

РЕЦЕНЗИЯ

**Върху дисертационен труд на Мариана Манолова Николова
на тема „Получаване и характеристика на биологично-активни
пектинови полизахариди от праз (*Allium porrum*)**

**от Лаборатория по биологично-активни вещества-Пловдив
към БАН- Институт по Органична Химия със център по
Фитохимия**

**рецензент: Проф. дбн Милка Кръстева
ХТМУ-София**

Пектинът е природно разпространен полизахарид, който в последните години придобива все по-голяма значимост и приложение. Този нарастващ интерес към него се дължи, от една страна на неговата биоразложимост и от друга на неговите гелообразуващи свойства, които позволяват приложението му в хранителната и фармацевтична промишленост.

Най-общо пектиновите вещества присъстват в растителната клетъчна стена, където участват в комплексни физиологични процеси, като клетъчен растеж и клетъчна диференциация и така определят цялост и твърдост на растителната тъкан. Те също така играят важна роля в защитните механизми срещу патогени и наранявания. Поради анионната природа на пектиновите полизахариди се счита, че те са включени в йонния транспорт и поръзност на клетъчната стена и по такъв начин осъществяват контрола на проникване на ензими, както и в поддържане на водния капацитет.

Дисертационният труд е посветен на изследване на пектиновите полизахариди на праза и техните биологично-активни свойства, като важни структурни елементи на растителната клетъчна стена на праза. От такава гледна точка изследването на докторантката Мариана Николова е важно и интересно, а получените резултати, показват че то е дисертабилно.

Докторският труд е написан на 146 страници. Той е структуриран по обичайния начин включващ литературен обзор, цели и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, изводи и литература. Литературният обзор е изложен на 30 страници, а в литературата са цитирани 250 източника. В него са разгледани основните структурни елементи на праза, като нискомолекулни биологично-активни съединения, между които са органични серни съединения, сапонини, фенолни съединения, витамини, минерали, захари и полизахариди. Особено място е отделено на самия пектин и негови полизахариди, тяхното изолиране и изследване. В резултат на подробното литературно проучване върху пектиновите полизахариди от различни растения и тяхните свойства, като имуностимулатори, благоприятното им влияние върху храносмилателната система и редица други фармакологични активности, докторантката формулира целта на дисертационната си работа, да изолира и охарактеризира пектинови полизахариди от праз, както по отношение на тяхната структура, така и на биологичната им активност. Описани са основните методи за изолиране, пречистване и характеристика на изследваните съединения. Разделът Резултати и обсъждане е разделен на 5 части: 1-пектинови полизахариди от праз, получени чрез последователно фракционно екстрахиране; 2-изолиране и характеризиране на пектинови

полизахариди от праз, чрез последователно екстрахиране с вода и солна киселина; 3-хроматографско пречистване и разделяне на полизахариди от праз, получени чрез последователно екстрахиране с вода и разрежена солна киселина; 4-Ензимно разграждане на полизахариди получени от праз; 5-Приложение на свеж праз за получаване на функционални храни;

В първите 4 раздела се описва изолиране на пектинови полизахариди, тяхното пречистване и охарактеризиране. За целта са намерени екстрагенти и условия за тяхното изолиране. Най-напред е разработена груба схема с различни екстрагенти-неутрални, кисели и алкални и от получените данни са подбрани тези, които сочат най-малко промени в структурата на полизахаридите. Предвид на получените данни за добив, монозахариден състав и др. характеристики, е подбран метод за екстракция, състоящ се в първоначална водна екстракция, последвана от такава с разрежена солна киселина. Двете фракции се характеризират с високо съдържание на галактуронова киселина, характерна за пектиновите молекули, както и по-ниско съдържание на глюкуронова, която не е открита досега в лукови зеленчуци в основната пектинова верига. Намерено е високо съдържание на галактоза, която вероятно е основна верига в разклоненията на полигалактуроновия скелет на пектиновия полизахарид. Двете фракции съдържат и белтъчна част в сравнително високи количества. Определянето на молекулната им маса показва, че водно екстрахираната фракция е хомогенна и има мол.маса 1100 kD, докато тази екстрахирана със солна киселина, съдържа 3 фракции, като най-голямата е с мол.маса 950 kD. Тези фракции показват също така съдържание и на белтъчна част, в която се доказват и в двете фракции определен брой аминокиселини, като Асп,

Глу, Арг, Лиз, Сер и др. Изследването на биологични свойства на изследваните полизахари показват, че те имат изразена имуностимулираща активност, както и способност за инхибиране на бактериите и отделянето на техните токсини, както и др. стимулиращи защитата на клетката биологични свойства. С оглед на по-детайлно изучаване на двете фракции и изследване на връзката структура-функция, те са подложени на допълнително пречистване. След нанасяне върху колона от DEAE-Sephagrose отделните фракции след това се елуират градиентно с ацетатен буфер. Водно екстрахираната фракция, отново показва хомогенност с високо съдържание на галактуронова и глюкуронова киселини, както и преобладаващ монозахарид от галактоза. Количеството на белтък обаче е силно понижено. Другата фракция, показва отново три компонента, като единият от тях няма наличие на глюкуронова киселина. По-нататък е проведено и допълнително пречистване върху Sephadex G – 200. Пречистената водно-екстрахирана фракция показва висока хомогенност и висока молекулна маса, както и значително по-висока имуностимулираща активност, в сравнение с изходните полизахаридни фракции. Приложени са и подходи за отстраняване на белтъка от полизахаридите с помоща на протеолитични ензими. Обработката с химотрипсин и проназа води до значително понижение на белтъчната част. Отстраняването на белтъчната компонента не оказва съществено влияние върху биологичната активност. В противоположност на това, разрушаването на основната структура и разклоненията с помоща на ензими хидролизиращи глюкозидна връзка, води до силно редуциране на биологична активност. Това налага извода, че максимална

биологична активност притежава комбинацията от рамногалактуронан и неутрални олигозахаридни странични вериги.

В последния пети раздел е направен анализ на свеж праз по отношение на различни важни компоненти, както и на хранителни пюреа приготвени с участие на праз.

Научните приноси в това изследване виждам в едно детайлно изследване на два пектинови полизахариди, както по отношение на състав и структура, така и по отношение на биологична активност. Водно-екстрахираният и пречистен пектинов полизахарид показва най-висока степен на инхибиране на хемолизата. Галактаните са преобладаващи странични вериги на рамногалактуронана в праз, а връзката между отделните галактозни остатъци е β -(1-4). Намерено е също така, че галактаните в праза са носители на антикомплементарната активност. Присъствието на пептидна част не оказва влияние върху изследваната активност. Предвид на оскъдните данни в литературата за връзката между белтък и полизахаридна верига в пектиновите вещества може да се предполага, че тя се осъществява по подобие на тази в гликопротеините т.е. чрез O- връзка със серин или N-връзка с глутамин, още повече, че такива аминокиселини са намерени след третиране с ензими. Наличието на глюкуронова киселина, наред с галактуронова очевидно има важно значение и вероятно тя кодира определени свойства.

Изследванията на докторантката са публикувани в едно международно списание с импакт фактор и едно българско също с импакт фактор, както и още 3 статии в български списания. Докторантката е участвала с постери в 2 международни и 2 български конференции. Била е ръководител на един младежки проект, финансиран от МОН, както и

участник в друг проект, финансиран от Министерството на икономиката и енергетиката.

Намерени са и два цитата върху статията, публикувана в чужбина.

Прави много добро впечатление, че докторантката е взела под внимание почти всички забележки, направени на предварителното обсъждане на дисертацията. Смятам, че ензимната хидролиза с имобилизиран химотрипсин би била по-ефективна ако се извършва при по-високо рН напр. 8.5-9.

Мариана Николова, разработвайки дисертацията е имала възможност да се запознае и усвои много нови методи за изследване и анализ на полизахариди и белтъци и да използва съвременна апаратура, както и да се учи от ерудицията на ръководителката си доц. М.Крачанова, която има голям опит и изследвания в областта на пектиновата химия и приложения на пектинови продукти и други биологично-активни съединения.

Авторефератът отговаря на съдържанието на дисертационния труд и е направен много добре.

В заключение смятам, че предложената дисертация притежава качества на научно изследване с определени научни приноси, поради което напълно отговаря на изискванията на закона за присъждане на докторска степен. Предвид на това предлагам на почитаемото Научно Жури да присъди научната степен **доктор** на Мариана Манолова Николова.

28.05.2012

Рецензент

Проф.дбн М.Кръстева