

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дбн Искра Витанова Иванова,
върху дисертационен труд, представен за защита пред научно жури
получаване на образователната и научна степен «доктор»

Автор на дисертационния труд: *Айше Сейхан Салим*

Тема на дисертацията: „*ОПТИМИЗИРАНЕ ЕНЗИМНИЯ
СИНТЕЗ НА ОЛИГОЗАХАРИДИ С
ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗИ ОТ
Leuconostoc mesenteroides*”

Научен ръководител: проф. д-р Илия Илиев

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Млечнокиселите бактерии са обещаващ източник на полизахариди и олигозахариди които имат важни здравени ефекти. Те се синтезират в голямо разнообразие от глюкани и фруктани, хомополизахариди, които варират, например, по отношение на гликозидните връзки, разтворимост и степен на разклоняване. Тези параметри определят до голяма степен функционални им свойства. Голям интерес представляват ензимите, които ги синтезират. Основното промишлено производство на фруктоолигозахариди се осъществява от ензимната трансформация на захарозата от микробни ензими наречени фруктозилтрансферази. Различни щамове от родовете *Streptococcus*, *Lactobacillus* и *Leuconostoc* продуцират различни гликозилтрансферази в комплекс - фруктозилтрансферази (ФТФ) и глюкозилтрансферази.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 132 стандартни компютърни страници, които включват 121 страници текст и 11 страници литература. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно и включва всички аспекти на изследването. В него са отразени 168 публикации (на латиница),

кореспондиращи с всяка една от поставените задачи. Над 40% от статиите са публикувани след 2008 г.

2.1. Литературен обзор

Обзорът представя състоянието на проблема и доказва необходимостта от разработването на дисертационната теза. Анализирани и обобщени са голям обем научна информация, което показва много добрата теоретична подготовка на докторантката. Литературният обзор е в 3 части, където последователно се разглеждат гликозилтрансферазни ензими при млечно-киселите бактерии, а именно глюканзахарази и фруктозилтрансферази и реакциите катализирани от тези ензими. Показана е тяхната структурната и функционална организация. Охарактеризирани са продуктите от ензимите гликозилтрансферази като полизахариди, глюкани, фруктани и олигозахариди. Във втората част са разгледани данните по експресията на фруктозилтрансферази в рекомбинантни щамове *Esheria coli*. В третата част авторката разглежда използването на лактобацили за рекомбинантна експресия на протеини.

2.2. Цел на дисертационния труд

Целта на настоящата дисертация е да се изследват свойствата и капацитета на трансферазната реакция за синтез на олигозахариди от леванзахараза, получена от рекомбинантен щам *E. coli* BL10 LS17 и да се осъществи трансфер на гена за леванзахараза от изходен щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm 17 в реципиентен щам на *Lactobacillus plantarum*. За реализирането на тази цел са формулирани 8 конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи.

2.3. Материали и методи

Разделът "Материали и методи" демонстрира внушителен набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са както рутинни, така и съвременни, микробиологични, биохимични, молекулярно-биологични и др. Описани са достатъчно подробно, за да могат да бъдат възпроизведени. Освен това са разбираеми и дават възможност за коректно провеждане на експериментите и получаване на достоверни резултати. Искан да подчертая, че настоящата разработка е достоверна и прецизна.

2.4. Резултати и обсъждане

В раздел „Резултати и дискусия” е включен експериментален материал, който е представен на 59 стр. и демонстрира широко-мащабна изследователска дейност. Важно е да се отбележи, че разработката се характеризира с логическа последователност, отделните етапи са разработени обстойно и всеки от тях е база за следващия. Трябва да се подчертае още, че дисертацията е написана в много добър научен стил и коректно отразява получените резултати. Доказателственият материал е оформен професионално в 20 таблици и 60 фигури. Всички тези фигури и таблици още веднъж доказват мащабния характер на разработката. Смятам, че получените резултати са убедителни и тяхната достоверност не подлежи на съмнение. Следвайки логичната последователност на поставените задачи авторката установява оптималните условия за индуциране на експресията на гена, кодиращ леванзахараза от щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm17 в рекомбинантен щам *E. coli* BL21LS17. Оптимизира схема за пречистване на леванзахаразата от рекомбинантен щам *E. coli* BL21LS17 при използване на афинитетна хроматография с колона Ni-Sepharose колона His-Trap FF. Доказва, че е преобладаваща трансферазна реакция (над 70%) от тоталната леванзахаразна активност е при наличие в реакционната смес на акцепторите малтоза, лактоза и рафиноза и максималната трансферазна активност. Изследва Km на леванзахаразата и максималната скорост при различни концентрация на субстратите. Особен интерес в разработката е установяването на възможността за синтез на олигозахариди в присъствие акцептори малтоза, лактоза, рафиноза, фруктоолигозахариди и галактоолигозахариди, като най-подходящ акцептор е малтоза. Синтезират се основно тризахариди. Установява е, че при използване на 117 mM лактоза като акцептор инзахароза като донор на фруктозни единици се синтезират основно тризахариди с предполагаема структура на лактозахароза.

Изключително впечатление правят резултатите по успешното трансфериране на гена за фруктозилтрансфераза от изходен щам *Leuconostoc mesenteroides* Lm 17 в щам на *Lactobacillus plantarum*. Установени са оптималните условия за култивиране на рекомбинантен щам *Lactobacillus plantarum* NC8 за секреция на леванзахараза ,като са определени оптимална температура за индукция на секрецията на ензима и оптимална концентрация на индуктора.

Установени са оптималните условия за култивиране на рекомбинантен щам *Lactobacillus plantarum* NC8 за секреция на леванзахараза – оптимална температура за индукция на секрецията на ензима и характеристиките му.

Към достоинства на дисертацията трябва да се добави и умението на *Айше Сейхан Салим* да отразява извършеното много ясно и коректно, да обсъжда получените резултати на фона на постигнатото от други автори. Това, разбира се, е възможно благодарение на много доброто познаване на проблема и задълбочената научна разработка.

2.5. Изводи и приноси

Изводите са логично следствие от проведените експерименти. Според мен са формулирани в съответствие с постигнатото. Приемам направените приноси.

2.6. Препоръки, забележки и въпроси

Към докторантката имам следните въпроси:

1. Кой от засегнатите в дисертацията аспекти трябва да има приоритет при следващи научни разработки? Според мен, извършените изследвания дават възможност да се открият сериозни теоретични приноси, както оригинални, така и приложни.
2. Каква е ролята на сигналните прекурсорни пептиди при секрецията на FS при грамположителните бактерии?
3. Кои са основните характеристики на леван захарозата в структурната и функционалната и организация?
4. Как ще обясните синтеза единствено на тризахариди при трансферазната реакция на изследваната от вас леванзахараза в присъствие на лактоза като акцептор, докато при използване на малтоза се синтезират и тетразахариди?

2.7. Публикации във връзка с дисертационния труд

Част от резултатите са включени в 2 научни публикации, в списания с импакт фактор (IF), от които докторантката е на първо място в една от тях. Представени са резултати и на 5 научни форума, от които 3 са международни. Докторантката е участвала в 5 научни проекта. Тези данни ми дават основание да направя извода, че в основната си част, резултатите са дело на докторантката и научната общност е запозната с тях.

3. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантката *Айше Сейхан Салим* е придобила компетенции и умения, които могат да бъдат групирани по следния начин:

- разширила е теоретичната си компетентност в областта на молекулярната микробиологията и биохимия
- придобила е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научна информация.
- обогатила е методичните си умения, особено в частта на прилагането на редица съвременни методи
- придобила е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите, получени в хода на разработването на дисертацията, както и да прави изводи на базата на тях

4. Заключение

Всичко това ми дава основание да смятам, че докторантката *Айше Сейхан Салим* е придобила компетенциите и уменията, които се изискват за придобиване на образователната и научна степен „доктор”. Смятам, че обемът на този труд е внушителен, направени са много анализи, получени са ценни резултати, направени са важни изводи, а изследването има научно-приложни приноси.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академичния състав в Република България и този на Пловдивския Университет «Паисий Хилендарски» считам, че настоящият труд отговаря на изискванията за докторска дисертация, оценявам го положително препоръчвам на уважаемите членове на Научното жури, сформирано със заповед Р 33-3750/21.07.201 на Ректора на Пловдивския Университет «Паисий Хилендарски» да присъдят образователната и научна степен «доктор».

13.09.2017 г.

Рецензент:

Проф. Искра Иванова, дбн