

## РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури,  
сформирано със заповед № Ро038-295/08.05.2015  
на Ректора на Софийския университет „Св. Климент Охридски”  
за получаване за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор: **Мария Павлова Ананиева**

Тема: **Генна експресия на ензими, участващи в транспорта и усвояването  
на ксилоолигозахариди при млечнокисели бактерии**

Рецензент: **проф. Мария Ангелова, дбн**

За разлика от антибиотиците, про- и пребиотиците - тяхната точна противоположност, предизвикват все по-голям интерес и заемат заслужено място в топлистата на иновациите за здравословен живот. Пребиотиците са модерна концепция, дефинирана преди по-малко от 20 години, която непрекъснато доказва своята значимост и приложност за здравословния баланс в храносмилателната система. Те могат да решат редица здравословни проблеми и да стимулират имунната система. Без всякакво съмнение, това е една от водещите тенденции в съвременната хранителна индустрия. Ако към това се добави, че през 2015 г се очаква пазарът за пребиотици в Европа да достигне 1.2 млрд \$, а този в САЩ – 225 млн \$, става очевидна актуалността и перспективността на представения дисертационен труд. Трябва да се подчертае, че в лавината от публикации в тази област, огромната част от тях касаят изолиране и идентифициране на пробиотични щамове и селектиране на подходящи пребиотици. В този смисъл, въпреки огромният интерес на учените и бизнеса, остават редица нерешени въпроси. Настоящата дисертация навлиза много по-дълбоко в проблема, изследвайки механизма на действие на пребиотиците на генетично ниво. Именно това е и нейното основно предимство - изборът на темата предлага оригинални приноси. Искам да допълня, че докторантката Мария Ананиева има шансът да работи под ръководството на проф. Искра Иванова и проф. Илия Илиев, признати авторитети у нас и в чужбина в областта на про- и пребиотиците.

Основната теоретична насоченост на изследването е свързана с получаване на нови знания относно механизмите на транспорт и усвояване на нов клас пребиотици – ксилоолигозахаридите от щамове, принадлежащи към род *Lactobacillus*. В приложен

аспект, дисертацията предлага нови решения с полезен здравен ефект - селектиране на ефективни пробиотични щамове.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 126 стандартни компютърни страници и е онагледен с 30 таблици и 32 фигури. Трябва да се подчертае, че Мария Ананиева познава много добре широк диапазон от аспекти, свързани с проблема за пребиотиците. Литературният обзор е представен възможно най-пълно, целенасочено и конкретно. Всъщност, точното определение за него е - пълно представяне на съвременното състояние на проблема в световен мащаб. В обзора са отразени общо 251 публикации, от които 3 на кирилица и 248 на латиница. Над 50% от статиите са от последните 10 години, а над 25% от последните 5, което подчертава още веднъж неговата актуалност. Много добро впечатление прави и фактът, че е включен и българският опит в този аспект.

Въз основа на този задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация: да се изследва способността на щамове млечнокисели бактерии, изолирани от български продукти да усвояват ксилоолигозахариди. Според мен тя е дефинирана много по-скромно, отколкото всъщност се постига с набелязаните задачи.

Разделът "Материали и методи" демонстрира много широк набор от методи, съобразени с конкретните изисквания на експеримента. Те са както рутинни, така и съвременни, микробиологични, биохимични, молекулярно-биологични и др. Впечатление прави включването на голям брой ензимни активности; получаването на клетъчни фракции; 16S рРНК секвенционен анализ; анализ на генната експресията на ензими, отговорни за усвояването на ксилоолигозахаридите; HPLC анализ на моно- и олигозахариди, електронна и атомно-силова микроскопия и др. Освен това, методите са представени разбираемо, без излишни подробности, но достатъчно пълно, за да бъдат възпроизведени. Експериментите са проведени със съвременна апаратура, включително HPLC, сканиращ електронен микроскоп JFC-1200, спектрофотометър DU 800, система за генетичен анализ GenomeLab GeXP, Quick Start DTSC, 26 специфични праймери и съответните софтуерни продукти.

Научният труд на Мария Ананиева е сериозно и мащабно изследване на важен за теорията и практиката въпрос, което е и неговата основна характеристика. Друго достойнство на разработката е логическа последователност на експериментите, убедителният доказателствен материал, съвременното ниво на изпълнение и отправните точки за приложимост на резултатите. Това придава на дисертацията характеристика за цялостност и достоверност. Раздел „Резултати и обсъждане” започва

с проучване способността на 32 щама *Lactobacillus* да усвояват ксилоолигозахариди. Тези щамове са идентифицирани до вид чрез система за генетичен анализ GenomeLab GeXP, след което е направен подробен анализ на техните морфологични, физиологични и антибактериални свойства. В резултат са избрани 3 моделни щама от видовете *L. plantarum*, *L. brevis* и *L. sakei*. Оценявам тази особено трудоемка микробиологична и молекулярно-генетична дейност като солидна база за следващите изследвания. Тук трябва да се подчертае стремежът на автора да охарактеризира най-пълно морфологичните промени при култивиране върху ксилоолигозахариди. Чрез сканиращ и атомно-силов микроскоп, Ананиева демонстрира образуването на полизахаридна капсула - важно условие за оценка на пребитиците, тъй като осигурява по-висока жизнеспособност на пробиотичните щамове. В тази посока са и проучванията относно ензимния репертоар, отговорен за усвояването на ксилоолигозахаридите - извънклетъчна и вътреклетъчна ксиланаза,  $\beta$ -ксилозидаза и  $\beta$ -глюкозидаза в присъствие на глюкоза и ксилоолигозахариди. Като резултат от оригинално поставени експерименти е доказан индуцируемия характер на вътреклетъчната  $\beta$ -ксилозидаза и включването на ксилозата във фосфокетолазния метаболитен път. Освен това, установен е молекулният механизъм за специфичната селективност на пробиотичните щамове към олигозахариди с различна степен на полимеризация. Получените данни се потвърждават и от логически следващият раздел, в който е установена генната експресия на 10 ензима, участващи в усвояването на ксилоолигозахаридите. Докторантката сравнява нивата на експресия в присъствие на глюкоза или олигозахариди, определя участието на ABC транспортерите и доказва типа регулиране на транспортната система за по-ефективното използване на пребиотика. С това дисертацията дава заявка за оригинални приноси и поставя изследванията в тази област на ново ниво. Искам да отбележа, че в този раздел, едновременно с коректното отразяване на резултатите е представена и много убедителна дискусия на базата на литературата от последните години. Много добро впечатление прави, че освен сравняването на резултатите с постигнатото от други автори, докторантката търси нови обяснения и предлага хипотези за механизъм на действие. Това, разбира се, е възможно благодарение на много доброто познаване на проблема, задълбочената научна разработка и компетентната научна среда, в която е реализирана.

В края на дисертационния труд е оформен раздел „Дискусия”, който има характер на обобщение. В него Ананиева интерпретира получените резултати на фона на

нерешените в областта въпроси. Тази идея на автора дава възможност на читателя много точно да се ориентира в разработката и да възприеме постиженията в нея.

Искам със задоволство да подчертая много доброто оформление на дисертацията, стегнатия научен стил, на който е написана, коректното отразяване на резултатите в таблици, както и тяхното професионално представяне.

Според мен, изводите са логично следствие от експерименталните данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания. Приемам и формулировката на приносите, но считам, че те са повече от тези, представени от автора.

Към дисертацията на Ананиева имам следните бележки и въпроси:

1. По мое мнение, подразделът за идентификацията на щамовете трябва да предшества останалите.
2. Какво е значението на установения от Вас факт, че моделните щамове образуват защитна капсула при култивиране на среда с ксилоолигозахариди.
3. Как си обяснявате висока активност на ензимите ксиланаза и  $\beta$ -ксилозидаза в цитоплазмените фракции и много ниската такава в мембранните фракции.

Посочената забележка има технически характер и ни най-малко не намалява стойността на дисертацията. Отбелязвам я с презумпцията да бъде полезна за бъдещата работа на Мария Ананиева. Още повече, че извършените изследвания дават възможност да се открият сериозни теоретични приноси, както оригинални, така и потвърдителни. По същество, те се отнасят до следното:

1. Доказани са възможностите за използването на нов клас пребиотици на базата на ксилоолгозахаридите.

2. Доказано е образуването на защитна капсула около клетките на *Lactobacillus* в присъствието на ксилоолгозахариди, което е важно свойство на пребиотиците.

3. Установен е молекулярният механизъм на метаболизиране на ксилоолгозахаридите от пробиотични щамове.

4. Потвърдена е експресията на гени, кодиращи синтеза на ензимите, отговорни за метаболизма на ксилоолгозахаридите.

5. За пръв път е доказано усвояването на ксилоолгозахариди от видовете *L. plantarum*, *L. sakei* и *L. brevis* чрез ABC транспортната система.

6. Разработен е метод за експресия на гена за ABC транспортера за пренос на вещество с антибактериална активност от *L. sakei* S27 в среда с ксилоолгозахариди.

7. Разработката е солидна база за създаване на важен за медицината пребиотик.

Данните от дисертацията са включени в 3 научни статии и 6 участия в научни форуми. Всички статии са журнални, една е отпечатана в списание с IF (Biotechnol & Biotechnol Eq) и две в специализираното списание J BioSci Biotechnol. Докладите са представени на 5 международни и един национален форум. Това ми дава основание да считам, че резултатите на Мария Ананиева са получили и международно признание.

В заключение искам да подчертая, че материалът е дисертабилен, темата е изключително актуална и перспективна, експериментите са поставени методично правилно и са осъществени на високо съвременно ниво. Получените резултати са достоверни и са солидна база за следващи научни и приложни разработки, открояват се оригинални научни и приложни приноси. В процеса на обучение докторантката е усвоила широк набор от модерни методи, а така също умението да интерпретира получените резултати, да търси и критично да оценява подобни изследвания в литературата и да формулира обяснения.

Въз основа на направения разбор и като имам предвид актуалността и нивото на работата, убедено предлагам на уважаемите членове на Научното жури, сформирано със заповед № Ро038-295/08.05.2015 на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски” да присъдят на Мария Павлова Ананиева образователната и научна степен “доктор”.

01.05.2015

София

Рецензент:.....

/проф. М. Ангелова, дбн/