

СТАНОВИЩЕ

от

доц. д-р Мая Боянова Георгиева, Фармацевтичен факултет, МУ – София.

За придобиване на образователна и научна степен „доктор” в област на висшето образование: 5. Технически науки; професионално направление: 5.11. Биотехнологии; научна специалност: Биоорганична химия, химия на природните физиологично активни вещества

от инж. Лъчезар Стефанов Мановски – докторант в катедра Биотехнология на ХТМУ – София с тема: Изолване и охарактеризиране на липоксигеназа от авокадо (*Persea Americana* mill.) с научен ръководител доц. д-р инж. Иво Лалов (проф. д-р инж. Любов Йотова†).

Биографични данни:

инж. Лъчезар Стефанов Мановски е завършил ХТМУ – София със специалност магистър по биотехнология през 2013 г. От 2014 г. е зачислен като редовен докторант в катедрата по Биотехнология на ХТМУ. През периода на редовната си докторантура инж. Мановски е положил с отличие четирите предвидени в индивидуалният му учебен план изпити. В рамките на трудовият си стаж заема длъжността „химик” в Института по Биофизика и Биомедицинско Инженерство при БАН, София (2015 г.), а в последствие длъжността химик качествен контрол във фармацевтична компания „Софарма“ АД за периода 2017 г. – 2018 г. От 2018 г. До момента е инженер – технолог, качествен контрол в химична лаборатория към БулБио - НЦЗПБ.

Представеният дисертационен труд обхваща изследвания в една интересна научна област свързана със здравето и хранителните навици, засягаща широка общественост и доказала своята значимост и перспективност. Научните изследвания в разглежданата област, засягаща изолването и охарактеризирането на липоксигенази ще бъдат полезни за биологията и медицината с предоставянето на възможности за приложение на описаните методики.

Дисертационният труд е написан на 94 стандартни страници и включва следните основни елементи: Използвани съкращения, Литературен обзор, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия; Заключение, Приноси, Изводи, Литература, Списък на научните публикации по дисертационния труд и Списък на постерните доклади по дисертационния труд, изнесени на научни конференции и постерни сесии. Работата съдържа 59 фигури и 3 таблици. Цитирани са 99 литературни източника.

Целта на предоставеният ми за становище дисертационен труд е изолване, пречистване и охарактеризиране на липоксигеназа от авокадо. В допълнение изолваният ензим да бъде имобилизиран върху носители с подходящи технологични характеристики, като едновременно с това да бъдат изследвани и възможностите за установяване на неизвестни инхибитори на ензима с потенциал за бъдещи лекарствени средства.

В изпълнение на поставените задачи е формулирана и реализирана подходяща методика за изолиране на липоксигеназа от авокадо базираща се на първоначално обезмасляване на плода, екстракция с вода и последващо пречистване на ензима с помощта на фракционно утаяване последвано от изолиране на чистият ензим с помощта на афинитетна хроматография. Изолираният ензим е подложен на охарактеризиране по отношение на молекулна маса с помощта на SDS-гелна електрофореза, определяне на белтъчно съдържание по метод на Лоури и изследване на свободния ензим с помощта на линоленова киселина, като субстрат показващ неговата активност, оптимуми и кинетични параметри. Установени са три съединения с потенциално инхибиторно действие: Z-серин, N-Z-L-серин и L-каналин. Важен за изследването е факта, че и в трите случая промяната на кинетичните параметри при инхибираната реакция следва тенденцията на инхибиране от смесен тип.

В последствие е извършена адсорбционна имобилизация на ензима върху два полимерни носителя на база дендримери: TMOS, CAB, PAMAM и MTEC, CAP, PAMAM при което са получени два биокатализатора. При охарактеризирането им не са установени съществени промени в температурният и рН интервал на имобилизираният ензим, спрямо свободния. От друга страна е наблюдавано значително намаляване на специфичната активност на имобилизираният ензим, което се предполага, че се дължи на специфичен ефект на микрообкръжението и наличието на дифузионни ограничения. Това обаче не повлиява афитета на ензима към субстрата линоленова киселина следователно избраните имобилизационни техники и условия са подходящи за бъдеща употреба.

Проучени са две алтернативни възможности за определяне на ензимната активност и кинетичните параметри на липоксигеназата и катализираните от нея реакции. Определянето на ензимната активност посредством измерване на кислородната консумация е свързано с известни трудности от апаратурно естество, въпреки това са определени кинетичните параметри на реакцията, които е установено, че са сходни с получените от по-класическия спектрофотометричен подход.

Представеният ми за становище дисертационен труд се характеризира със следните приноси, дефинирани от авторите му:

- ✓ Изследвана е кинетиката на инхибиране на реакцията, катализирана от липоксигеназа от авокадо, в присъствието на три потенциални инхибиторни съединения. Въз основа на получените резултати са направени изводи, относно силата на инхибиращият ефект, според съдържаща се amino- или хидроксилна група.
- ✓ Изолираният и пречистен ензим – липоксигеназа от авокадо е имобилизиран, чрез адсорбция върху два съполимера на базата на дендримери. От обобщените резултати, които показва системата ензим-носител, може да се направи заключението, че ензимът запазва активността си.
- ✓ Получени са резултати, доказващи възможната употреба на нов метод за определяне на липоксигеназна активност, чрез измерване на електрическата проводимост на реакционната среда.

Авореферетът е изготвен на 39 страници в съответствие с установените изисквания и отразява най-значимите моменти от дисертационната работа. Включено е кратко въведение и по-задълбочено са отразени използваната методика и получените резултати и тяхната интерпретация, основните изводи, научно-приложните приноси, научните публикации и участията в научни форуми. *Аворефератът правилно отразява основните приложения и научно-приложните приноси на дисертационния труд.*

Дисертационният труд е съобразен с изискванията, заложи в Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заема на академични длъжности в ХТМУ в частта му, засягаща условията за придобиване на образователната и научна степен „доктор” и същността му съответства на професионално направление 5.11 Биотехнологии („Биоорганична химия, химия на природните физиологично активни вещества”).

Резултатите от научните изследвания в научния труд на дисертанта са отразени в 2 публикувани работи, едната от които в списание с IF и 4 участия на научни форуми. Представените работи логично отразяват получените от дисертанта резултати.

Въпроси и забележки:

След запознаването ми с дисертацията бих искала да отправя към докторанта няколко въпроса и забележки, а именно:

1. Защо като източник на липоксигеназа е избрано именно авокадо?
2. Каква е причината за плануването на имобилизиране на изолираният ензим и как са подбрани точно тези матрици?
3. Към докторанта имам следната забележка – научната специалност по която е разработена работата цитирана в авореферата се различава от тази в дисертацията. Считаю, че ще е добре да се коригира това несъответствие.
4. В работата се забелязват някои технически и граматични неточности.

Бих искала да отбележа, че забелязаните неточности са от технически характер и не намаляват постиженията на докторанта и научната стойност на извършените изследвания.

Заклучение

Дисертационният труд е посветен на актуален проблем. Изследванията са проведени на научно ниво и резултатите са със научно-приложна насоченост. По обем, цялостно оформяне и научни публикации във връзка с него дисертационният труд отговаря на изискванията за придобиване на образователна и научна степен „доктор“. Наукометричните параметри са в съответствие с изискванията на Закона за развитие на

академичния състав в Република България, Правилника за неговото прилагане и Правилника на ХТМУ – София.

Това ми дава основание да дам **положителна оценка** на дисертационният труд на тема: Изолиране и охарактеризиране на липоксигеназа от авокадо (*Persea Americana* mill.) и да препоръчам на уважаемите членове на Научното жури да гласуват положително за присъждането на инж. **Лъчезар Стефанов Мановски** на образователната и научна степен „**доктор**“ по професионално направление: 5.11. Биотехнологии; научна специалност: Биоорганична химия, химия на природните физиологично активни вещества, съгласно Закона за развитие на академичния състав в Република България.

гр. София

17.05.2019 г.

.....

/доц. д-р. Мая Георгиева/