

СТАНОВИЩЕ

относно дисертационен труд на тема: **„Изолиране и охарактеризиране на липоксигеназа от авокадо *Persea americana* Mill.”**

представен от **инж. Лъчезар Стефанов Мановски**

за присъждане на образователна и научна степен „**доктор**” по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества).

от доц. д-р Иво Георгиев Лалов, катедра „Биотехнология”, ХТМУ-София

Съвременните тенденции в развитието на биокатализата се определят от изследвания в редица актуални направления като, например, проучване на специфичните характеристики на ензими, изолирани от различни източници или търсене на подходи за преодоляване на тяхната присъща лабилност и превръщането им в биокатализатори с подходящи технологични качества. От друга страна познанието за биохимичните механизми на редица заболявания открива възможности за тяхното лечение посредством блокиране на определени биохимични пътища с помощта на специфични ензимни инхибитори. Търсенето на подобни инхибитори с потенциално фармацевтично приложение съответно представлява още едно направление определящо развитието на съвременната ензимология.

В своя дисертационен труд докторанта Лъчезар Мановски си поставя като основна цел да изследва характеристиките на изолирана от авокадо липоксигеназа като проучи възможностите за създаване на ефективна биокатализаторна система посредством имобилизацията на ензима върху подходящи носители. Едновременно с това, допълнителна цел на работата, е установяването на инхибиторен ефект по отношение на липоксигеназата на някои съединения с потенциално фармацевтично приложение. Дефинираните по този начин цели определят както актуалността така и същественото практическото значение на предложеното изследване.

Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите.

Представеният ми за становище дисертационен труд е структуриран правилно като общият обем от 94 страници е разпределен между няколко основни раздела: Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и дискусия, Заключение, Приноси Изводи, и Литература. Приложени са списък на публикациите на докторанта, както и списъци на използваните съкращения, таблиците и фигурите в дисертацията. Изследването е сполучливо онагледено с помощта на разнообразен илюстративен материал представен на 59 фигури и 3 таблици. Цитирани са 99 използвани източника.

Структурирането на Литературният обзор свидетелства както за добрата информираност на докторанта така и за неговата способност критично да анализира обобщава и систематизира значителна по обем разностранна научна информация. В началото на обзора обстойно са представени биохимичната роля и структурните особености на ензима, разгледани са неговите потенциални източници, изоформи и субстрати. Отделно са дискутирани проблемите свързани с адекватното определяне на липоксигеназната активност. Във втората част са обсъдени принципите и типовете на ензимното инхибиране, като е отделено специално внимание на различните групи доказани природни и синтетични инхибитори на липоксигеназата както и на съединения с възможно инхибиращо въздействие върху нея. В заключителната част на обзора е предложена резюмирана информация по въпросите на ензимната имобилизация както и на използването на кондуктометрията като аналитичен инструмент в областта на ензимологията. Като цяло, макар и доста обширен, разделът е добре балансиран и демонстрира комплексната и задълбочена осведоменост на докторанта по отношение на всички основни аспекти на научните изследвания свързани с темата на неговата разработка.

В резултат на сполучливо направените изводи от литературния обзор, по достатъчно коректен и прецизен начин, са формулирани целта и конкретните задачи на дисертационният труд. Използваните при изследването аналитични методи и апаратура са достатъчно съвременни и осигуряват най-общо постигането на поставените задачи. В разделът „Материали и методи” подробно са описани аналитичните техники и лабораторните инсталации, с чиято помощ са реализирани различните етапи на изследването.

Централният раздел на дисертацията „Резултати и дискусия” предлага изложение на получените в хода на изследването експериментални резултати по начин илюстриращ достатъчно нагледно хода, логиката и общия смисъл на цялостната разработка. Тези резултати са придружени от аналитична дискусия, чиято ценност се определя не на последно място и от представените подходящи сравнения с резултатите постигнати от други автори в хода на аналогични съвременни изследвания.

В началната фаза на проучването е осъществено четириетапно изолиране и пречистване на липоксигеназа от предварително избран сорт авокадо. Предвид ниският краен добив е направен разумен извод за необходимостта от оптимизиране на процедурата. Едновременно с това успешно пречистения ензимен препарат позволява последващо охарактеризиране на ензима, което в крайна сметка напълно удовлетворява изискванията свързани с постигането на поставената пред изследването цел. В хода на определянето на основните характеристики на ензима като: молекулна маса, рН и температурен оптимуми както и на някои кинетични параметри като K_m и V_{max} са получени резултати в голяма степен аналогични на тези

докладвани от други автори при изследването на същия ензим изолиран от подобни източници. Следващият етап от изследването е насочен към търсене на инхибиторни съединения с възможно фармацевтично приложение. Като резултат от тези изследвания е установено, че три от анализирания съединения (Z-серин, N-Z-L-серин метилов естер и L-каналин), демонстрират инхибиращо действие върху изолирания ензим. При това е отбелязана необходимостта от допълнителни изследвания за установяване на конкретния тип на инхибиране.

По-нататък е осъществен опит за създаване на биокатализаторна система с подходящи технологични характеристики посредством имобилизацията на ензима върху две полимерни матрици (TMOS,CAB,PAMAM и MTES,CAP,PAMAM). Новополучените биокаталитични системи са охарактеризирани по отношение на няколко параметъра аналогични с тези определени по-рано за свободния ензим. Като основно преимущество на новите биокатализатори може да бъде отбелязана тяхната повишена устойчивост, а основен недостатък е очевидно ниската относителна активност.

Финалният етап на изследването, е посветен на опити да бъдат преодолените недостатъците на използвания при определянето на ензимната активност спектрофотометричен метод посредством прилагането на алтернативни подходи за решаване на този проблем. Получените резултати демонстрират сериозният потенциал на изследваните методи, а именно консумация на кислород и кондуктометрия, да служат като основа при разработването на проста и надеждна процедура за адекватно определяне на липоксигеназна активност или изследване на ензимна кинетика. Едновременно с това те разкриват и необходимостта от значителното количество допълнителни изследвания необходими за създаването на подобен нов метод за определяне на ензимна активност.

Краткото по обем, но достатъчно обобщаващо заключение както и направените изводи допълнително подчертават смисъла и стойността на осъщественото изследване.

Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд.

Представеният от докторанта автореферат е в обем от 39 страници като в него са включени увод, целта и задачите на изследването и използваните материали и методи. Авторефератът съдържа също така основните резултати на дисертационния труд, тяхното обсъждане, направените изводи и приносите на дисертационния труд. Включен е списък на свързаните с изследването публикации. Така, авторефератът отразява съдържанието на дисертационния труд адекватно и в достатъчна степен като напълно удовлетворява изискванията за неговото изготвяне.

Мнение за публикациите на дисертанта по темата на дисертационния труд.

Резултатите от изследванията в дисертационния труд за представени в 2 научни публикации като една от тях е в научно списание с имакт фактор (*Bulgarian Chemical Communications, Special Edition E*, 2017, 107-112), а другата в *Journal of Chemical Technology and Metallurgy* – реферирано списание (SJR – 0.331 за 2017). Допълнително, част от резултатите са представяни под формата на устни доклади на национални и международни научни конференции както и посредством участие в няколко постерни сесии. По този начин публикационната дейност на докторанта удовлетворява изискванията на чл.11 (4) от ППНСЗД на ХТМУ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”.

Лични впечатления за докторанта.

Познавам Лъчезар Мановски от периода на неговото обучение първоначално в бакалавърската, а след това и в магистърската степени на специалност „Биотехнологии” на ХТМУ. В ролята си на преподаващ три различни лекционни курса съм имал многобройни възможности лично да се убедя както във високото ниво на неговата теоретична подготовка, така и в умението му да прилага получените знания на практика.

Впоследствие имах възможност да наблюдавам неговото развитие както в научно така в образователно отношение от две различни позиции, от една страна като част от колектива на катедра „Биотехнология” и по-късно като негов научен ръководител. Това ми даде възможност не веднъж да се убедя в неговото трудолюбие, дисциплина и стремеж към разширяване и задълбочаване на сферите му на компетентност, както в научно така и в образователно отношение. Подобни качества и нагласа както и демонстрираната от него способност за бързо и точно усвояване на нови знания и практически умения, несъмнено изиграха ролята на решаващ фактор, който му позволи да се справи успешно едновременно с научно-изследователската и със значителна по обем и разнообразие преподавателска дейност. За периода на своята докторантура Лъчезар се доказва като обещаващ млад учен проявяващ самостоятелност, инициатива и находчивост при дефинирането и разрешаването на научни и изследователски проблеми от различен характер. Накрая, заслужава да се отбележат неговите безспорни адаптационни способности както и уменията му за работа в колектив.

Всичко това ми дава основание да твърдя, че инж. Лъчезар Мановски притежава необходимите личните качества и професионална подготовка за успешна реализация в научно-изследователската област.

Заключение.

В заключение, считам, че представеният дисертационен труд е доказателство за успешното развитие на докторанта както в образователно така и в научно отношение.

В процесът на планиране, подготовка и провеждане на значителния брой експерименти, както и при интерпретиране на получените резултати докторантът е задълбочил теоретичната си подготовка в редица научни области, свързани с обекта на дисертацията. Едновременно с това той е придобил и ценни умения свързани с усвояването и прилагането на редица лабораторни техники и методи широко използвани в съвременната изследователска практика.

Считам, че по актуалност, обем на изследванията, постигнати научни приноси както и публикационна дейност, дисертационният труд удовлетворява изискванията на ЗРАСБ за придобиване на образователната и научна степен „Доктор”.

Всичко изложено до тук ми дава основание да предложа на почитаемото Научно жури да присъди на инж. Лъчезар Стефанов Мановски образователната и научна степен „Доктор” по научна специалност 5.11. Биотехнологии (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества).

София, 29.05.2019г.

Автор на становището:

Доц. д-р И. Лалов