

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Георги Тодоров Добрев
Университет по хранителни технологии, гр. Пловдив

относно дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
в научна област 5. **Технически науки**, професионално направление 5.11. **Биотехнологии**,
докторска програма по „**Технология на биологично активните вещества**“

Автор: Юрий Михайлов Стойков

Тема: „Получаване, пречистване и характеристика на микробни хитинази“

Научни ръководители: чл.-кор. проф. д.т.н. Атанас Иванов Павлов,
проф. д.т.н. Алберт Иванов Кръстанов

1. Актуалност на тематиката

Изследванията в представения ми за рецензиране дисертационен труд са насочени към оптимизиране на някои условия за получаване на хитиназа от нови микробни продуценти и разработване на методи за пречистване на ензима с цел определяне на биохимичните му характеристики.

До настоящия момент хитиназите нямат широко приложение в промишлеността, медицината и ензимните аналитични методи, поради което тяхното получаване в промишлени условия е ограничено. От друга страна, хитинът е вторият по разпространение полизахарид на земята след целулозата, който генерира значителни количества органичен субстрат. Ензимната хидролиза на хитин може да бъде основа за получаване на биогорива или микробна биомаса, а в последните години интерес представлява получаването на водоразтворими хитин- и хитозан-олигозахариди с антимикробно, антитуморно и противовъзпълително действие. Като се вземе предвид това и познатото до момента приложение на хитиназите като биофунгицид срещу фитопатогени, може да се обобщи, че изследванията в дисертационния труд са актуални от гледна точка на световната тенденция за разработване на „еко“ и „зелени“ технологии.

Темата на дисертационния труд е новаторска и актуална с възможност за реализиране на иновации в областта на микробното получаване на хитиназа и обогатяване на теоретичните знания за механизма на действие и специфичните характеристики на ензима.

2. Познаване на проблема

В литературния обзор докторантът прави подробен анализ на известната информация относно микробната биосинтеза на хитиназа, методите за изолиране и пречистване на ензима и основните биохимични характеристики на микробните хитинази. Материалът в този раздел е онагледен с 3 таблици и 8 фигури.

От представената информация става ясно, че основните микробни продуценти на хитиназа са бактерии и плесени, като процесите за получаване на ензима са традиционните дълбочинно или твърдофазово култивиране. Обобщена е информация за влиянието на състава на хранителната среда, както и на някои условия на култивиране върху биосинтеза на хитиназа от микробни продуценти. Отделено е внимание на различните аналитични методи за анализ на хитиназна активност, което е предпоставка за достоверност и сравнимост на резултатите. Като цяло, фактологическият материал е актуален и коректно представен. При написването на дисертационния труд са цитирани общо 178 научни публикации.

3. Методика на изследването

При разработването на дисертационния труд, докторантът е използвал голям брой микробиологични, молекулярно-биологични и инструментални методи за анализ. Овладял е методи за определяне на ензимна активност, както и съвременни методи за изолиране и пречистване на ензими. Докторантът е придобил нужните практически опит и знания за провеждане на научни изследвания на съвременно ниво.

4. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е написан на 166 страници. Съдържанието е правилно структурирано в следните раздели: Въведение (1 стр.), Литературен обзор (23 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (23 стр.), Резултати и дискусия (59 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.), Литература (13 стр.).

Докторантът е извършил целенасочена експериментална работа, която е отразена коректно, а опитните резултати са онагледени с 26 таблици и 67 фигури. Получените резултати са аргументирано дискутирани и критично сравнени с резултатите от достъпната литература.

Основни приноси на дисертационния труд са:

1. За първи път е изолиран плесенен продуцент на хитиназа от вид *Petromyces alliaceus*.
2. Изолиран е нов шам-продуцент на хитиназа от бактериален произход, който е идентифициран като *Bacillus thuringiensis*.
3. Разработен е метод за микробно получаване на хитиназа, при който за първи път са използвани системи с временно разбъркване тип RITA.
4. Изолирана е високо пречистена бактериална хитиназа и са определени основните биохимични и кинетични характеристики на ензима, продуциран от *Bacillus thuringiensis* C27/5.
5. Доказано е фунгицидното действие на изолираната хитиназа от *Bacillus thuringiensis* C27/5 спрямо плесени от род *Alternaria*.

5. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Резултатите от дисертационния труд са оформени в 3 публикации. Една в научно списание с импакт фактор и 2 в сборници от престижни международни научни конференции в чужбина. В две от публикациите докторантът е водещ автор, което показва значителния му личен принос.

6. Препоръки и въпроси

Изброените препоръки и въпроси по-долу по никакъв начин не подлагат на съмнение високото качество на дисертационния труд, а имат за цел да открият по-пълно научните и научно-приложните постижения на дисертацията.

Имам следните въпроси и препоръки към докторанта:

1. Не става ясно защо и как хитиназната активност в твърдата фаза при култивирането на плесенния продуцент е изразена в IU/ml (фиг. 6 и 18)? Не са описани условията за извличане на ензима от твърдата фаза.

2. В матриците на проведените планирани математически експерименти не са представени опитни данни, което вероятно е техническа грешка, но представлява значителен пропуск, който при бъдещи публикации трябва да се отстрани. Липсва анализ на значимостта на регресионните коефициенти и на адекватността на изведените математически модели. При провеждане на пълен факторен експеримент коефициент от типа $X_1.X_1$ (стр. 75 и 77) не може да бъде оценен.
3. Известно ли е до момента за разделяне на протеини да се използва йонообменна хроматография с едновременно елуиране с градиент на рН и градиент на йонната сила на елуента (стр. 115) и какви са предимствата от приложението на този подход?
4. Разделянето в две фигури на хроматограмите, в едната от които е представен елуационният профил на белтъците, а в другата ензимната активност затруднява интерпретацията на резултатите. Освен това в хроматограмите от йонообменната хроматография не е показан графично градиента на рН.
5. При йонообменна хроматография не може да се говори за празен обем на колоната!
6. Как ще обясните, че пикът на хитиназна активност на фиг. 42 и 44 се проявява при елуиране на несвързаните белтъци от колоната? В текста е обяснено, че елуирането с градиент на рН се извършва 40-60 min, след което започва елуиране с градиент на концентрацията на NaCl, а пикът на ензимна активност е около 30^{-та} min.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и съответния Правилник на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН.

Дисертационният труд показва, че докторантът притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност **„Технология на биологично активните вещества“**, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено в рецензираните дисертационен труд, автореферат и научни публикации. Предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен **„Доктор“** на **Юрий Михайлов Стойков** в научна област 5. Технически науки, професионално направление 5.11. Биотехнологии, докторска програма по **„Технология на биологично активните вещества“**.

15.03.2018 г.

Изготвил становището:
/доц. д-р Георги Добрев/