

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. дн Пантелей Петров Денев

на дисертационен труд на тема „Получаване и ензимна модификация на биологично активни пектинови полизахариди“, представена от асистент Манол Христов Огнянов – редовен докторант към Лаборатория по биологично активни вещества - Пловдив за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ по професионално направление 4.2. „Химически науки“ и научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

Със заповед № НО-05-05-12/03.05.2016 г. на Директора на ИОХ към БАН съм определен за член на научното жури за защита на дисертационен труд, представен от Манол Христов Огнянов за придобиване на образователна и научна степен “доктор”.

Манол Христов Огнянов е спечелил конкурса и е назначен за редовен докторант към ЛБАВ - Пловдив със заповед № РД-09-15/27.01.2011 г. и е отчислена с право на защита със заповед № РД-09-13/30.04.2014 г. Представените ми за рецензиране документи и материали отговарят на изискванията на Закона за развитие на академичния състав на Република България и Правилника на ИОХ с ЦФ. На защита докторантът се явява с всички необходими документи – дисертационен труд, автореферат, публикувани научни трудове, свидетелство за положени изпити, участие в научни конференции и заповед за отчисляване с право на защита.

Актуалност и целесъобразност на разглеждания проблем

За актуалността на дисертационния труд може да се съди от факта, че повече от две столетия ни делят от изолирането на пектина и въпреки интензивните изследвания все още съществуват редица аспекти от неговата природа и характеристика, които подлежат на доизясняване и доуточнение. Независимо от широкото разпространение все още съществуват и се търсят недооценени суровинни източници на пектин - лечебни растения, плодове и зеленчуци, традиционни за съответната страна.

Пектиновите вещества намират основно приложение в хранително-вкусовата промишленост за производство на функционални храни, напитки и хранителни добавки. Досега известната информация относно структурата на пектиновите продукти, както и познаването на механизмите на действие на голяма част от пектолитичните ензими е установена определена зависимост между фрагментарна структура и проявявана биологична активност. Концепцията за лечение и превенция на базата на природни вещества стимулира засилване в изследванията на състава и свойства на пектиновите вещества и техните модифицирани продукти, както и създаването на естествени нутрацевтици и лекарствени продукти от тях. Следователно изследванията върху ролята на пектинови фрагменти за диетична превенция на социално значими заболявания са изключително полезни за обществото. Интересът към пектините не е само от научен, но и от приложен характер. Необходими са задълбочени изследвания за правилната оценка на потенциала им при разработване на функционални храни и фармацевтични продукти. Всичко това мотивира необходимостта от провеждането на допълнителни изследвания върху състава, структурата и биологичните свойства на пектиновите вещества, за по-цялостното им разбиране и по-ефективното им използване.

Дисертантът се е постарал, чрез прилагането на модерни методики, техники и апарати, да даде своя принос в изясняването на връзката между структурата и биологичната активност на ензимно модифицирани биологично активни пектинови полизахариди, като и изследвал фрагментарната структура, начина на свързване, съотношение на биологично активните вещества в пектина и тяхното влияние върху ензимна-, имуномодулираща- и имуностимулираща активност. Тези препарати е вложил и във функционални напитки и препарати, подходящи за профилактика и лечение на стомашно-чревни и сърдечно-съдови заболявания.

Обща характеристика на дисертацията

Дисертационният труд е оформен на 264 печатни страници и съдържа 1 схема, 37 таблици и 50 фигури. Библиографската справка обхваща 294 литературни източника (8 на кирилица и 286 на латиница). Дисертацията е добре подредена и структурирана. Дисертационният труд отговаря на изискванията на чл. 27. от ППЗРАСРБ и съдържа: 1. Литературен обзор, 2. Цел и задачи, 3. Материали и методи, 4. Резултати и дискусия, 5. Изводи, 6.

Приноси, 7. Литература. Приложени са публикувани материали и участия в конференции, цитати отделно има и декларация за оригиналност. В обособените основни раздели докторантът представя задълбочено постигнатото в съответната област в науката до момента, описва пълно и ясно използваните методи за работа и анализ, както и интерпретира с разбиране получените резултати в изпълнение на формулираните цели и задачи.

Литературен обзор

Литературният обзор е написан на 62 страници и представя постигнатото до момента по отношение на третираните проблеми. В началото започва с исторически преглед на развитието на химията на пектиновите вещества, номенклатура и класификация на пектиновите вещества. Следва пълна и многопластова характеристика на химичния състав и структура на пектина, детайлно е описана структурата на хомогалактуронан и рамногалактуронан. Засегнати са и моделите, описващи молекулния строеж на пектиновите вещества, тяхното омрежване и взаимодействието им с други компоненти на растителната клетъчна стена. Подчертана е биологичната активност и фармакологични ефекти на пектиновите полизахариди, тяхната имунологична активност, както и връзката между структура и активност. Със задълбочено разбиране е представена характеристиката и приложението на пектина. Особено внимание е отделено на ензимната модификация и пектолитичните ензими. Добро впечатление в частта на литературния обзор, описваща методите за модифициране на пектин, прави детайлният анализ на начините за модификация, охарактеризиране и приложение на получените деривати. Подробно е разгледано действието на хомогалактуронановите, рамногалактуронановите, ксилогалактуронановите, арабинан- и арабиногалактан-разграждащите ензими.

Този задълбочен преглед показва подготвеността и компетентността на докторанта Манол Огнянов в областта на химията на въглехидратите, и методите за техния анализ и ензимна модификация. Анализиранията литература е коректно цитирана, като по-голяма част от посочените научни публикации са в периода от последните десет години, което е показателно за извършената работа на докторанта в това отношение. В края на литературния обзор информацията коректно е обобщена под формата на единадесет основни извода, въз основа на които Манол Огнянов логично

обосновава целта на дисертационния труд и задачите, които трябва да се решат за осъществяване на тази цел.

Материали и методи

Разделът „Материали и методи” е изложен на 25 страници. Представените от докторанта методи са целесъобразно подбрани и са групирани в три области: препаративни, аналитични и технологични.

Препаративните методи - предварителна обработка на суровините, последователна фракционна екстракция на пектинови полизахариди, пречистване на търговски цитрусов пектин и лиофилизация, са доказателство за добрата теоретична и практическа подготовка на докторанта, която му позволява да получи пектинови препарати с достатъчно голяма чистота и хомогенност. Условието за провеждане на експериментите и апаратурата са описани по начин, позволяващ тяхното повторение.

Богатата гама от представените съвременни аналитични методи (Спектрофотометрични методи за определяне на въглехидрати, полифеноли и антиоксидантна активност, хроматографски методи GC и HPLC-RID методи за определяне на захари, гелхроматография и йонообменна хроматография, спектрални методи: MALDI-TOF маспектрометрия, ФТ-ИЧ спектроскопия, ЯМР спектроскопия) показва, че освен научната, докторантът е развил успешно и образователната дейност. В потвърждение на това са двете му специализации през 2013-14 г. в Университета на Вагенинген- Холандия, водещ център в Европа по въглехидратна биоорганична химия.

Резултати и обсъждане

Резултатите от изследванията по дисертационния труд са обобщени в 42 фигури и 36 таблици. Обсъждането на получените резултати показва задълбочено вникване в проблематиката и тълкуване на експерименталните данни.

Дискусията по експерименталната работа започва с подбор и предварителна характеристика на растителните суровини, от които чрез фракционна екстракция са получени необходимите за изследванията пектинови препарати. На последните са определени монозахариден състав и молекулна маса. Използването на модерни методики и апарати, говори за достоверността на анализите. Направена е подробна съпоставка със съществуващите до момента данни за състава и структурата на пектини

получени от различни източници. Освен конвенционален е приложен и съвременен микровълнов метод за екстракция, разработен в ЛБАВ под ръководството на доц. д-р Крачанова. Установено е, че с най-голям добив на алкохолонеразтворими вещества се откроява шипковата люспа, а с най-нисък добив на тези вещества - празът. Намерено е, че главните захари в тази фракция от портокалови кори и шипкова люспа са галактуроновата киселина и глюкоза, противно на преимущественото съдържание на глюкоза в тази от праз.

В следващата част са описани, тълкувани и дискутирани същностната част на дисертацията – ензимната модификация на пектинови препарати, изолирани от алкохолно неразтворимата част на изследваните суровини – цитрусови кори, праз, шипки, мурсалски чай. Модификацията е правена с вариране на условията. Получените продукти са анализирани по въглеводороден състав и молекулна маса с помощта на гел- и анионообмена хроматография. Направен е и обобщен мултиензимен фингърпринтинг анализ. Показан е олигомерният профил на пектинови препарати след ензимно третиране с ендо-полигалактураназа-I. Резултат от модификацията е редуцията на молекулната маса и хомогалактуроновото съдържание, водещи до увеличаване съдържанието на рамногалактуранан-I блокове. Сепарирани са и е установен съставът, последователността и начинът на свързване на олигомери със степен на полимеризация 6 и 7 единици. Показано е сходно метоксилно разпределение в киселинно екстрахираните пектини от цитрусови кори и праз, но отделните блокове са застъпени в различни количества. И двете проби съдържат големи области от неразградими от пектиназните ензими метоксилирани галактуронозилни единици, както и малки количества от клъстерно разположени неестерифицирани блокове от тях, с малка дължина. Успешното модифициране е доказано и с помощта на спектрални методи ФТ-ИЧ и ЯМР спектроскопия.

Биологичната активност на изходни и модифицирани полизахариди е разгледана в шест направления - антиоксидантна активност, антикомплементарна активност, антитуморна (*in vitro* цитотоксична) активност, флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкоцити, *in vitro* имуномодулираща активност, измерване продукцията на реактивни форми на кислорода от фагоцити.

Антиоксидантната активност е оценена по два метода - ORAC и HORAC. Показано е, че за проявяването на антиоксидантното действие има

значение не само количеството на общите полифеноли, но и индивидуалният им състав.

Модификацията с галактанази повлиява по-скоро положително върху проявлението на антикомплементарната активност, което показва, че при ЦП β -(1 \rightarrow 4)-връзките не са есенциални за проявлението ѝ.

Водно-екстрахираните полизахаридни фракции от праз и шипкова люспа оказват концентрационно и времево-зависима антитуморна (*in vitro* цитотоксична) активност срещу 5 бр. туморни клетъчни линии. Препаратите от праз са по-активни, но тези от шипки са по-малко токсични за нормалните клетки.

Изходните и модифицираните фракции от всички използвани суровини демонстрират способност да модулират функциите на чревната имунна система, повлиявайки върху имунокомпетентните клетки на чревните Пайерови плаки. Всички те засилват продукцията, но в по-малка степен отколкото положителната контрола, на оказващия пролиферативен ефект върху костно-мозъчните клетки IL-6.

На получените пектинови екстракти от растителни суровини, докторантът успешно е намерил приложение във функционална напитка с повишена биологична активност, за което е приложил и съответната технологична документация.

Основните получени резултати от работата са обобщени в 12 основни извода. Посочени са и приносите на дисертационния труд в областта на изолиране, охарактеризиране и модификация на пектинови препарати, имуномодулиращата им способност и антиракови свойства. Считаю, че изводите са добре и ясно формулирани и дават обобщена информация за получените основни резултати.

Публикациите във връзка с дисертацията са пет броя. Налични са и девет участия в национални и международни конференции. Открити са и 18 цитирания на публикации, свързани с дисертацията.

Препоръки и въпроси:

1. Да ограничи използването на съкращения, които не са популярни сред научните среди, особено в изводите – напр. КЕППр, КЕПП, ВЕ ПЗ, ВЕППр, ВЕПП и др., или водят до объркване втори остатък – O₂, екстракция - E₁ или E₂, чист пектин в табл. 5, странични деестерификационни процеси – стр.98
11 р. отг.

2. Когато става въпрос за природно естерифицирана галактуронова по-коректно е да се използва терминът „метоксилна група“, вместо „метилова група“.

3. В таблиците да се дават не само средните стойности на измерените величини (СЕ, УК, добив, Ага и т.н.), но и отклоненията.

4. Може ли чрез фингърпринтинг анализ, да се идентифицира произходът на пектина – от шипки, праз, цитруси?

Заключение: Рецензията отговаря по качество и надхвърля по обем изискванията за дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ и съдържа както научни, така и научноприложни резултати, които представляват оригинален принос в науката. Дисертационният труд показва, че кандидатът притежава задълбочени теоретични знания по съответната специалност и способности за самостоятелни научни изследвания. Публикуваните материали във връзка с дисертацията отговарят на наукометричните изисквания и покриват изискванията за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ съгласно ЗРАСРБ и правилника на ИОХ с ЦФ.

Въз основа на анализа направен до тук, с убеденост давам положителна оценка за научната и изследователска работа на асистент Манол Христов Огнянов и съм съгласен да му бъде присъдена образователната и научна степен „доктор“ по професионално направление 4.2. „Химически науки“, научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“.

Пловдив
19.05.2016 г.

/проф. дн инж.-хим. Пантелей Денев/