

## Авторска справка на приносите на научните трудове

на гл. ас. д-р Мая Христова Гунчева

за участие в конкурс за доцент по професионално направление 4.2 Химически науки: научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества” за нуждите на лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими”

За участие в конкурса е приложен списък с **21** научни трудове, извън който са публикациите (**22–24**) от дисертацията за образователната и научна степен „доктор”. Научните трудове за конкурса (**21**) са публикувани както следва – в списания с импакт фактор (ИФ<sub>година</sub>; брой): *J. Mol. Cat. B: Enzym.* (**2.101**<sub>2007</sub> (1 бр.), **3.021**<sub>2011</sub> (1 бр.), **2.158**<sub>2014/2015</sub> (3 бр.)); *Process Biochem.* (**3.032**<sub>2011</sub>; 2 бр.); *Catal. Commun.* (**3.141**<sub>2009</sub> (1 бр), **3.307**<sub>2011</sub> (1 бр.)), *J. Am. Oil. Chem. Soc.* (**1.504**<sub>2008</sub>; 1 бр.), *Biotechnol. Lett.* (**1.595**<sub>2008</sub>; 1 бр.), *World J. Microbiol. Biotechnol.* (**1.233**<sub>2008</sub>; 1 бр.), *FEBS J.* (**3.101**<sub>2009</sub>; 1 бр.), *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* (**1.614**<sub>2011</sub>; 1 бр.), *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* (**0.379**<sub>2013</sub>; 1 бр.), *Chem. Eng. J.* (**4.577**<sub>2014</sub>; 1 бр.), *RSC Adv.* (**3.84**<sub>2014</sub>; 1 бр.), *J. Food Biochem.* (**0.853**<sub>2015</sub>; 1 бр.), *Int. J. Biol. Macromol.* (**2.858**<sub>2015</sub>; 1 бр.); в материали от симпозиуми – *Proceedings of the 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium* - 2 бр. До м. януари 2016 г. са забелязани общо **161** цитата, от които **138** са на публикациите извън тези, включени в дисертацията за ОНС „доктор”.

Всички научни трудове представени за участие в конкурса са в областта на биоорганичната химия, и по-специално в областта на биокатализа и протеиновата химия.

Основните научни приноси на изследователската работа могат да бъдат обобщени тематично в следните направления:

## **I. Изследвания върху механизма и специфичността на търговски ензими с индустриално значение и на новоизолирани ензими.**

Работата по това направление е продължение на изследванията извършени по време на разработване на дисертационния ми труд, който включваше изследвания върху субстратната специфичност на новоизолирана неутрална протеаза от *Saccharomonospora canescens* (П№22) и изследвания върху ензим-субстратните взаимодействия в нуклеофилния подцентър на пеницилин G ацилаза от *E. coli* (П№24).

Обобщавайки резултатите получени при прилагането на комбиниран подход, включващ кинетични експерименти с моделни субстрати и молекулно моделиране, за пеницилин G ацилаза от *E. coli* за пръв път беше изказана хипотеза, че в зависимост от вида на заместителите на напускащата група са възможни два алтернативни пътя на свързване на субстратите с участието на единия от двата или и на двата аргинилови остатъка (ArgA145, ArgB263), участващи в изграждането на субстрат-свързващия подцентър (П№24). Фундаменталните изследвания в тази насока бяха продължени като са подбрани и синтезирани още моделни субстрати (серия фенилацетил-*p*-заместени анилиди) на пеницилин G ацилаза, проведени са кинетични изследвания и са потърсени корелации между изчислените скоростните константи и различни параметри, характеризиращи напускащата група (П№5, П№6). Посредством теоретичен модел беше илюстрирана реорганизацията на мрежата от водородни връзки в активния център на G ацилаза от *E. coli*, предопределяща каталитичните трансформации и беше изяснен приноса за катализа на няколко функционални групи в близкото обкръжение на каталитичния център (SerB1, атакуващ нуклеофил) (П№5). За катализираната от пеницилин G ацилаза хидролиза на фенилацетанилиди беше наблюдавана нетипична (трисегментна) Хаметова зависимост, което вероятно се дължи на смяна на скоростоопределящия етап или промяна на реакционния път в зависимост от структурата на субстрата. При изследване на същата серия от субстрати, за катализираната от пеницилин G ацилаза *Alcaligenes faecalis* реакция на хидролиза беше установено, че скоростните константи корелират с Хаметовите константи  $\sigma_p^-$  и  $\sigma_p$ , но зависимостта на  $\log(k_{cat,R}/k_{cat,H})$  от  $\sigma_p^-$  е двуфазна. При този ензим,

ацилирането е скоростоопределящ етап, също както и при ензима изолиран от *E. coli*, но реакцията е по-малко чувствителна към ефекта на заместителя в напускащата група, което вероятно се дължи на по-силни вътрешномолекулни взаимодействия, които маскират ефекта на заместителя върху разпределението на електронната плътност в молекулата на субстрата, например по-висока киселинност на протонираната  $\alpha$ -аминогрупа на атакуващия нуклеофил (SerB1), която протонира напускащия анилин (П№6). Беше направено заключение, че нуклеофил-свързващите подцентрове се различават не само по форма, но и по химичен характер. При ензима от *Alcaligenes faecalis*, за разлика от този продуциран от *E. coli*, за всички субстрати скоростоопределящия етап е разпадането на тетраедричния интермедиат, което протича през синхронно разкъсване и образуване на връзки и формирането на заряд при азота на напускащата група не е благоприятствано.

Експерименталните кинетични и теоретични изследвания, проведени с пеницилин G ацилази от два различни микробиални източника имат принос към изясняване на механизма на ензим-катализирана хидролиза на неприродни субстрати и е от полза при дизайна и подбора на целеви структурите при получаване на нови антибиотици и оптимизиране на условията за ензим-катализиран им синтез.

Друго изследване в това направление беше фокусирано към дизайна и синтеза на нови инхибитори на панкреатичната липаза (П№9). Инхибирането на този ензим е в основата на най-ефективната стратегия за борба със затлъстяването. Основен проблем при разработването на лекарства на основата на инхибитори на панкреатична липаза е трудното удовлетворяване на изискванията за селективност, ниска токсичност и ниски константи на инхибиране, затова понастоящем има одобрен само един такъв медикамент (Орлистат, Ксеникал). Макар, че много съединения инхибират липазите те не са селективни за този ензим, поради близко сходство на каталитичните центрове и респективно, еднакъв каталитичен механизъм, на липазите и сериновите протеази. След анализ на съществуващата литература и като е взета предвид кристалографската структура на панкреатичната липаза бяха подбрани и синтезирани серия съединения, 4-алкиламино-2-етоксицикобут-3-ен-1,2-диони. Бяха проведени кинетични експерименти и анализа показва, че едно от предложените съединения, а именно 4-хексадециламино-производното, в

условията на проведения тест, проявява инхибиторна активност съизмерима с тази на използвания като стандарт Орлистат.

## **II. Получаване на нови хибридни материали на основата на биокатализатори с важно за индустрията значение.**

Във фокуса на три проекта с мое участие, на един от които бях ръководител, а друг беше спонсориран от индустрията бяха изследвания върху повишаването на стабилността и хидролитичната и/или естеразна активност на липази от различен произход.

Кратко обобщение на основните резултати и постижения по темата:

1. За пръв път е изследвана активността и специфичността на новоизолирана от термофилен щам липаза от *Bacillus stearothermophilus* MC7 (липаза MC7) в реакция на естерификация (П№2, П№7, П№4, П№12). MC7 липазата беше стабилизирана чрез имобилизация върху диетиламиноетил-целулоза (DEAE-MC7), полипропилен (PP-MC7), наноразмерен калаен диоксид ( $\text{nanoSnO}_2$ -MC7), хитозан и полиуретан. Беше установено, че DEAE-MC7 проявява забележителна термостабилност и при нагриване в продължение на 50 дни при 60 °C в безводна среда запазва 50% от активността ( $\tau_{1/2}$ , време на полуживот) (П№2), докато PP-MC7 запазва до 60% от своята първоначална активност при нагриване до 75°C за 1 час и проявява забележителна толерантност и повишена стабилност към 25 различни органични разтворителя или смес от органичен разтворител и вода в сравнение с неимобилизираната MC7 липаза (П№12). Получените от нас препарати на имобилизирана MC7 липаза са отлични катализатори в реакции на синтез на високомолекулни естери, но проявяват умерена активност и недобра селективност в реакции на ацидолиза на триглицериди и дълговерижни и средноверижни мастни киселини и не са подходящи биокатализатори за синтез на структурирани триглицериди.

2. Синтезирани са дванадесет високомолекулни естера с липаза от *Candida rugosa* имобилизирана върху порест полипропилен (PP-CRL). Всички съединения са получени за

кратко реакционно време (10ч) и с отлични добиви (95,8 - 100%). Биокатализаторът показва добра операционна стабилност, като след провеждането на осем последователни реакции в среда от хексан при награване (50°C) беше утновено запазванене на 83% от първоначалната активност на PP-CRL (П№3). Иммобилизацията на липаза от *Candida rugosa* върху полиутетан (PU-CRL) доведе получаването на по-активен препарат и времето за синтез на цетил палмитат (високомолекулен естер) при същите високи добиви беше съкратено наполовина (5ч), а също така беше запазена и операционната стабилност на биокатализатора. Новият биокатализатор (PU-CRL) се характеризира със забележителна толерантност към различни органични разтворители (П№4).

За пръв път беше изследван потенциала на носители на основата на наноразмерен калаен диоксид и циркониев оксид като материали за стабилизация на протеини, в случая ензими (П№10, П№11, П№12, П№13, П№14, П№15). При еднакви тестови условия беше установено, че специфичната активност на иммобилизираната върху наноразмерен калаен диоксид ( $\text{nanoSnO}_2$ ) липаза от *Candida rugosa* е осем пъти по-виока от тази на ензима адсорбиран върху полиуретан, което говори за допълнителна активация на ензима в следствие на конформационни промени на протеиновата молекула, индуцирани при контакта й с носителя. Освен това, при инкубиране в алкална среда (pH 10)  $\text{nanoSnO}_2$  съхранява около 45% от активността на иммобилизирана върху него липаза от *Candida rugosa* (CRL). За сравнение ще добавя, че иммобилизиран върху други носители (органични и неорганични) при същите условия ензимът е напълно дезактивиран.  $\text{NanoSnO}_2$ -CRL проявява висока активност и в реакция на синтез на изоамилов ацетат (аромат на банан), като добива на целевия продукт е около 82% за 2ч, което показва и добрата стабилност на разработения биокатализатор в присъствие на късоверижни алкохоли и киселини, което е едно значимо постижение за липазите (П№10). Интересно е да се отбележи, че друг синтезиран и изследван от нас наноразмерен носител – циркониев диоксид също предизвиква съществени конформационни промени в молекулата на липаза от *Candida rugosa*, в резултат на което беше получен биокатализатор,  $\text{nanoZrO}_2$ -CRL, с много по-висока енантиселективност в реакция на ацилиране на (+/-)-ментол (П№15).

3. Получени са нови биокатализатори на основата на иммобилизирана върху функционализиран с аминогрупи- ( $\text{NH}_2$ - $\text{nanoSnO}_2$ -RhD) и нефункционализиран ( $\text{nanoSnO}_2$ -

RhD) наноразмерен калаен диоксид липаза от *Rhizopus delemar*. NanoSnO<sub>2</sub>-RhD и NH<sub>2</sub>-nanoSnO<sub>2</sub>-RhD проявяват много добра операционна стабилност съответно в реакции на естерификация на късоверижни киселини и акохоли и при разделяне на рацемична смес от на (+/-)-ментол (П№11, П№13). Беше установено, че липазата от *Rhizopus delemar* имобилизирана върху nanoSnO<sub>2</sub> е проявява 150 пъти по-висока специфична хидролитична активност в сравнение с тази адсорбирана върху най-масово използвания неорганичен носител, а именно силициев диоксид – SBA-15. Вероятно nanoSnO<sub>2</sub> благоприятства закрепянето на молекулите на липазата от *Rhizopus delemar* в подходяща по-активна конформация (П№14).

4. Беше предложен ефективен метод за синтез на структурирани липиди, съдържащи средноверижни остатъци на 1- и 3- позиция и есенциална мастна киселина на sn-2-позиция от глицероловия скелет, подходящи за клинично хранене. И за двата използвани имобилизирани ензима, липаза от *Rhizopus delemar* и липаза от *Rhizomucor miehei*, бяха постигнати около 90% степен на превръщане на изходното масло до желаните структурирани липиди за 72 часа (П№18).

5. Предложен е екологосъобразен метод с използването на имобилизирани липази от *Candida antarctica* В и *Rhizomucor miehei* за синтез на β-аминоестери. Установено беше, че вида на получените продукти силно зависи от реакционната среда и вида на използвания изходен амин. Синтезирани, изолирани и охарактеризирани са 5 различни съединения (П№20). Предстои разширяването на тези експериментални изследвания.

### **III. Изследвания върху стабилността и свойствата на ензими и терапевтични протеини в присъствие на йонни и нейонни повърхностно активни агенти.**

**III.1.** Ефекта на голям брой нейонни повърхностно-активни вещества и йонни течности върху активността на няколко липази беше във фокуса на част от изследванията ми през последните години и по-съществените резултати и приноси могат да бъдат резюмирани по следния начин:

А) Предложен е лесен и ефективен метод за повишаване на стабилността на лиофилизирана липаза от *Bacillus stearothermophilus* МС7 при съхранение, които включва предварително модифициране на ензима с полиетиленгликол (PEG) с молекулна маса 6000, а посредством третиране на липазата с PEG сорбитан моностеарат (Tween 60) и PEG с молекулна маса 400 беше повишена чувствително нейната температурна стабилност, като ензима запазва до 60% от активността след 30 минутно инкубиране при 75°C (П№1).

Повишен е добива на целеви високомолекулни естери и операционната стабилност на PP-CRL чрез добавяне на PEG с молекулна маса 2000 към провежданата ензим-катализирана естерификация на висши мастни киселини и висши алкохоли. (П№3). След извършена модификация с нейонни повърхностно-активни вещества беше повишен добива на имобилизирана върху полиуретан липаза от *Candida rugosa*, както и нейната хидролитична активност с до 40% (П№8).

Б) За пръв път е изследван ефекта на йонни течности върху активността и операционната стабилност на липаза от *Bacillus stearothermophilus* МС7. 3-Метил-1-октилимидазолиев хлорид е предложен като неконвенционална среда за синтез на стеарилстреарат с висок добив (>90%). Освен това, в този “зелен” разтворител имобилизирана МС7 липаза почти напълно запазва активността си в осем пет-часови работни цикъла (П№12).

В) За пръв път беше изследван ефекта на серия йонни течности на основата на 1-метил-1-октил пиролидиниев катион върху енантиселективността на имобилизирана липаза от *Rhizopus delemar* в реакция на ацилиране на (+/-)-ментол. Най-чувствително повишаване на енантиселективността беше установено в случаите на добавяне на малко количество от 1-метил-1-октил-пиролидиниев хексафлуорфосфат (П№13).

Г) Липази от *Candida rugosa* и *Rhizopus delemar* са изследвани в присъствие на йонни течности, съдържащи 1, 3-диалкил имидазолиев катион и аниони изкуствени подсладители, захарин или ацесулфам. Чувствително беше повишена стабилността на двата ензима при съхранение в разтвор при стайна температура след третирането им с разредени разтвори на онези от йонните течности, които съдържат късоверижни алкилови заместители при азотните атоми от имидазоловия цикъл. Резултатат, с голямо

биотехнологично значение, предвид широката употреба на микробиалните липази в индустрията и практиката (П№16).

**III.2.** Към настоящия момент ефекта на йонните течности върху стабилността и свойствата на терапевтични протеини е слабо изучен. Редица изследвания в тази насока са публикувани през последните няколко години, включващи предимно малки протеини или късоверижни пепиди и моделни системи, показват потенциала на някои течни соли като консерванти, екстрагенти или средства за изследване на процесите на денатурацията или агрегацията на протеини. Все още обаче няма задълбочени изследвания и знанията в тази посока са оскъдни и не са систематизирани. През последната година обект на моите изследвания бяха два терапевтични протеина:

**А)** За пръв път беше оценено въздействието на биосъвместими йонни течности върху структурата и антитуморните свойства на хемоцианини изолирани от хемолимфа на Черноморски рапан. За изследване бяха подбрани две серии йонни течности, съдържащи холинилов или 1-етил-3-метилимидазолил катион и различни аминокиселини като аниони. Беше установено, че модификацията на хемоцианините с всяка от изследваните йонни течности води до съществена промяна в структурата на протеина и влошава неговата температурна стабилност. В същото време, обаче, цитотоксичността на комплексите „йонна течност-хемоцианин” спрямо клетки от рак на млечната жлеза (MCF-7) беше съществено повишена в сравнение с тази на нетретирания с йонни течности протеин. Важно е да се отбележи, че повечето от модифицираните с холиновата серия йонни течности хемоцианини показаха също така и забележителна селективност и не повлияваха пролиферацията на нормални клетки, а напротив в някои случаи дори стимулираха растежа им (П№17, П19).

**Б)** Друг терапевтичен протеин, обект на нашите изследвания беше инсулин, изолиран от свински панкреас. От литературни данни се знае, че мономерният инсулин е много нестабилен и е склонен към агрегация и денатурация при досег с хидрофобни повърхности, контакт с кислород, при интензивно разбъркване или в кисела среда, което представлява огромен проблем за фармацевтичната индустрия. С оглед на важността на проблема беше оценен потенциала на серия йонни течности, съдържащи 1-бутил-3-метил



имидазолиев катион и различни аниони да стабилизират инсулин разтворен в кисела среда (рН 2.0). Беше установено, че в присъствие на йонните течности, съдържащи ацетатни и трифлуорацетатни аниони температурната стабилност на инсулина се повишава с около 10°C. Същевременно всички изследвани йонни течности възпрепятстваха агрегацията на инсулина, но предизвикаха реорганизация в протеиновата молекула. Резултатите са интересни от фундаментална гледна точка и биха могли да имат принос към разработването на нови нискомолекулни вещества, стабилизиращи инсулина (П№21).

### **Насоки за бъдеща научно-изследователска работа:**

Продължаване и обогатяване на работата по описаните направления и по-специално:

1. Синтез на нови ефектори и изследване на тяхното въздействие върху структурата, активността и свойствата на ензими и протеини. Провеждане на фундаментални изследвания върху протеиновата стабилност.

2. Синтез на нови инхибитори на различни ензими (хидролази, оксидоредуктази, и др.) като потенциални терапевтици за различни заболявания. Провеждане на кинетични експерименти с тях.

3. Стабилизиране на биокатализатори, както и охарактеризиране на новоизолирани протеини и ензими с цел разширяване на областите им на приложението.

13.01.2015 г.

Подпис:

/д-р Мая Гунчева/