

## РЕЦЕНЗИЯ

**от проф. дн Невена Стоянова Богацевска** Селскостопанска академия,  
Институт по почвознание, агротехнологии и защита на растенията „Н. Пушкиarov”,  
София

**на дисертационен труд**, представен за защита за получаване на образователната и научна степен „доктор” по Професионално направление 4.3 Биологични науки, (Микробиология)

**Автор на дисертационния труд:** Лиляна Ангелкова-Дойчиновски

**Тема на дисертационния труд:** „Изолиране, идентифициране и свойства на млечнокисели бактерии от Балкански млечни продукти”

### **1. Актуалност и значимост на дисертационната тема**

Влиянието на пробиотичните бактерии върху човешката физиология е огромно и продължава да бъде обект на нови научни дирения и факти. Голямо научно и практическо внимание се отделя на тази "невидима" екосистема, която определя състоянието на болест и здраве при хората. Пробиотичните лактобацили играят важна роля за балансираното хранене при човека, оказват благоприятни ефекти при редица заболявания, превръщат се в сериозна алтернатива на антибиотиците, без да имат отрицателни въздействия върху човешкото здраве. Функционалните храни и пробиотиците са алтернативни средства за подпомагане на здравето и подобряване качеството на живот на съвременния човек. Разработването на нови функционални храни с участието на комбинация от пробиотични щамове, изолирани от естествени местообитания със специфични и уникални характеристики, имат полезно въздействие върху всички аспекти на човешкото здраве. Изложените факти много добре мотивират правилния избор на темата, нейната актуалност и практическа значимост.

### **2. Оценка на структурата на дисертационния труд**

Дисертационният труд е написан на 104 стандартни страници – формат А4, резултатите са обобщени и представени в 14 таблици и 13 фигури. Структуриран е по класическата схема и е балансиран по отношение на обема на всеки раздел.

## **2.1. Литературен обзор**

В литературния обзор особено внимание Л. Ангелкова-Дойчиновски отделя на значението на функционалните храни, едно от най - новите направления в науката за хранене, с важно значение за здравословния начин на живот. Разглежда значението на функционалните храни за опазване здравето на съвременния човек. Показва, че пробиотичните бактерии, включени като компоненти в млечнокиселите продукти, превръщат тези храни във функционални и разкрива ролята и значението им при производството, съхранението и използването им. Лактобацилите и бифидобактериите са основните микроорганизми, които се включват в състава на пробиотиците. Обръща сериозно внимание на функционалните и хранителни качества на олигозахаридите, действието им като пребиотици, антимикробни агенти и консерванти при разработването на специализирани натурални храни. Разглежда здравословните и технологичните изисквания за производството на функционални храни, потребителското отношение към пробиотичните и пребиотичните питателни продукти. За уточняване на потребителското търсене и вкусовите нагласи на хората са разработени сензорни дискриминативни, афективни и описателни тестове, които са разгледани и обсъдени. Ангелкова - Дойчиновски познава задълбочено литературните източници, определящи ролята и значението на пробиотичните, пребиотичните и симбиотичните храни, правилно ги анализира, разисква и прилага, за да разработи и защити научните си дирения и да интерпретира получените резултати.

## **2.2. Цел и задачи**

Целта на дисертацията и поставените конкретни задачи са формулирани ясно и точно: комплексна характеристика на млечнокисели бактерии от домашно приготвени млечни продукти от района на гр. Битоля Р Македония, видов състав, антимикробна и ензимна активност, растеж на изолираните щамове в моделна система с казеинов хидролизат; получаване на кисело мляко, произведено с пребиотични олигозахариди; сензорен анализ; оценка и дискусия на произведеното конкретно кисело мляко.

### 2.3. Материали и методи

Разделът “Материал и методи” е представен систематизирано, точно е детерминирана целта на извежданите експерименти. Използвани са класически микробиологични и съвременни биохимични и аналитични методи. Задълбоченото изучаване на специализираната литература и прецизното изпълнение на методичния план гарантират на докторантката получаването на убедителни резултати.

### 2.4. Резултати и обсъждане

Данните са правилно обработени и систематизирани.

Идентифицирани са два вида млечнокисели бактерии: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* със системата API 50 CH, изолирани от домашно приготвени кисели продукта от Р. Македония. Бактериите се характеризират с хомоферментативен тип ферментация.

Доказана е антибактериална активност на щамове 37 и 57 на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии.

Инхибиращият агент, синтезиран от щам 37, е температурно устойчив и се отнася към групата на бактериоцините.

Стабилна антибактериална активност на суроватъчната фракция, получена след култивиране на изследваните щамове в обезмаслено мляко, проявяват щамовете 37, 57 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Str. thermophilus* - щам IC3. В средата се формират нискомолекулни белтъчни фрагменти (молекулна маса 6-8 kDa) в резултат на протеолетичната дейност на изпитваните щамове. Докторанката предполага, че антибактериалната активност се дължи именно на новообразуваните пептиди.

Установена е чувствителността на идентифицираните млечнокисели бактерии към най-често използваните в медицината антибиотици.

Определена е специфичната скорост на растеж на щамовете в среда с галакто- и фруктоолигозахариди. Изследваните щамове – лактобацили и стрептококи слабо метаболизират фруктоолигозахариди. Стрептококовите щамове се характеризират с по-висока специфична скорост на растеж в среда с лактоза. Общо проучваните млечнокисели бактерии подкиселяват еднакво добре хранителните среди с глюкоза и лактолоза.

Установена е активността на  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазата на изолираните щамове при култивиране в среда с различни добавки и в мляко с галактоолигозахариди. Щамовете не проявяват  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазна активност при прибавяне към култивационната среда на фруктоолигозахариди. Доказва се, че галактоолигозахаридите са по-слаби индуктори на  $\beta$ -галактозидаза. Средата с галактоолигозахарид най-добре се подкиселява от щамовете 34 на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и IC3 на *Str. thermophilus*.

Докторантката установява, че растежната скорост при култивиране в среда с единствен въглехидратен източник зависи от характеристиките на отделния щам.

Остатъчните количества на олигозахаридите, получени в резултат на култивирането на *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (щамове 37 и 57) в среди с фрукто- и галактоолигозахариди са определени чрез HPLC анализ. Двата щам усвояват най-интензивно галактоолигозахариди със степен на полимеризация 2 и 3. Фруктоолигозахаридите, добавени в хранителната среда, водят до много ниска специфична скорост на растеж. Докторантката предполага, че изследваните лактобацили (щамове 37 и 57) не притежават или не експресират различни гликохидролазни ензими, които хидролизират фруктоолигозахаридите.

Изследваните млечнокисели бактерии (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* щамове 37, 57 и *Str. thermophilus* - щамове IC3, IC4) продуцират различни количества млечна и оцетна киселина в зависимост от вида на използваните въглехидратни източници (лактоза, глюкоза) и мляко. Оцетна киселина се отделя само при култивиране в присъствие на галактоолигозахариди. Доказано е, че галактоолигозахаридите благоприятстват растежа на млечнокиселите бактерии.

Антибактериалната активност на щам 37 се дължи на температурно устойчиво вещество, което губи своята активност след обработка с протеиназа К. Резултатите от проведените изследвания с изолираните щамове показват, че при използването на галактоолигозахариди синтезата на антимикробни компоненти се запазва.

Използвана е моделна система с различно количество на казеинов хидролизат. Установено е, че изследваните щамове (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - 37, 57 и *Str. thermophilus* - IC3, IC4) усвояват галактоолигозахариди в среди с казеинови деривати.

Този факт докторантката приема като възможност щамове да се култивират в мляко с добавени олигозахариди.

В заключение, Ангелкова–Дойчиновски предлага при разработването на функционални храни да се използват комбинации от щамове на млечнокисели

бактерии с разнообразни свойства и с добро усвояване на олигозахаридите. На това основание е разработено кисело мляко с олигозахариди като пребиотици.

При лабораторното производство на кисело мляко се използва стандартизирано прясно мляко със закваска от щам 37 - *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и щам IC3 - *Str. thermophilus* в две различни съотношения и с добавка на олигозахариди.

При използването на закваска с преобладаване на щам IC3 - *Str. thermophilus* консумацията на галактоолигозахариди е по-висока (около 15%), което се обяснява с по-високата му  $\beta$ -галактозидазна активност.

В резултат на проведения сензорен анализ е установено, че дегустаторите предпочитат традиционния продукт. Въвеждането на пребиотици в състава на киселото мляко изисква детайлно проучване на особеностите на хранителните изисквания на потребителите в определен географски регион.

Анализът на получените от докторантката резултати отговорят на поставената цел и задачи.

## **2.5. Изводи и приноси**

Приемам направените изводи и приноси, които логично произтичат от получените резултати.

## **3. Участие на докторанта в изработването на дисертацията**

Не познавам докторанта Л. Ангелкова–Дойчиновски, но считам, че дисертационният труд е нейно лично дело, подпомогната от научния ѝ ръководител проф. дн И. Иванова.

## **4. Препоръки, забележки и въпроси**

Позволявам си да препоръчам на Л. Ангелкова–Дойчиновски правилно да използва научна терминология, да не внася елементи на методика при отразяване на резултатите, както и да прави по-задълбочено обсъждане и интерпретиране на получените резултати и заключения на фона на известните научни достижения.

Имам следният въпрос към докторанта:

1. Какъв е произходът на изолатите, от кои региони на Р. Македония и как са извършени изоляциите?
2. Какви са перспективите за щамовете с най-добри характеристики, както

и на получения от Вас млечнокисел продукт?

Считам, че допуснатите неточности са нормални при написване, оформяне и защитаване на собствените резултати, изводи и приноси на първия самостоятелен труд на всеки докторант.

## **5. Публикации във връзка с дисертационния труд**

Резултатите от настоящия дисертационен труд са отразени в четири колективни научни статии, публикувани в пълен текст в сборници от научни конференции, една глава от книга и три участия в международни форуми. Всички публикации съдържат обобщени, анализирани данни от проведените експерименти в дисертацията.

## **6. Автореферат**

Авторефератът отговаря на изискванията и отразява цялостно методите на изследване, получените резултати, изводи и научни приноси. Добре е структуриран и илюстриран с фигури и таблици, с единствена забележка, че няма списък на използваните съкращения.

## **7. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”**

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантът Л. Ангелкова–Дойчиновски разширява своята теоретична компетентност, изгражда умения за работа със специализирана литература, да анализира и обобщава научната информация, да използва разностранни методи и техники, самостоятелно да оформя, дискутира и обобщава резултатите в изводи и заключения.

## **8. Заключение**

Дисертационният труд представен от Л. Ангелкова–Дойчиновски отговаря на изискванията на ЗРАСРБ, Правилника за неговото приложение и Правилника на СУ „Св. Кл. Охридски”.

Направените изводи и приноси ми дават основание убедително да гласувам

положително и да препоръчам на научното жури, сформирано със Заповед No РД-38-104/06.03.14 на Ректора на СУ да присъди научната и образователна степен „доктор” по професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология) на Лиляна Ангелкова–Дойчиновски.

8.04.2014

София

Подпис:

(проф. дн Н. Богацевска)