

СТАНОВИЩЕ

от проф. д-р Георги Тодоров Добрев,
Университет по хранителни технологии

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, област на висше образование **4. Природни науки, математика и информатика**, професионално направление **4.3. Биологически науки**, докторска програма „**Биохимия**“

Автор: Станимира Ангелова Ангелова

Тема: “Изследване свойствата на биоинженерни алфа-D-глюкани, синтезирани от мутантна глюканзахараза URE 13-300”

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

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № РД-21-2469 от 18.12.2023 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ (ПУ) съм определен за член на научното жури по процедура за защита на дисертационен труд на тема **“Изследване свойствата на биоинженерни алфа-D-глюкани, синтезирани от мутантна глюканзахараза URE 13-300”** за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ от Станимира Ангелова Ангелова – редовен докторант към катедра „Биохимия и микробиология“. Представеният от докторант Станимира Ангелова комплект материали на електронен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва всички изискуеми документи.

2. Актуалност на тематиката

Ензимите се разглеждат като мощно средство за осъществяване на „зеления“ преход на съвременната икономика. Като „зелени“ катализатори те отговарят на всички съвременни изисквания за безопасност и опазване на околната среда. Специфичността на каталитичното им действие и високата им активност позволяват многократно повишаване на скоростта на желани химични реакции при отсъствие на странични продукти. Наред със своите предимства, белтъчната природа на ензимите определя и някои ограничения за тяхното приложение – ниска операционна стабилност и висока цена. Полагат се значими усилия за инженеринг на ензимите, с което да се разшири тяхното приложение. Основните подходи за ензимен инженеринг са имобилизацията на ензимите и протеиновото инженерство. Съвременна тенденция са и изследванията насочени към използване на ензими като катализатори на реакции, които не протичат в природата, като за целта често се използват нетипични реакционни среди.

Изследванията в дисертационния труд са насочени към използване на методите на протеиновото инженерство за получаване на мутантна глюканзахараза, която да бъде използвана за получаване на глюкан с потенциал за приложение в различни области на промишлеността. Темата е актуална и е съобразена с модерните тенденции за развитие на ензимологията. Докторантката прилага подхода на „рационален дизайн“ на протеиново инженерство с цел получаване на мутантна глюканзахараза. Провежда сайт-насочен мутагенез на глюканзахараза URE 13-300, състоящ се в единична точкова мутация (G449K) и изследва свойствата на получения мутантен ензим, както и на ензимно синтезирания алфа-глюкан. В дисертационния труд са проведени изследвания и върху влиянието на реакционната

среда и вида на акцептора като средство за моделиране на ензимната активност. Темата, използваните методики и реализираната експериментална работа са на съвременно ниво.

3. Познаване на проблема

В раздел „Литературен обзор“ докторантката е представила и анализирал актуална информация свързана с класификацията, механизма на действие и структурната организация на микробни глюканзахарази. Изчерпателната информация за структурната организация на глюканзахаразите е анализирана критично и е направена връзка с механизма на действие и специфични биохимични свойства на ензимите, което е предпоставка за успешно реализиране на избрания подход за „рационален дизайн“ на протеиново инженерство. От анализирания информация става ясно, че със сайт-насочен мутагенез е възможно значително да се променят биохимичните характеристики на ензима, а от там и физикохимичните свойства на синтезираните полизахариди. В материала много добре личи стремежът на докторантката да направи връзка между структурата на белтъчните молекули и техните свойства, да определи участъците и домените в глюканзахаразите, които могат да бъдат подложени на промяна, така че да се получат ензими с нови характеристики. В обзора е включена и информация за практическото приложение на микробни алфа-глюкани с различна структура и физикохимични свойства, което позволява на докторантката аргументирано да формулира за цел на дисертационния труд получаването на глюкани със специфични свойства чрез биоинженеринг на микробна глюканзахараза.

4. Методика на изследването

При разработването на дисертационния труд, докторантката е използвала голям брой микробиологични, химични, ензимни и инструментални методи за анализ. За мен висока добавена стойност има овладяването на биоинформационния анализ и работата с онлайн биоинформационните инструменти, които са в основата на успешния протеинов биоинженеринг. Докторантката е овладяла и методи за определяне на ензимна активност и принципите за изследване на кинетиката на ензимните реакции. Проведен е ЯМР анализ за определяне на структурата на синтезия глюкан. Считаю, че са придобити нужните практически опит и знания за провеждане на научни изследвания на съвременно ниво. Използваните методи и постановката на експериментите съответстват на поставените цел и задачи в дисертационния труд.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е написан на 157 страници. Съдържанието е правилно структурирано в следните раздели: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (32 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (15 стр.), Резултати и обсъждане (50 стр.), Обобщение (5 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.), Литература (11 стр.). В дисертацията са включени и 33 стр. приложения към раздел Резултати и дискусия. Формулираната цел е ясна и изпълнима. Изследванията са насочени към получаване на мутантна глюканзахараза с нови биохимични свойства, която да бъде използвана за получаване на глюкани със специфична структура и свойства. Поставени са 7 изследователски задачи. Извършена е целенасочена експериментална работа, която е отразена коректно, а опитните резултати са онагледени с 3 таблици и 31 фигури, а като приложения са представени още 63 фигури с опитни резултати, които са пряко свързани с темата. Опитните резултати са аргументирано дискутирани и критично сравнени с резултатите от достъпната литература.

Като основни научни приноси на дисертационния труд мога да посоча:

1. Осъществена е успешна единична точкова мутация (G449K) чрез сайт-насочен мутагенез в домен В на каталитичен домен 1 на глюканзахараза URE 13-300 и е получена

активна мутантна глюканзахараза U13M1, която се характеризира с променени биохимични и кинетични характеристики.

2. Определени са оптималните условия за *in-vitro* синтез на алфа-D-глюкан с получената мутантна глюканзахараза U13M1.

3. Установено е, че мутацията (G449K) в глюканзахараза URE 13-300 значително намалява α -(1 \rightarrow 3) връзките в основната верига и в разклоненията на синтезирания глюкан.

4. Доказана е възможността за ензимен синтез на олигозахариди с глюканзахараза URE 13-300 във водно-органична среда.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Резултатите от дисертационния труд са публикувани в 3 научни статии – една в квантил Q2 и две в квантил Q4. В две от публикациите докторантката е първи автор. С посочените публикации, докторантката изпълнява националните минимални критерии за придобиване на ОНС „доктор“ в професионално направление 4.3. Биологически науки (Показател А – 50 т., Показател Г – 44 т.). Докторантката е участвала в 6 научни конференции и е част от колектива на 5 научноизследователски проекта. Провела е краткосрочна специализация в Университет на Гент, Белгия.

7. Автореферат

Авторефератът е оформен според изискванията и коректно отразява структурата и съдържанието на дисертационния труд.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Имам следните въпроси:

1. Защо при изследването на влиянието на органичните разтворители върху ензимната активност сте използвали алкохоли, които могат да бъдат разглеждани като субстрат (акцептор с ОН-група) на ензимната реакция?

2. Как дефинирате, т.нар. от Вас „оптимална субстратна концентрация“ за ензимно действие?

3. Защо при определяне на K_m и V_{max} представяте скоростта на реакцията в U/mg? Може ли белтъчното съдържание да промени представената скорост на ензимна реакция?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговаря на всички изисквания на ЗРАСРБ. Дисертационният труд показва, че докторантката притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „Биохимия“ като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Убедено давам своята положителна оценка на дисертационния труд и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на **Станимира Ангелова Ангелова** в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма по „Биохимия“.

09.02.2024 г.

Изготвил становището:

/проф. д-р Георги Добрев/