

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Пенка Ангелова Мончева - Софийски университет „Св. Кл. Охридски“, Биологически факултет, член на научно жури, назначено със заповед No РД-38-104/06.03.14 на Ректора на СУ „Св. Кл. Охридски“
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

Мисълта, която се предполага, че Хипократ е изказал «Нека храната бъде нашето лекарство, а лекарството наша храна» придобива все по-голямо значение днес и този въпрос вълнува еднакво както изследователи в областта на храненето, така и потребители. Функционалните храни се възприемат като такива, които съдържат специфични добавки, които им придават здравословни свойства. В тази връзка считам, че темата на дисертацията **е актуална**, тъй като е свързана с търсенето на млечнокисели бактерии с потенциално приложение в получаването на функционални млечни продукти, съдържащи олигозахариди. Последните са относително нови функционални хранителни добавки, с потенциал в подобряването на качеството на много храни.

2. Оценка на структурата на дисертационния труд

Предоставеният ми за рецензиране дисертационен труд е с обем 104 стандартни А4 страници. Структуриран е в следните раздели: Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Заключение, Изводи и Списък на цитираната литература. Структурата на дисертационния труд отговаря на изискванията за такъв род трудове и както посочих по-горе съдържа всички необходими раздели, които са в приемливо съотношение един спрямо друг по обем.

2.1. Литературен обзор

Литературният обзор е написан на добър език и в него се разглеждат въпроси, свързани с темата на дисертацията: историята на възникването на функционалните храни и ролята на млечнокиселите бактерии в тяхното създаване; функционалните и хранителните качества на олигозахаридите – като са разгледани различните видове олигозахариди; млечните продукти като функционална храна; здравните претенции, за да бъде една храна функционална; разгледани са и други аспекти при създаването на функционални храни – регулаторни, безопасност, потребителско отношение към функционалните храни; прилагането на сензорни тестове към разработването на функционални храни – разгледани са видовете тестове, техните предимства и недостатъци; перспективите в разработването на функционални храни. Литературният обзор е целенасочен, конкретен, дисертантът се е позовал на съвременни литературни източници, което потвърждава актуалността на проблема и неговото много добро познаване от страна на докторанта. Хубаво впечатление прави, че са разгледани въпроси от рода на такива за здравните претенции, безопасност, регулаторни въпроси, както и сензорния анализ и видовете тестове при него, което обикновено не се засяга в дисертации от подобен род. Считаю, че изследователите в тази област трябва да познават и тези страни на въпроса. Литературният обзор представя докторанта като теоретично много добре подготвен, запознат със съвременните тенденции в създаването на функционални храни, регулаторните аспекти и тяхното оценяване. Хубаво впечатление прави цитирането на съвременни литературни източници, които показват най-новите аспекти в разработвания проблем. Цитирани са 147 литературни източника, 56% от които от последните 10 години.

2.2. Цел и задачи

Дисертационният труд има ясно поставена цел, а именно да се изолират и характеризират щамове млечнокисели бактерии от млечни продукти от Балканския регион с оглед тяхното използване в получаването на функционални млечни храни, съдържащи пребиотични олигозахариди.

За осъществяването на целта са поставени 8 конкретни и добре формулирани задачи.

Като забележка към този раздел бих посочила отсъствието на задача, свързана с изолирането на щамовете, което се съдържа и в самото заглавие на дисертационния труд.

2.3. Материали и методи

В раздела Материали и методи са описани всички използвани от докторанта материали и методи при изпълнението на поставените задачи. Използвани са класически микробиологични методи, съвременни биохимични и аналитични методи. Считаю, че методите са подбрани правилно и дават възможност за изпълнение на задачите и получаване на възпроизводими резултати.

Катозабележка към този раздел бих отбелязала отсъствието в Табл. 1 на информация за региона, от който са изолирани щамовете, както и описание на процедурата на тяхното изолиране.

2.4. Резултати и обсъждане

В този раздел е представена информация за изолирането, морфологичното и биохимично охарактеризиране на щамовете. Видовата идентификация на щамовете е извършена със системата API 50 CH. Изследвана е антибактериалната активност на щамовете, като за два от щамовете е доказано наличието на активност срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, а за природата на инхибиращия агент, синтезирана от един от щамовете се изказва предположение, че има бактериоцинова природа. Изследването на антибактериалната активност на суроватъчната фракция, получена след култивиране на щамовете в обезмаслено мляко показва, че активност имат три щама. Трис-триционовата електрофореза на суроватъчната фракция показва, че в нея са се формирали нискомолекулни белтъчни фрагменти с молекулна маса 6-8 kDa, за които авторите смятат, че имат антибактериална активност и които са получени в резултат на протеолитичната активност на щамовете.

Показана е чувствителността на щамовете по отношение на 6 антибиотика от различни групи като данните са представени като милиметри инхибиторна зона. Не би било лошо тези резултатит да са трансформирани съгласно критериите на NCCLS, за да се придобие представа за резистеност или устойчивост става дума. Вярно е, че за повечето антибиотици зоните са с много голям диаметър, но има и такива, за които това не е така и там не става ясно каква е степента на чувствителност (напр. стрептомицина).

Проследен е растежът на щамовете и усвояването от тях на галакто- и фруктоолигозахариди чрез определянето на специфичната скорост на растеж. Установява се, че щамовете слабо метаболизират фруктоолигозахариди, като най-висока специфична скорост на растеж е установена за два от представителите на род *Lactobacillus*. Галактоолигозахаридите се метаболизират доста по-добре от всички изследвани щамове, като най-високи показатели са установени за три щамове на вида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и един на вида *S. thermophilus*. Изследвана е активността на α - и β -галактозидазата на щамовете при култивиране в MRS с различни добавки и в мляко с галактоолигозахариди. Установено е, че галактоолигозахаридите са по-слаби индуктори на β -галактозидаза. При използването като добавки на фруктоолигозахариди щамовете не проявяват както α -, така и β -галактозидазна активност. Чрез HPLC анализ на остатъчните количества на олигозахаридите след култивиране на два от щамовете в среди с добавени фрукто- и галактоолигозахариди се установява, че най-интензивно се усвояват галактоолигозахариди със степен на полимеризация 2 и 3, като е наблюдавана щамова специфичност в това отношение. Фруктоолигозахаридите осигуряват много ниска специфична скорост на растеж, на базата на което дисертантът предполага, че те не притежават или не експресират ензими, отговорни за хидролизата на фруктоолигозахариди. Приведени са данни за продукцията на млечна и оцетна киселина при ферментации с олигозахариди. Установено е, че оцетна киселина се продуцира само при култивиране в присъствие на галактоолигозахариди. Въз основа на получените резултати се прави извод, че галактоолигозахаридите спомагат за растежа на млечнокиселите бактерии. Проследена е антибактериалната активност на неутрализирани супернатанти, получени след култивиране на два от щамовете в среди с олигозахариди, при което е установено, че един от щамовете синтезира антибактериална субстанция, която губи своята активност след третиране с протеиназа K, но не и след температурно третиране. Изследван е растежът на изолираните щамове в казеинов хидролизат, който е използван като моделна система, като в резултат се потвърждава способността на щамовете да усвояват галактоолигозахариди, от което авторите заключват, че те биха могли да се култивират в мляко с добавени олигозахариди. Това е дало основание за получаване на кисело мляко на базата на олигозахариди като

пребиотици. С използването на два щама, съответно на вида *L. dlbrueckii* subsp. *bulgaricus* и на *S. thermophilus* в две различни съотношения се прави лабораторно производство на кисело мляко на базата на стандартизирано прясно мляко с добавени олигозахариди. Направен е анализ на остатъчните количества олигозахариди в готовия продукт, при което е установено, че при използването на закваска със съотношение на пръчките към коките 1:2 консумацията на галактоолигозахариди е по-висока (около 15%). Проведени са два типа сензорен анализ – описателен и афективен при строго спазване на изискванията за провеждане на сензорен анализ. Резултатите са обработени, в резултат на което се оказва, че 50% от консуматорите харесват млека, обогатени с двата олигозахарида, като не се установява значима разлика в предпочитанията към олигозахаридите. Дисертантът прави извод, че вкусът към традиционните продукти трудно се променя и че включването на функционални добавки, каквито са изследваните в дисертацията олигозахариди изсква специално разработени стратегии за култивиране на вкус у потребителя към новите асортименти на млечните продукти. Резултатите са представени в добре оформени 14 таблици и 13 фигури и са коментирани на фона на известното в литературата по разработваната тема, като дисертантът се е позовал на най-съвременни литературни данни. Считам, че получените резултати съответстват на поставените задачи, и целта е постигната. Проведени са достатъчно на брой експерименти в необходимата повтораемост, за много от данните е направена и статистическа обработка.

2.5. Изводи и приноси

На базата на проведените експерименти и получените резултати дисертантът прави 7 извода, които считам, че са добре формулирани и произтичат от получените резултати. Позволявам си да отбележа, че принос номер 1 би могъл да бъде формулиран по друг начин, за да не звучи като принос.

Напълно съм съгласна с приносите на този труд.

3. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Познаван докторанта Лиляна Дойчиновски като много добре подготвен специалист в областта на темата на нейната дисертация. Дисертацията е нейно лично дело, в което не се съмнявам, още повече, че видът на

докторантурата е такъв, че предполага преимуществено нейно лично участие.

4. Препоръки, забележки и въпроси

Към дисертацията имам дребни забележки, които съм посочила при коментара на структурата и съдържанието на труда. Те имат технически характер и не променят положителното ми отношение към него. Към тях бих добавила липсата на литературен източник за използваната програма IBIS. На места се използват изрази, които не са на български език, но имат български еквивалент (напр. афилирам, вместо онасям до определен таксон и др.), което отдавам на това, че докторантът е чужденец.

Към докторанта имам следните въпроси:

1. Каква е причината данните от API 50 CN тестовете да бъдат обработвани с програмата IBIS, а не със софтуера към системата API?
2. По какъв метаболитен път се разграждат галактоолигозахаридите, за да се получи в резултат на ферментацията и оцетна киселина?
3. Какъв е принципът по който са избрани антибиотиците, към които е изследвана антибиотичната чувствителност?

5. Публикации във връзка с дисертационния труд

Дисертантът Лиляна Дойчиновски има 5 научни труда, един от които под печат. Един от трудовете представлява глава от книга, тематиката на която е свързана с дисертационния труд. Г-жа Дойчиновски има и три участия в международни научни форуми.

6. Автореферат

Авторефератът е изготвен по модела, по който е изработена дисертацията като в съкратен вид са представени най-важните неща от всички раздели (без литературния обзор). Информацията, включена в автореферата вярно отразява онази, съдържаща се в дисертационния труд.

7. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор“

Предвид на това, че дисертантът Лиляна Дойчиновски е била в задочна докторантура и е притежавала предварително умения в областта на дисертационния труд, бих добавила само, че тя е доразвила своите теоретични и практически умения, както и тези да оформя самостоятелно научни трудове от подобен характер.

Считам, че тя притежава компетентност, знания и умения, които напълно съответстват на образователната и научна степен „доктор“.

8. Заключение

Изработването и оформянето на дисертационния труд, включващо получените резултати, тяхното представяне и дискутиране ми дават основание да смятам, че в процеса на докторантурата Лиляна Дойчиновски е придобила теоретични знания и методични умения напълно съответстващи на третата степен на обучение в Софийски университет „Св. Кл. Охридски“. Извършено е изследване на съвременно ниво, съчетаващо класическите методи на микробиологията със съвременни аналитични. Методите са подходящо избрани, така, че да могат да решат успешно поставените задачи, с което целта да бъде постигната. Смятам, че обемът и съдържанието на този труд са напълно достатъчни, направени са много анализи, получени са ценни резултати, направени са важни изводи. Дисертационният труд има приложни приноси, които могат да послужат за по-нататъшно развитие на изследванията с оглед на практическо приложение на разработката. Направените от мен забележки не се отнасят до същността на работата и имат технически характер. Те не омаловажават достойнствата на труда.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академичния състав в Република България и този на СУ „Св. Кл. Охридски“ считам, че настоящият труд отговаря на изискванията за докторска дисертация, оценявам го положително и препоръчвам на почитаемото научно жури, сформирано със Заповед на Ректора на СУ РД 38-.2013 г да присъди на г-жа Лиляна Дойчиновски научната и образователна степен „доктор“ по професионално направление 4.3. Биологични науки (Микробиология).

04.2014 г.
София

Рецензент:
(проф. д-р Пенка Мончева)