

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Райна Николаева Шипарова-Ботева, д.н.,

Национален Център по Радиобиология и Радиационна Защита, член на научно жури съгласно Заповед №НО-05-05-4/04.04.2016 г. на Директора на ИОХЦФ, БАН, София

**Относно:** Конкурс за „доцент“ по професионално направление 4.2. „Химически науки“, научна специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологични вещества“ за нуждите на лаб. „Химия и биофизика на белтъци и ензими, ХББЕ“ на ИОХЦФ, БАН, обявен в ДВ, бр.103/30.12.2015 г.

**Главен асистент д-р Мая Христова Гунчева** е единствен кандидат, който участва в конкурса за академичната длъжност „доцент“.

### **Професионална квалификация на кандидата:**

Гл. асистент Мая Гунчева е магистър по органична и аналитична химия. През 1999 г. завършва висше образование в Химическия факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“, а през 2003 г., след успешна защита на дисертационен труд на тема „N-ацилирани ариламиди като моделни субстрати за амидохидролази“, получава образователната и научна степен „доктор“. Година по-късно е назначена като научен сътрудник II ст. в лаборатория „ХББЕ“ на ИОХЦФ на БАН, а от 2010 г. е главен асистент в същата лаборатория. Работи в областта на биоорганичната химия и се занимава с биокатализ и протеинова химия.

### **Научно-изследователска дейност:**

#### **1. А. Публикации**

Гл. ас. д-р Мая Гунчева е представила за участие в конкурса 21 научни публикации, 19 от които са публикувани в международни списания с импакт фактор и две – в материали от симпозиум (Proceedings of the 33<sup>rd</sup> European

Peptide Symposium). По-голямата част от научните трудове са публикувани в престижни специализирани международни издания като Chemical Engineering J., FEBS J., Catalysis Communications, RSC Advances, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Общият импакт фактор на статиите, представени за участие в конкурса, е 45.7. В 15 от тези публикации, представляващи 70% от всички трудове, с които гл. ас. М. Гунчева участва в конкурса, както и в трите публикации, въз основа на които е защитила дисертационен труд, тя е първи автор, а в 4 публикации - втори съавтор, факти, които ясно демонстрират важните приноси в експерименталната работа и в публикуването на резултатите на гл.ас. д-р М. Гунчева. В приложения списък на научните трудове за участие в конкурса са съобщени и данни за забелязани цитати. От тях става ясно, че статиите от конкурса са цитирани общо 138 пъти, като най-много цитати – 59, има една обзорна статия, посветена на каталитичните свойства и приложенията на липаза от *Bacillus subtilis*. Прави впечатление повишения интерес на чуждестранни учени към научните трудове, които съдържат резултати с потенциално практическо приложение и имат отношение към биотехнологични проблеми; цитирани са общо над 60 пъти.

## **Б. Доклади и резюмета от научни форуми**

М. Гунчева участва в конкурса с 6 резюмета от международни форуми, две от които са докладвани на симпозиуми по органична химия и пептиден синтез, проведени в София, а останалите четири - на конференции в Испания, Италия и Естония, както и с 6 резюмета от национални форуми по химия, катализ или пептиден синтез.

### **2. Участие в научно-изследователски и национални договори и програми**

Гл. ас. М. Гунчева е предоставила информация за участие като ръководител на три научно-изследователски проекта, финансирани от НФНИ и ОП „Развитие на човешките ресурси“ на МОН. Тя е участник и в други три проекта, два от които са финансирани от НФНИ и един – от холандска фирма.

### **3. Учебно-преподавателска дейност**

Гл. ас. М. Гунчева е била ръководител на двама дипломанти и е участвала като ръководител на лабораторна практика по проект от ОП „Развитие на човешките ресурси“ на МОН на тема „Методи за имобилизация

на ензими“, в която са били включени 11 магистри от различни университети в София и Пловдив.

#### **4. Други дейности, свързани с кариерното развитие на кандидата**

Гл. ас. М. Гунчева е активен член на „Европейското пептидно дружество“.

#### **5. Оценка на приносите от научно-изследователската дейност на гл. ас. М. Гунчева**

Научно-изследователската и експертна дейност на гл. ас. М. Гунчева, кандидат за академичната длъжност „доцент“, отразена в нейните научните публикации и доклади, които бяха обект на оценката ми като участник в научното жури за провеждане на този конкурс показва, че интересите, основната ѝ активност и научно-приложни приноси са в следните важни области и направления от биоорганичната химия:

- молекулни механизми и специфичност на ензими с индустриално значение като пеницилин G ацилази и липази от различен бактериален произход;
- имобилизация на липази върху полимерни и нано-материали от неорганичен произход с цел увеличаване на ензимната стабилност и активност в реакции от индустриален интерес;
- ефекти на повърхностно активни вещества и други модификатори на ензимната активност върху стабилността и свойствата на липази и някои протеини с потенциално медицинско приложение като хемоцианин и инсулин.

Научните изследвания върху **молекулните механизми и специфичност на ензими** обхващат интерпретацията на кинетични, структурни и теоретични данни за две пеницилин G ацилази от различен бактериален произход - *Escherichia coli* и *Alcaligenes faecalis* (публ. 5 и 6). За двете изследвани пеницилин G ацилази е доказан различен механизъм на ензимно действие като за целта детайлно, на молекулно ниво, са изследвани реакционните кинетики на ензимните реакции, проведени със специално синтезирани субстрати, които представляват фенилацетил р-заместени анилиди. Докато за пеницилин G ацилаза от *E. coli* е установено, че специфичното местоположение и ориентация на няколко аминокиселинни

остатъка в близост до каталитичния център оказват съществено влияние и комплекса на един от тях, GlnB23 с азотен атом от напускащата група на субстрата, има ключова, скорост-определяща роля за хидролизата (публ. 5), за пеницилин G ацилаза от *A. faecalis* (публ. 6), скорост-определящият стадий е разпадането на междинния тетраедричен комплекс между ензима и субстрата. Експерименталните изследвания върху реакционните механизми на двете бактериални пеницилин G ацилази демонстрират фини, но съществени различия в ензимните механизми, които са важни за оптимизиране на катализираните от тях процеси и са с потенциално приложение и значение за синтеза на нови антибиотици.

Колектив с участието на гл. ас. М. Гунчева, отново във връзка с изследвания върху ензимни молекулни механизми, синтезира серия нови инхибитори на панкреатичната липаза с обща формула 4-алкиламино-2-етоксицикобут-3-ен-1,2-диони и охарактеризира свойствата им (публ. 9). Инхибирането на този ензим е важна стратегия в борбата с наднорменото тегло и затлъстяването, а разработването на специфични инхибитори се оказва трудна задача поради близките каталитични механизми на липази и серинови протеази. Един от синтезираните от гл. ас. М. Гунчева инхибитори (4-хексадециламино-2-етоксицикобут-3-ен-1,2-дион) е показал добра селективност и инхибиторна активност, съизмерима с тази на медикамента Орлистат, единствен препарат, одобрен за медицинско приложение.

Втората важна област, която представлява научно-изследователски интерес за гл. ас. М. Гунчева, е повишаване на стабилността и запазване на активността след имобилизация **на важни за индустрията ензими**, каквито са липазите, ефективни биокатализатори в разнообразни реакции на естерификация, хидролиза, разделяне на рацемични смеси и синтез на  $\beta$ -амино естери, прекурсори на биологично активни съединения. Основната цел на тези изследвания и разработки е практическото приложение на липази от различен произход, а публикациите, отразяващи резултатите от тях, както вече беше отбелязано, са цитирани от чужди автори, доказателство за актуалността и важността на проблематиката. Тези експериментални изследвания са обект и на три научни проекта, единият от които е спонсориран от индустриална фирма. Крайният резултат от тях е получаване на имобилизирани липази, които в зависимост от носителя, показват редица полезни за индустриално приложение свойства като биокатализатори, между

които са повишена термостабилност, запазена до голяма степен активност след голям брой реакционни цикли, повишена селективност. Като по-важни постижения могат да бъдат отбелязани изследванията върху активността и стабилността на новоизолирана от колектива с участието на гл. ас. М. Гунчева липаза от термофилен щам на *Bacillus stearothermophilis*, имобилизирана върху различни носители като диетиламиноетил-целулоза, полипропилен, наночастици от калаен диоксид, хитозан и полиуретан (публ. 2, 4, 7, 12). Установено е, че имобилизацията на ензима върху целулозни и полипропиленови носители може да повиши значително термостабилността на ензимните препарати, което разширява възможностите за практическото им използване предимно в синтетични реакции за получаване на високомолекулни естери. Същевременно е отбелязано обаче, че в други реакции като ацидолиза на триглицериди и мастни киселини, същите препарати проявяват умерена активност и ниска селективност и не са подходящи биокатализатори за синтеза на структурирани триглицериди.

С имобилизирана върху порест полипропилен липаза, изолирана от *Candida rugosa*, в органичен разтворител, са синтезирани с висок добив 12 високомолекулни естера (публ. 3), които намират широко приложение в хранителната, фармацевтичната и козметичната индустрии. След многократно повторение на реакцията при 50°C е установено, че имобилизираната липаза от *Candida rugosa*, използвана като катализатор, запазва повече от 80% от активността си. Установено е, че замаяната на полипропилен като носител с полиуретан (публ. 4), повишава активността, съкращава реакционното време и повишава стабилността и термоустойчивостта на имобилизираната липаза.

Установено е, че структурираните липиди със средно дълги вериги от 8-10 мастнокиселинни остатъци, съдържащи есенциална мастна киселина на определени места в глицероловия скелет имат благоприятно въздействие върху чернодробната функция и могат да минимизират риска от инфекции и гастроинтестинални усложнения след операции, поради което се използват като храна за хора със здравословни проблеми, новородени и спортисти. С две имобилизирани върху полипропилен липази от *Rhizopus delemar* и *Rhizomucor miehei* като биокатализатори, гл. ас. М. Гунчева и колектив успешно, с много висок добив, превръщат орехово масло в структурирани липиди, подходящи за клинично хранене (публ. 18).

През последните 5 години гл. ас. М. Гунчева провежда важни, пионерски изследвания и експерименти по имобилизация на липази от различен произход върху нови, перспективни неорганични материали като наночастици от калаен диоксид и циркониев оксид (публ. 10-15). По-важните резултати от тези разработки, които заслужават специално внимание, са комплекса на липаза от *Candida rugosa* с калаен диоксид в нано-форма, който е охарактеризиран като отличен биокатализатор, с подобрени основни характеристики на ензима, между които са многократно (8 пъти) повишена ензимна активност в сравнение с активността на имобилизирана върху полиуретан липаза и съхранение на значителен процент от тази активност след голям брой реакционни цикли при многократното използване на биокатализатора в алкална среда (pH 10). Освен стимулиране на каталитичната активност, същият колектив съобщава, че циркониевият оксид, другият изследван от тях неорганичен нано-носител, може да подобри и селективността на липазата в реакции на ацетилиране.

С имобилизирани върху наночастици липази от различен произход - гъби (*Rhizopus delemar* и *Rhizomucor miehei*), дрожди (*Candida Antarctica*) и свински панкреаз, са проведени различни синтетични реакции и е установено, че подобрените характеристики на имобилизираните липази се дължат на факта, че калаеният диоксид в нано-форма, може да свърже ензимите в активна конформация, което повишава каталитичната активност, термостабилността, рН-устойчивостта и стабилността на имобилизираните препарати спрямо органични разтворители (публ. 11). За повишаване на количеството ензим върху неорганичния нано-материал, е синтезиран нано-калаен диоксид с „присадени“ аминогрупи, означен като „функционализиран с аминогрупи“ носител (публ. 13). Имобилизираната върху тези нано-носители липаза се характеризира с подобрена стереоселективност и повишени активност и стабилност в сравнение с изходните ензимни препарати. Показано е също така, че микроколичества платина или паладий, включени в наночастици от калаен диоксид, допълнително могат да стимулират ензимната активност на липази от различен произход (публ. 14), като за имобилизираната върху този носител липаза от *Rhizopus delemar* е установена внушителната цифра от 150 пъти по-висока специфична активност в сравнение със същата липаза, имобилизирана върху силикагел, който е най-масово използваният неорганичен носител.

Освен след имобилизация, каталитичните свойства, стабилността и специфичността на липази и протеини с потенциално медицинско приложение могат да бъдат значително повлияни и модифицирани от различни други ефектори като повърхностно активни вещества, соли, консерванти, разтворители. Това е третата важна област, в която работи и има съществени приноси гл. ас. М. Гунчева. Тези разработки също представляват интерес за практиката и са непосредствено свързани с възможностите за индустриално приложение на липазите. По-важните приноси от тези научни изследвания на гл. ас. М. Гунчева са ефектите на три серии различни нейонни сърфактанти върху стабилността на лиофилизирана термостабилна липаза от *Bacillus stearothermophilis* (публ 1), както и върху хидролитичната активност и добива на високомолекулни естери, катализирани от имобилизирана върху полипропилен липаза от *Candida rugosa*, в среда, която съдържа полиетилен гликол 2000 (публ. 3 и 8).

Установено е, че средата, в която протича реакцията с участието на липази, оказва влияние не само върху каталитичните характеристики и стабилността на ензима, но може да промени реакционния механизъм и разшири набора от ензимни субстрати. Докато във водна среда липазите катализират хидролизата на триацилглицероли до мастни киселини и глицерол, в органични разтворители същите ензими могат да катализират обратната реакция – естерификация. При определени условия, с участието на липази като биокатализатори, могат да протекат и синтетични реакции с образуване на ковалентни връзки между въглерод-въглеродни атоми и въглерод-хетероатоми, както и синтез на хетероциклени съединения. Като пример за синтетична реакция с участието на имобилизирана върху наночастици от калаен диоксид липаза от *Bacillus stearothermophilis*, в неконвенционална среда, съдържаща 3-метил-1-октилимидазолиев хлорид, може да се посочи успешния, с висок добив синтез на восьмичния естер стеарилстреарат, използван главно като сърфактант (публ 12). Показано е също така, че пиролидин-съдържащи соли могат да повишат енантоселективността на имобилизирана върху наночастици от калаен диоксид *Rhizopus delemar* към изомерите на метанола (публ. 13). Изследвани са и ефектите на серия соли, съдържащи като катион 1,3-диалкил имидазолиев и като анион подсладителите захарин и ацесулфам, върху каталитичните свойства на липазите от *Rhizopus delemar* и *Candida rugosa*.

Установен е положителен, стабилизиращ ефект на солите, съдържащи алкилови заместители с по-къси вериги при азотните атоми от имидазола върху ензимите, съхранявани в разтвор при стайна температура, което представлява важен резултат за практическото приложение на тези липази предимно в млечната индустрия и за производство на детергенти (публ. 16).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Кандидатът, който участва в конкурса, главен асистент д-р Мая Христова Гунчева, отговаря на критериите и изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за прилагане на същия закон и критериите, приети от Научния съвет на ИОХЦФ за заемане на конкурсната академична длъжност „доцент“. Комплексната ми оценка на всички представени от нея за участие в конкурса материали, на качеството и обема на научната продукция, научните приноси, отзвук в международната научна литература, участията в научно-изследователски проекти и научни форуми показва, че гл. ас. д-р М. Гунчева е утвърден специалист и има съществени научно-изследователски и научно-приложни резултати и приноси в областта на биоорганичната химия и по-специално в биокатализа, синтетичната и протеинова химия. Това ми дава основание за положителна оценка на кандидатурата ѝ за заемане на академичната длъжност „доцент“.

**Убедено препоръчвам на почитаемото научно жури да избере гл. ас. д-р М. Гунчева за “доцент”, професионално направление 4.2. „Химически науки“, научна специалност 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“ за нуждите на лаборатория „Химия и биофизика на белтъци и ензими, ХББЕ“ на ИОХЦФ, БАН.**

11.05.2016 г., София

Изготвил:

(проф. д-р Р. Ботева, д.н.)