айше Селим комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

1. Молба до Ректора на ПУ за разкриване на процедурата;
2. Автобиография в европейски формат;
3. Нотариално заверено копие от диплома за висше образование - ОКС „бакалавър“;

4. Нотариално заверено копие от диплома за висше образование - ОКС „магистър“;
5. Декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
6. Протокол от катедрен съвет (№149 от 22.02.2017 г.) за готовността на кандидата за предварително обсъждане;
7. Заповед на Ректора Р-33-2842/03.07.2017 за разширяване на състава на катедрения съвет на катедра „Биохимия и микробиология“
8. Протокол от катедрен съвет (№ 152 от 07.07.2017 г.) от предварителното обсъждане на дисертационния труд;
9. Справка за спазване на специфичните изисквания на съответния факултет;
10. Списък на публикациите във връзка с дисертацията;
11. Дисертационен труд;
12. Копия на публикациите по темата на дисертационния труд;
13. Заповед на Ректора Р33-574/13.02.2014 г. за зачисляване в докторантура;
14. Заповед на Ректора Р33-906/07.03.2017 г. за отчисляване от докторантура;
15. Заповеди за комисии за провеждане на изпити от индивидуалния учебен план;
16. Протоколи за издържани изпити от индивидуалния учебен план;
17. Автореферат;

Докторантката е представила 2 броя публикации, постери и сертификати от участия в научни форуми, както и сертификат от обучение в чужбина.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Айще Селим е възпитаник на ПУ „П. Хилендарски“: завършила е ОКС „бакалавър“, специалност Молекулярна биология през 2011 г. и ОКС „магистър“, специалност Биофармацевтична биохимия през 2013 г. Работи като биолог в секция Биохимия на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ продължение на една година. От 01.03.2014 г. е редовен докторант в катедра „Биохимия и микробиология“, докторска програма „Микробиология“.

3. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Фруктоолигозахаридите привличат все по-голям интерес като основни пребиотични функционални хранителни добавки с доказани здравословни ефекти: стимулиране на растежа и активността на „полезната“ чревна микрофлора, понижаване нивото на триглицеридите и холестерола, стимулиране на имунната система, понижаване риска от чревни инфекции и рак на дебелото черво, подобряване абсорбцията на Mg и Ca и др. Фруктоолигозахаридите със степен на полимеризация от 2 до 10 са едни от основните източници на въглерод и енергия за „полезната“ микрофлора в човешкия чревен тракт. Синтезират се с микробни ензими, продуцирани от редица представители на родове *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* и др. Синтезираните фруктоолигозахариди имат различна структура и свойства, както и начин на усвояване от „полезната“ микрофлора, което определя големият научен интерес към тези ензими през последните 20 години.

В този аспект, дисертационният труд, който е посветен на оптимизиране на синтеза на фруктозилтрансфераза - леванзахараза (чрез използване на рекомбинантни щамове *Escherichia coli* и *Lactobacillus plantarum*) и охарактеризирането на ензима с цел приложението му за получаване на олигозахариди е актуална и има научно-приложно значение.

4. Познаване на проблема

Литературният обзор (33 стр.) показва много добра теоретична осведоменост по темата на дисертацията. Представена е систематизирана информация за гликозилтрансферазните ензими - описани са бактериалните глюканзахарази и фруктозилтрансферази, катализираните от тях реакции и продуктите на ензимното действие, като логично е поставен акцент върху фруктозилтрансферазите. Обзорът запознава със структурата, свойствата и синтеза на фруктоолигозахаридите. Описана е експресията на фруктозилтрансферазни гени в различни гостоприемници – *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, млечнокисели бактерии и sPIP-експресионна система за *Lactobacillus*.

Обзорът е написан целенасочено и прецизно, като са използвани 168 съвременни литературни източници на латиница; над 60 % от литературните източници са публикувани след 2000 г.

На базата на задълбочения литературен анализ е формулирана целта на дисертацията, която включва две обособени теми и произтичащи от тях 8 конкретни задачи.

5. Методика на изследването

В дисертацията са използвани подходящи методи, съобразно изискванията на конкретните задачи. Много добро впечатление прави умелото прилагане на голям брой съвременни микробиологични, биохимични и молекулярно-биологични методи, сред които клониране на гена за леванзахараза; пречистване на ензима и определяне на молекулни и кинетични свойства; определяне на ензимни активности, HPLC метод за анализ на продукти и др. Адекватно използваните методи показват, че докторантката е придобила необходимия методичен опит за провеждане на научен експеримент.

Към този раздел имам следните забележки: не е необходимо да се описват компонентите на средата, ако е готова (фирмена); описаните в подточки 2.2., 2.3., 2.4., 2.5., 2.6. среди би следвало да бъдат в единствено число, т.к. се касае за една среда; би било добре да се използват български термини, където е възможно, напр. вместо „оувърнайт“ култура – 12 ч. култура; излишно е описанието на едни и същи условия за оптимизиране на условията за експресия в колба и биореактор, биха могли да се посочат само различията.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд обхваща 144 страници. Съдържанието е структурирано в раздели, между които са спазени оптимални съотношения: Увод – 1 стр., Литературен обзор - 33 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 16 стр., Резултати и дискусия – 60 стр., Обобщение – 5 стр., Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Литература – 13 стр..

Дисертационният труд включва едно задълбочено изследване, което доразвива и обогатява тематиката, по която в секция Биохимия на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ се работи в продължение на години. Извършена е внушителна по обем експериментална работа, в изпълнение на амбициозната цел, включваща две отделни трудоемки теми. Резултатите от изследванията са онагледени със 17 таблици и 48 фигури.

Проведените експерименти и получените резултати могат да бъдат систематизирани в три основни раздела.

Първият раздел включва охарактеризиране на свойствата на леванзахаразата от рекомбинантния щам *Escherichia coli* BL21LS17, конструиран в секция Биохимия на катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ. Определена е динамиката на ензимната продукция; ензимът е пречистен до хомогенно състояние чрез афинитетна хроматография с Ni-Sepharose. Анализирани са някои показатели на ензимната

реакция, като оптимална температура, рН, кинетични параметри (K_m и V_{max}) в присъствие на различни акцептори и съотношение между трансферазната и хидролазната активност на ензима; ефект на органични разтворители върху леванзахараната активност. Доказаната преобладаващо трансферазна активност на леванзахарата от рекомбинантния щам *E.coli* BL21LS17 дава възможност ензимът да се използва за синтез на фруктоолигозахариди.

Вторият раздел включва резултати, свързани с използването на ензима от рекомбинантния щам *E.coli* BL21LS17 за синтеза на фруктоолигозахариди и има най-голямо приложно значение. Проведени са детайлни изследвания на динамиката на синтеза на олигозахариди в присъствие на различни концентрации на захараза и акцепторите – малтоза, лактоза, рафиноза, както и при различни концентрации на ензима.

В третия раздел са представени експериментите по успешното клониране на гена за леванзахараза в щамове *Lactobacillus plantarum* NC8FTF и *L. plantarum* WCFS1FTF. Установена е динамиката на ензимната продукция на рекомбинантните щамове. И при двата щамове продукцията на леванзахараза е преобладаващо извънклетъчна и е съпоставима с литературните данни за експресия при използване на pSIP-системата.

След раздела „Резултати и дискусия“ е направено обобщение, в което в синтезиран вид са представени получените резултати, обсъдени са на базата на наличните в литературата данни и са дадени някои перспективи за бъдещи изследвания по тематиката на дисертацията.

Изводите са логично следствие от поставените задачи и отразяват вярно получените резултати. Приемам формулираните приноси, като считам, че реално те са повече от представените от Айше Селим.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Основните приноси на работата, които определят значимостта ѝ са:

7.1. Научни:

- Определени са оптималните условия за експресията на леванзахараза от рекомбинантния щам *E.coli* BL21LS17;
- Определени са кинетичните параметри K_m и V_{max} на пречистената леванзахараза от *E.coli* BL21LS17;
- Установени са температурния и рН- оптимуми за действието на ензима на *E.coli* BL21LS17;

- Успешно е клониран гена за леванзахараза в щамове *Lactobacillus plantarum*;

7.2. Научно-приложни:

- Леванзахаразата на рекомбинантния щам *E.coli* BL21LS17 е пречистена до хомогенно състояние чрез хроматография на Ni-Sepharose;
- Доказана е преобладаващо трансферазна активност на леванзахарата от рекомбинантния щам *E.coli* BL21LS17 при наличие на малтоза, лактоза и рафиноза в реакционната смес;
- Определени са концентрациите на захараза (като донор) и на лактоза (като акцептор), при които се синтезират късоверижни фруктоолигозахариди с леванзахаразата на рекомбинантния щам *E.coli* BL21LS17;
- Установена е екстрацелуларна експресия на леванзахараза от рекомбинантните щамове *Lactobacillus plantarum*, при определените оптимални условия на култивиране.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Докторантката е представила 2 статии във връзка с дисертацията. Статиите са на английски език и са публикувани в списания с импакт фактор - Bulgarian Chemical Communication и J. Basic Microbiology. В една от публикациите Айше Селим е първи автор.

9. Лично участие на докторантката

Дисертационният труд е резултат от работата на докторантката Айше Селим под вещото ръководство на научния ръководител – проф. Илия Илиев, който е един от водещите специалисти в страната и чужбина в областта на про- и пребиотиците.

10. Автореферат

Авторефератът е направен според изискванията и вярно отразява основните резултати на дисертационния труд.

11. Критични забележки и препоръки

Към дисертационния труд имам следните въпроси и забележки:

- Ще има ли динамиката на олигозахаридния синтез същия профил при използване на различни концентрации на леванзахараза от щам *E.coli* BL21LS17?

- Как ще обясните разликата в експресията на двата щама *L.plantarum*?
- Липсва списък със съкращенията;
- Грешка в номерацията на подразделите в лит.обзор „1.4“ е повторен 2 пъти;
- На фиг. 20, 21, 22, 23 липсват обозначения на ординатната ос;
- Някои от представените таблици и фигури не са цитирани в текста; допусната е грешка при цитирането на таблица 20.

Посочените неточности са технически и не омаловажават постигнатите резултати.

12. Лични впечатления

Познавам лично докторантката Айше Селим като старателен и прецизен студент и изследовател.

13. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Препоръчвам да продължи работата по охарактеризиране на ензимите от рекомбинантните щамове *Lactobacillus plantarum* и възможностите за приложението им при синтез на фруктоолигозахариди, както и да се направи сравнение с ензима на *E.coli* BL21LS17.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и съответния Правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и резултати **съответстват** на специфичните изисквания на Биологическия факултет, приети във връзка с Правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че Айше Селим притежава теоретични знания и професионални умения по научна специалност Микробиология. В процеса на обучение докторантката е усвоила широк набор от умения и методи, способности самостоятелно да провежда експерименти, правилно да представя и интерпретира получените резултати.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено в рецензираните по-горе дисертационен труд,

автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен 'доктор'** на Айше Сейхан Селим в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма **Микробиология**.

15.09.2017 г.

Рецензент:

Доц.д-р Соня Костадинова