

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Мария Богомилова Ангелова, дбн, Институт по микробиология „Стефан Ангелов” при БАН

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“ по: 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 Илиев, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № РД 21-2465 от 18.12.2023 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: „Изследване свойствата на биоинженерни алфа-d-глюкани, синтезирани от мутантна глюканзахараза URE 13-300“ 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 Биохимия. Автор на дисертационния труд е Станимира Ангелова Ангелова – докторантка в редовна форма към катедра “Биохимия и микробиология“ с научен ръководител проф. д-р Илия Николов Илиев от Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Представеният от Станимира Ангелова комплект материали е в съответствие с Чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва всички изисквани документи. Докторантката е приложила 3 научни публикации, участие в 6 научни форума и 5 научноизследователски проекта (1 с международно финансиране). Всички те са във връзка с разработената докторска теза. Броят на научните статии съответства на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника към него на ПУ.

2. Кратки биографични данни за докторанта

Докторантката Станимира Ангелова получава висшето си образование в Биологическия факултет на ПУ. През 2014 г завършва бакалавърска степен по молекулярна биология, а през 2018 придобива образователната степен Магистър по “Биофармацевтична биохимия“, след което работи последователно като организатор-работа с клиенти в Ритейл Дайрект ЕООД и като химик-аналитик в Биовет АД – гр. Пещера/Хювефарма. Нейната научна кариера започва през м. май 2020 г, когато е назначена за изследовател в Център по технологии, ПУ „П. Хилендарски“. Цялото обучение на докторантката и работата преди началото на докторантурата са насочени към получаване на знания и експериментални умения в областта на молекулярната биология и биохимията, основа за по-нататъшната ѝ научна кариера. За

периода от 01.03.2020 до 01.05.2023 Станимира Ангелова е редовен докторант към катедра “Биохимия и микробиология“ на ПУ.

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

Преди всичко, искам да отбележа, че представеният дисертационен труд е мултидисциплинарен и е насочен към най-сериозните предизвикателства на днешния ден – създаването на нови материали за получаването на продукти с медицинско и индустриално значение. Към това трябва да добавим техния значим екологичен ефект. През последните години биополимерите се явяват устойчива алтернатива на традиционните пластмаси. Постиженията в тази област откриват нови пътища за рационално инженерство на бактерии за целенасочено производство на биополимери. Знанията за молекулярните и регулаторни механизми, които са в основата на тези процеси, непрекъснато нарастват. Това предоставя мощни инструменти за проектиране на бактерии, способни на ефективно производство на биополимери и на модифицирани полимери с уникални свойства за специфично приложение с висока икономическа и екологична стойност. Глобалният пазар на биопластмаси и биополимери демонстрира значителен растеж. Предвижда се през 2027 г да бъдат достигнати стойности от \$ 31 223 милиона.

Отбелязаното по-горе характеризира актуалността на разработката, очертава една широка и неизследвана ниша, обхващаща както научен, така и приложен аспект и предполага получаване на оригинални приноси. Още повече, че Станимира Ангелова има шанса да работи в школата на проф. Илиев, което е предпоставка за съвременно ниво на изследванията и за израстване на квалифициран учен в едно модерно направление на биохимията.

Основната теоретична насоченост на изследването е свързана с получаване на знания относно синтеза на нови биополимери чрез биоинженерни подходи, както и доказателства за връзката между структурата на ензима и структурата на продукта на ензимната реакция. В научно-приложен аспект, дисертацията предлага нов, алтернативен модел за производството на алфа-d-глюкани на базата на мутантна глюканзахараза с перспектива за приложение.

4. Познаване на проблема

Според мен, представената докторска дисертация е мащабно научно изследване, което респектира със своя задълбочен теоретичен анализ, съвременни методични подходи и логически свързани експерименти, всеки един от тях със сериозна доказателствена стойност. Дисертационният труд е конструиран в традиционна академична форма със съответните раздели. Написан е на 157 стандартни компютърни страници и е онагледен с 37 фигури, 12 приложения и 5 таблици. Литературният обзор е оформен на базата на 175 научни публикации, той е целенасочен, обхваща широк диапазон от аспекти, свързани с проучвания проблем и отразява неговото съвременно ниво. На 32 страници Ангелова много ясно и достъпно въвежда читателите в теорията на всички предстоящи изследвания и демонстрира своите сериозни познания в тази област. В него читателят се запознава с характеристиката на бактериалните глюканзахарази, тяхната структура и функционална организация, каталитичния механизъм за синтеза на глюкани. Отделено е внимание на мутациите на гените, кодиращи глюканзахаразите от семейство GH70, структурата на глюканите и олигозахаридите и техните свойства. Важна част от обзора са подразделите относно дизайна на глюканзахаразите за

получаване на полизахариди и олигозахариди с контролирана дължина на веригата, както и дизайн на глюканзахаразите и разклоняващите захарази за гликозилиране на не-естествени акцептори. Обзорът завършва с данни за приложението на алфа-глюканите и олигозахаридите, продуцирани чрез глюканзахаразите от семейство GH70.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация - да се изследва взаимовръзката между структурата на синтезираните глюкани и промяната на аминокиселинната последователност на каталитичен домен 1 на глюканзахараза URE 13-300 чрез сайт-насочен мутагенез. Според мен целта съответства на актуалността на проблема и подчертава иновативния характер на разработката. Тя е ясна, добре формулирана и обединява направленията на експерименталната работа. За реализирането ѝ са формулирани 7 конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи, които включват всички задължителни етапи на подобно проучване. Още тук се вижда сериозният обем на работата, поставена пред докторантката.

5. Методика на изследването

Разделът "Материали и методи" демонстрира много широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са както рутинни, така и най-модерни от областта на микробиологията, биохимията, молекулярната-биология, биоинформатиката и др. Правят впечатление методите за провеждане на сайт-насочен мутагенез, който включва дизайн на праймери и провеждане на PCR за замяна на кодона на глицина с кодона за лизин; трансформация в щам *E. coli* BL21 (DE3) Hi-control клетки за експресия на мутантния ген; биоинформатичен анализ и изграждане на хомоложен модел. Използвани са SDS-PAGE, ЯМР и HPLC анализи на α -глюкани и олигозахариди. Методите са описани много детайлно и могат да бъдат възпроизведени. Всички те са достатъчно основание за достоверност и прецизност. Този раздел още веднъж подчертава иновативния характер на разработката и нейното високо ниво.

6. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Разделът „Резултати и обсъждане” в научния труд на Станимира Ангелова очертава едно задълбочено научно изследване, реализирано на високо методично ниво. Разработката се отличава с ясно изразена логическа последователност, с голям брой целенасочено проведени експерименти и с компетентно направения анализ на получените резултати. Първата и задължителна част от експерименталната работа е свързана с оптимизиране експресията на гена, кодиращ глюканзахараза URE 13-300 по отношение на основните характеристики на ферментационния процес – биомаса, продължителност, значение на индуктора и активност на синтезирания ензим. Полученото забележително повишение на ензимната активност е база за следващия етап, в който е постигнато оптимизиране на условията за ензимен синтез на α -глюкан в биореактор. Следва детайлно проучване на ензимната реакция във водно-органична среда. Получени са резултати за ефекта на 9 органични разтворители в различни концентрации. Интерес представляват изводът на докторантката, че рекомбинантно продуцираната глюканзахараза URE 13-300 се инхибира от нисши алкохоли с ниско молекулно тегло, за разлика от нативния тип ензими. След избора на подходящи разтворители са получени данни за тяхното влияние върху трансферазните реакции в присъствието на

малтоза като акцептор. Установени са кинетичните параметри на реакцията и е доказано 30% повишение, в сравнение с реакцията при наличието само на захароза. Представени са и кинетичните характеристики на ензимната реакция в присъствие на избраните органични разтворители в подходящите концентрации. Тази част включва обширен доказателствен материал в текста и добавеното Приложение №1.

Следващият етап включва задължителното характеризирание на ензимната реакция чрез влиянието на органичните разтворители върху степента на полимеризация на получените глюкоолигозахариди. Посредством HPLC анализ е определен състава на получените олигозахаридни смеси. Искам да отбележа, че анализите са проведени в хода трансферазната реакция, което подчертава нивото на достоверност. Тези данни много ясно са демонстрирани на Фиг. 11 с общ преглед на олигозахаридите според степента им на полимеризация. Тук трябва да се добави и изключително детайлното представяне на динамиката на синтеза на олигозахариди с DP 5 в присъствие на две различни концентрации на органичните разтворители и информативното им оформяне във фигури. С тези експерименти се предлага възможност за повишаване на добива от гликозилирани акцепторни субстрати с повишена водоразтворимост. Обсъжда се възможността гликозилираните терпеноиди и етерични масла да бъдат включени в състава на хранителни добавки с пробиотични, антимикробни и противовъзпалителни свойства.

Докторантката представя доказателства за успешно проведен сайт-насочен мутагенез в гена, кодиращ глюканзахараза URE 13-300, което е сериозно постижение на дисертацията. Експериментите са проведени по всички правила на използвания методичен подход. Чрез биоинформатичен анализ е доказана аминокиселинната секвенция на глюканзахараза URE 13-300, определени са консервативните мотиви, отговорни за специфичността на връзките в синтезираните продукти. На базата на тези резултати е създаден хомоложен модел на каталитичен домен 1 и се предлага концепция за конформацията на ензима преди и след аминокиселинната замяна. От рекомбинантен щам *E. coli* BL21 URE 13-300 е изолиран плазмид, съдържащ гена за експресия и са получени култури носещи целевата мутация. Авторката представя необходимите доказателства в потвърждение на протеклата мутация чрез SDS-PAGE анализ и секвенция на тази част от гена, кодираща глюканзахараза URE 13-300, в която е въведена мутацията. В резултат на проведените експерименти е получена функционираща глюканзахараза U13M1, която може успешно да синтезира полимер от захароза в подходящата за това среда.

Интерес представляват и изследванията относно оптимизиране условията за синтезата на мутантна глюканзахараза U13M1 и условията на ензимната реакция. Детайлно са проучени параметрите за ефективен добив от ензима и за неговото приложение. Доказана е забележителна промяна в кинетичните параметри на мутантния ензим U13M1 в сравнение с изходния тип глюканзахараза. Активността на мутантния ензим U13M1 е значително по-устойчива на инхибиране от високи концентрации на захароза, което е важно условие за използването му в реални условия. Трябва да се отбележи, че в литературата не са докладвани подобни данни.

Като логически финал на раздела, авторката представя получаването на α -глюкани и олигозахариди с мутантна глюканзахараза U13M1, както и данните за тяхната структура. Чрез

ЯМР спектроскопия и реологичен анализ са установени разликите между двата ензима, които касаят оформянето на местата за свързване с акцепторния субстрат и високия динамичен вискозитет на модифицирания полизахарид.

Представянето на резултатите е съчетано с умела дискусия по всички етапи от разработката на базата на подходящи литературни източници. Този раздел демонстрира също сериозната експериментална работа на докторантката и нейните задълбочени познания в тази област. Прави впечатление подхода ѝ да обсъжда много подробно резултатите от проучването, да сравнява постигнатото с данните на други автори. В края на всеки подраздел, Станимира Ангелова формира заключение, което обобщава много информативно получените данни, новото в тях, значението им за постигане на поставената цел и възможността да бъдат база за следващи теоретични и приложни изследвания.

Искам със задоволство да подчертая отличното оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици и фигури, както и тяхното професионално представяне.

Според мен, изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания.

7. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Приемам формулировката на приносите и искам да подчертая тяхното значение в теоретичен и в научно-приложен аспект. По същество, те се отнасят до следното:

1. Постигната е целта на дисертационния труд - чрез сайт-насочен мутагенез, за първи път е получен мутант с променена 3D структура в каталитичен домен 1 и са получени данни за взаимовръзката между структурата и свойствата на мутантната глюканзахараза.

2. Получени са нови знания относно синтеза и свойствата на биоинженерни алфа-d-глюкани чрез мутантна глюканзахараза.

3. За първи път е доказана възможността за ефективен синтез на олигозахариди с акцептор малтоза във водно-органична среда с глюканзахараза URE 13-300.

4. Получена е функционираща мутантна глюканзахараза (U13M1), по-устойчива към високи концентрации на захароза. Ензимът може успешно да синтезира полимер от захароза в подходящата за това среда.

5. Получена е нова информация относно потенциала на едноточковите мутации в глюканзахараза с два каталитични домена и тяхното значение за синтез на модифициран α -глюкан с променена структура и подобрени физикохимични и реологични свойства.

6. Успешно създадената мутация на глюканзахараза URE 13-300 без скъсяване дължината на гена е теоритична база за изучаване на взаимодействието между двата каталитични домена, действащи съответно като декстранзахараза и разклоняваща захараза.

7. Предложен е метод за:

- гликозилиране на акцепторни субстрати, слабо разтворими във вода но с новишена водоразтворимост и бионаличност. Те могат да бъдат приложени в хранителната индустрия и като нови формули във фармацията и козметиката.

- гликозилиране на терпеноиди, производни на етерични масла, с антимикробни, аналгетични и противовъзпалителни свойства. Те могат да бъдат включени в моделирането на хранителни добавки.

8. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Данните от дисертацията са включени в 3 научни статии и 6 участия в научни форуми. Статиите са журнални, те са отпечатани в реномирани специализирани списания: *Catalysts* - IF 3.9 и квантил Q2; *Acta Microbiologica Bulgarica* – квантил Q4 и *Ecologia Balkanica* - Q4. Докладите са представени на 4 международни и 2 национални форума. Това, е указание, че резултатите от разработката са станали достояние на нашата и международната научна общност. В две от статиите Станимира Ангелова е на 1-во място и в 1 – на 2-ро, във всички 6 доклада, тя е на 1-во място. Това доказва нейният значим дял в разработването на дисертационния труд.

Тук искам да добавя, че докторантката е участвала в 5 научно-изследователски проекта, 1 от които е с международно финансиране, 1 - Център за компетентност; 1 е финансиран от ФНИ и 2 са финансирани от ПУ „Паисий Хилендарски“, което ѝ е дало възможност да повиши уменията си, необходими за разработване на дисертацията. За това е допринесла и специализацията на Станимира Ангелова в Центъра по синтетична биология към Департамента по Биотехнология на Университета в Гент, Белгия.

9. Автореферат

Авторефератът е изготвен по изискванията на Правилника на ПУ „Паисий Хилендарски“, отразява правилно и в достатъчна степен получените резултати, изводите и приносите на разработката. Докторантката представя автореферата на български и на английски език. Те са идентични по съдържание и оформление.

10. Критични забележки и препоръки

Към представената дисертация нямам критични забележки, тя отговаря на поставената цел, а така също и на изискванията на Правилника на ПУ „Паисий Хилендарски“. Изготвена е в академичен стил и на високо методично ниво. Към докторантката имам следните препоръки:

1. Литературният обзор да се оформи и издаде като обзорна статия.
2. Да се направи заявка за патент или полезен модел.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение искам да подчертая, че представената докторска дисертация е оригинално научно изследване на иновативна идея, респектиращо със своя мащаб и изследователска дълбочина. Материалът съдържа научни, научно-приложни и 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“.

Материалът, представен от Станимира Ангелова е дисертабилен, темата е актуална и предлага съвременно ниво на важен за теорията и практиката въпрос. Проведените експерименти са поставени методично правилно, получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки. Извършена е огромна

експериментална работа, като поставеният проблем е многостранно и детайлно проучен на съвременен ниво, направени са съществени приноси, както теоретични, така и приложни. Към тази характеристика на дисертационния труд искам да добавя, че според мен, Ангелова излиза от докторантурата като добре подготвен специалист в областта на биохимията и молекулярната биология, усвоила е голям брой съвременни методи, получила е опит при интерпретиране на научни данни. Всичко това ѝ дава квалификация на учен, достоен конкурент на колеги от чуждестранни лаборатории.

Въз основа на направения разбор и на доказаното израстване на докторантката, предлагам на уважаемите членове на научното жури, сформирани със заповед № РД 21-2465 от 18.12.2023 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ да присъдят на **Станимира Ангелова Ангелова** образователната и научна степен “**доктор**” по научно направление 4.3 Биологични науки, докторска програма Биохимия.

15.02.2024 г.

Рецензент:

(подпис)

/проф. Мария Ангелова, дбн/