

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема „**БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА ОТ РЕДКИ БЪЛГАРСКИ ВИДОВЕ SALVIA И ТЕХНИ IN VITRO КУЛТУРИ**“, представена за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ по шифър 4.3., направление „Биологически науки“, (Технология на биологично активните вещества 02.11.11), от **инж. Андрей Стоянов Марчев** – докторант към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“- БАН, отдел „Приложна микробиология“

от проф. д-р Страхил Христов Берков – Институт по Биоразнообразие и екосистемни изследвания при БАН, определен за член на научно жури съгласно заповед номер I-69/28.05.2014 на директора на Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН

Кратки биографични данни за кандидата

Инж. **Андрей Стоянов Марчев** е завършил Университета по хранителни технологии – гр. Пловдив, специалност „Биотехнологии“ през 2006 г. с отличен успех. Започва редовна докторантура в Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ при БАН през 2009 г., като е отчислен с право на защита през Октомври 2013 г. От Октомври 2012 работи като асистент към гореспоменатия институт.

Актуалност на дисертационния труд

Хората използват растения продуциращи биологично активни вещества от хилядолетия за получаване на лекарствени, козметични и хранителни (функционални храни) продукти. Счита се, че под 10% от растителното биоразнообразие е изследвано до момента. Има редки, непроучвани или слабо проучвани растителни видове, чиито разпространение и численост не позволява събиране на материал за класически фитохимични изследвания. В този аспект, биотехнологичните подходи са незаменими за изследване на биологично активни вещества в редки растителни видове и оценка на възможностите за тяхното промишлено получаване. Всеки докладван резултат в тази област на

биотехнологичната наука допринася за бъдещото рационално използване на природните вещества от редки растения във фармацевтичната, хранително-вкусовата и козметичната индустрии.

Характеристика на дисертацията

Дисертационният труд е оформен по възприетия в България класически модел на 288 страници и включващ 68 фигури, 43 таблици и 279 цитирани литературни източника (на латиница). Структурата на дисертацията е балансирана, като отделните раздели дават възможност за задълбочено представяне на постигнатото в света до момента и за интерпретиране на получените резултати в изпълнение на формулираната цел.

Литературният обзор е логично структуриран и е с обем от 66 страници. Започва с биологична и химична характеристика на род *Salvia*, *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*. Продължава с критичен анализ на методите за определяне на антиоксидантна и ацетилхолинестеразна активност и завършва с биотехнологични аспекти на култивиране на диференцирани и не диференцирани *in vitro* системи в твърда и течна среда и в биореактори. От литературният обзор се правят изводи, от които се формулират целта и задачите на дисертационния труд. Анализиранията литература е коректно цитирана, като над 70% от обзорираните научни публикации са от периода след 2005 г., което е показателно за задълбочената работа на докторанта в това отношение.

Целта и задачите на дисертационния труд са формулирани, така че изпълнението им да осигури постигане на резултати с висока научна стойност.

Разделът „Материали и методи“ е представен на 20 страници. Докторантът успешно се е справил с усвояването на необходимите за целта на дисертационния труд методи на изследване: въвеждане на

растителен материал в *in vitro* култури, получаване на екстракти с различен метаболитен състав, определяне на биологична активност, инструментален анализ и статистическа обработка на получените резултати. Условието за провеждане на експериментите и апаратурата са описани по начин, позволяващ тяхното повторение. Усвояването на разнообразните методи за химичен и биологичен анализ и различните подходи за биотехнологично култивиране на растенията е пример, потвърждаващ образователната стойност на докторантурата.

Резултатите от изследванията по дисертационния труд са обобщени в 62 фигури и 34 таблици. Експерименталната работа се разделя условно на две равностойни части, химичен анализ и биологична активност на екстракти от интактни растения и химичен анализ и биологична активност на недиференцирани и диференцирани *in vitro* системи индуцирани от изследваните видове. Експерименталната част започва с химичен анализ и определяне на анти-микробиална, антиоксидантна и анти-холинестеразна активности на етерични масла от изследваните видове (*S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*), продължава с разработване на течно-хроматографски метод за определяне на тритерпени и анализ на ацетонови, етанолни и водни екстракти от гореспоменатите видове по отношение на тритерпени и фенолни съединения. Тествани са и анти-микробиалната, анти-радикаловата и анти-холинестеразната активности на получените екстракти.

Биотехнологичните експерименти започват с индуциране на *in vitro* култури от *S. tomentosa*, *S. ringens* и *S. scabiosifolia*, получаване на недиференцирани калусни и суспензиални и диференцирани коренови култури от тях, при което се извършва огромна по обем работа (тествани са 121 концентрационни комбинации от фитохормони) за установяване

на оптималните условия за индуциране и подържане на съответните култури.

При индуциране на трансформирани коренови култури се оптимизира плътността на бактериалната суспензия и метода на култивиране (директна инфекция, съвместно култивиране, култивиране в колби и RITA). Находчиво, проблемите свързани с фенолните съединения при получаването на трансформирани коренови култури се преодоляват с включването на адсорбционна смола в култивационната система. Следват метаболитни анализи включващи тритерпени и фенолни съединения в калуси и трансформирани коренови култури и селекция на високопродуктивни линии от тях. Изследва се и влиянието на фитохормоните върху продуктивността на биологичноактивни вещества. Логично, на най-перспективния продуцент на биологичноактивни вещества- клетъчна суспензия от *S. tomentosa* линия 45, се прави характеристика по отношение на нейното култивиране в биореактори и колби, синтез на тритерпени и фенолни съединения, динамика на усвояване на захароза, фруктоза, глюкоза, фосфатни, нитратни и амониеви йони по време на култивиране в колби и биореактор. На тази линия е определена и анти-микробиалната, анти-радикаловата и анти-холинестеразната активности.

Дискусията на получените резултати показва задълбочено познаване на проблематиката. Структурирането на заключителни бележки към отделните части в раздел „Резултати и дискусия” подчертава постигнатите резултати, като посочва точно върху какво трябва да се акцентира при следващите изследвания. Тази ясна, точна и задълбочена интерпретация на получените резултати за пореден път подчертава нивото на докторант Марчев като изграден млад учен, готов за самостоятелна кариера, както и добрата работа на неговия научен ръководител.

Получените основни резултати от работата са обобщени в 7 извода. Публикациите във връзка с дисертацията са пет броя с общ импакт фактор 4.58. 2 от статиите са *Biotechnology Letters*, 1 в *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 1 в *Journal of Essential Oil Bearing Plants* и 1 в *Scientific Works – University of food technology*. В четири от публикуваните материала докторант Марчев е първи автор, което е показател за конкретния му принос към публикуваните научни изследвания. Материали от дисертацията са докладвани и на седем конференции с международно участие. За качеството на представената декларация говорят и откритите 2 цитата на публикации, свързани с дисертацията.

Основните приноси в дисертационния труд могат да бъдат класифицирани, както следва:

1. Научни приноси:

- за пръв път е доказан биосинтеза на маслена и коросолева киселни в *S. tomentosa* и *S. ringens*, и бетулинова в *S. scabiosifolia*.
- За първи път са получени калусни, суспензиални и трансформирани коренови култури от споменатите видове
- За първи път е получен ризогенен калус от *S. scabiosifolia*.

2. Методични приноси:

- Разработени са два иновативни подхода за получаване на трансформирани коренови култури с *A. rhizogenes* от *Salvia* на база култивиране в течна среда и адсорбционната смола Amberlite XAD4 и при условия на временно разбъркване.
- Адаптиран е метод за разделяне и количествено определяне на ди-, и тритерпени от екстракти на *S. tomentosa*, *S. ringens* и

S. scabiosifolia базиран на високоефективна течна хроматография.

3. Приложни приноси

- Разработена е експериментална матрица за получаване на недиференцирани *in vitro* системи от *Salvia*.
- За пръв път е изследван биосинтетичния потенциал на *S. tomentosa* по отношение на олеанолова и урсолова киселина. Получените резултати са основа за развитието на бъдеща технология за получаването им.

Забележки

Прави впечатление, че за първи път в световен мащаб се получават трансформирани коренови култури чрез двуфазна система включваща течна хранителна среда и адсорбционна смола, преодолявайки недостатъци на съществуващи методи за индуциране на този тип култури при споменатите видове. Докторант Марчев е извършил огромна по обем експериментална работа отразена в 4 престижни международни списания и вероятно след защитата ще бъдат публикувани още материали от дисертационния труд, което е показателно за нивото на работа в лабораторията на научния му ръководител. Разбираемо, обема на дисертацията е 288 страници, което надхвърля общоприетите норми. Кандидатът се е съобразил със забележките, направени в процеса на предзащита. При идентифицирането на метаболити с ГХ-МС е ползван Ковач индекс. В материал и методи следва да се даде начина или софтуерния пакет за неговото изчисляване, след като е посочван в таблиците. Идентифицирането на терпени в етерични масла е препоръчително да се прави не само с комерсиалните бази данни, като NIST и Willey, но и със специализирана литература като „Robert P., Adams (2007). *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry*.

Allured Pub Corp. ISBN 1-932633-21-9” отчитайки мас спектър и RI поради изобилието на изомери в тази група природни вещества. От така описаните материал и методи не става ясно как са идентифицирани метаболитите в таблица 11 и по-точно кои бази данни или литературни данни са ползвани.

Заключение: рецензираният труд отговаря по качество и надхвърля по обем изискванията за дисертация за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” съгласно закона за развитие на академичния състав в Република България.

Публикуваните материали във връзка с дисертацията отговарят на наукометричните изисквания. Основните резултати са публикувани в престижни международни издания. Докладвани са и на международни научни форуми в страната и чужбина. Открити са и цитирания на публикации, свързани с дисертацията. Инж. Андрей Марчев се очертава като задълбочен, самостоятелен и переспективен млад учен.

Анализа направен до тук ми дава основание с убеденост да оценя дисертационния труд **ПОЛОЖИТЕЛНО** и да препоръчам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор” на инж. Андрей Марчев.

София

Юли, 2014

проф. д-р. Страхил Берков