

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р инж. Николай Иванов Калоянов, ХТМУ - София

въру дисертационен труд на тема:

"Получаване и процеси на инхибиране с участие на липоксигеназа от авокадо (*persea americana mill.*)"

за присъждане на образователната и научна степен „доктор”

на инж. Лъчезар Стефанов Мановски, редовен докторант при катедра "Биотехнология" към ХТМУ - София, по научната специалност 5.11. "Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества", с научни ръководители доц. д-р инж. Иво Лалов и проф. д-р инж. Любов Йотова.

Представеният от Лъчезар Мановски пълен комплект от документи за допускане до защита на дисертационния труд напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника към него, както и на съответните Правилници на ХТМУ - София.

1. Кратки биографични данни и научни интереси на кандидата.

Лъчезар Стефанов Мановски е роден през 1988 г. в гр. София. Завършил е Професионална гимназия по химични и микробиологични технологии "проф. П. Райков", гр. София през 2008 г. Висшето си образование получава през 2013 г. с образователната степен *магистър* по специалност „Биотехнологии” в Химикотехнологичен и металургичен университет - София с общ успех отличен (5.88).

Магистърската му теза е на тема: "Кинетични изследвания и нови инхибитори на соева липоксигеназа", разработена в катедра „Биотехнологии”. От 01. 03. 2014 г. е редовен докторант в същата катедра. Участва в изпълнението на 2 научни проекта, като единият от тях е съвместен с ИБИР - БАН.

Владее добре английски език и има добри компютърни умения. Трудовата му дейност включва стаж в редица фармацевтични предприятия: "Унифарм" АД, "Софарма" АД и Бул Био - НЦЗПБ, където работи като химик и инженер-технолог. От дисертационния труд и приложения списък с публикации и съобщения на научни форуми се вижда, че научните интереси на Лъчезар Мановски са насочени предимно в областта на изолиране, пречистване и охарактеризиране на ензимите липоксигеназа, както и на L-аспаргиназа от природни продукти.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите.

Представеният ми за рецензиране дисертационен труд е изготвен в съответствие с изискванията на ЗРАСРБ и на Правилника за прилагането му. Съдържа следните раздели: Въведение, Цели и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Заключение, Приноси, Изводи, Цитирана литература и Списък на научните публикации. Включени са и три приложения относно дисертационния труд. Представени са 2 научни публикации от които 1 е в списание с импакт – фактор; 4 доклада, изнесени на научни конференции; 9 участия в постерни сесии в страната и чужбина. Дисертационният труд е изложен върху общо 94 страници включително с приложенията и съдържа 59 фигури и 3 таблици. Цитирани са 99 литературни източника.

Във Въведението Лъчезар Мановски прави най-общ преглед относно същността на ензимите, тяхното изолиране, пречистване както и съхраняването им.

В Литературния обзор, върху 42 страници, дисертантът е изложил и анализирал ензимите оксидоредуктази – видове и действие. Описани са обстоятелствено свойствата и действието на глицералдехид – 3 – фосфат дехидрогеназата както и на полифенол оксидазата и приложението им. След това се

разглеждат в детайли ензимите липоксигенази, с което дисертантът преминава към същността на темата. Последователно са описани: структура, действието върху различни субстрати, ролята на продуктите, инхибитори и имобилизиране на липоксигеназата. В края на литературния обзор е описан и метода кондуктометрия, който от скоро е прилаган за количествено определяне на ензими. Като логично продължение на литературния преглед следва раздела Цели и задачи.

Целта на дисертационния труд е добре формулирана – да бъде изолирана, пречистена, охарактеризирана и имобилизирана върху подходящи носители липоксигеназа от авокадо. Едновременно с това ще се изследват определени вещества като потенциални нови инхибитори на ензима. За осъществяването на тези цели са формулирани пет задачи.

В раздел Експериментална част на 10 страници са представени използваните Материали и методи. Подробно са описани изолирането и пречистването на ензимът липоксигеназа от тропическият плод авокадо. Охарактеризирането му ще бъде осъществено чрез определяне на молекулната маса, белтъчното съдържание, неговата активност, оптимуми и кинетични параметри. В последствие дисертантът планира да извърши ковалентна имобилизация на ензима върху два съполимера на: TMOS, CAB, PAMAM и MTES, CAP, PAMAM. Описани са методите за изследване на кинетичните параметри на реакцията между липоксигеназата и линоленова киселина като субстрат, посредством кислородната консумация както и чрез измерване на електрическата проводимост с помощта на кондуктометрия.

Разделът Резултати и дискусия е написан на 35 страници в които са включени 19 фигури и 2 таблици. Дисертантът успешно е осъществил изолиране и пречистване на липоксигеназа от авокадо с помощта на четириетапен процес. Постигната е степен на пречистване на ензима 4,04

определена по отношение на освободения от ендогенни инхибитори изходен ензимен разтвор при добив от 23,9%. Достигната е активност на пречистения ензим от 0,202 $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$. При сравняване на характеристиките на пречистеният ензимен препарат, а именно: температурен оптимум – 40 °C, pH оптимум 6,5 и $K_m = 7,22 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, с тези на други автори цитирани в обзора, са получени сходни резултати.

В хода на експримента са открити три съединения показали инхибиране на липоксигеназата от авокадо. От тях при L-каналина се установява най-висок инхибиторен потенциал оценен според съотношението ефект:концентрация. Както при L-каналина така и при Z-серина и N-Z-L-серина реакцията на инхибиране беше характерна за такава от смесен тип.

Много актуално направление е имобилизирането на ензими с цел конструкция на биосензори, за преодоляване ензимните ограничения при което се редуцират необходимите количества ензим и се увеличава времето му на живот. Във връзка с това дисертантът е имобилизирал липоксигеназа от авокадо върху два полимерни носителя – TMOS, CAB, PAMAM и MTES, CAP, PAMAM. Вследствие от имобилизацията температурният и pH оптимуми на ензима не се променят но получените данни за ензимната активност показват значителното ѝ понижаване. Определените K_m и V_{max} стойности за имобилизираният ензим са достатъчно близки до стойностите за свободния ензим, следователно ензимът не губи активност и афинитет към субстрата – линоленова киселина.

В последната част на дисертационния труд са проучени два метода за определяне на ензимната активност и кинетични изследвания – измерване на кислородната консумация, както и на промяната в проводимостта на реакционната среда. При втория метод са получени адекватни резултати само за анализи осъществени в киселата област (pH 6,5).

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд.

Авторефератът е в обем от 38 страници. Изготвен е съгласно изискванията и правилно отразява основните положения, включително целта, задачите, същността и получените резултати и изводите на дисертационния труд.

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд.

Приемам представените в дисертационния труд 3 броя приноси като отразяващи същността на постигнатото от дисертанта. По мое мнение, те могат да бъдат определени като научно-приложни. Считам, че основни приноси на дисертационния труд са:

- проучена е кинетиката на инхибиране на реакцията катализирана от липоксигеназа от авокадо в присъствието на 3 инхибиторни съединения.

- ензимът е имобилизиран върху два полимерни носителя при което запазва активността и афинитета си към субстрата – линоленова киселина.

- предлага се нов метод за определяне на ензимната активност на липоксигеназа посредством измерване електрическата проводимост на реакционната среда.

5. Критични бележки и коментари

Към дисертанта, без да споменавам неизбежните за случая печатни и технически грешки, имам и някои забележки:

1. Представеният литературен обзор е ненужно голям по обем в сравнение с обема на дисертационния труд.

2. В една от публикациите, въпреки големият авторски колектив, се забелязват някои нелогични резултати – различия в стойностите на един и същ параметър представен графично и допълнително описан в текста на статията.

3. Предвид относително ниските количества на имобилизиран ензим върху единица носител би било полезно да се оптимизира метода на имобилизация, така че да се получи система ензим – носител с по-висока активност.

Заключение

След запознаване с представените материали по дисертационния труд и вземайки предвид представените в него научно - приложни резултати и тяхната актуалност, давам положителна оценка. Дисертацията на инж. Лъчезар Стефанов Мановски отговаря на условията на ЗРАСРБ и на Правилника за прилагането му за кандидатстваната степен. Имайки предвид всичко гореизложено, предлагам на Почитаемите членове на научното жури да дадат положителна оценка за присъждане на образователната и научна степен "доктор" на редовния докторант Лъчезар Мановски при катедра "Биотехнология" към ХТМУ - София по научната специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества).

30. 05. 2019 г.

София

Изготвил рецензията:

/доц. д-р инж. Николай Калоянов /