

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р Илия Николов Илиев,

катедра „Биохимия и микробиология” при ПУ „Паисий Хилендарски” – Пловдив

Относно: дисертационен труд на тема „**Проучване на пробиотичния капацитет на млечнокисели бактерии, влизаци в състава на стартерни култури за различни видове сирене**” представен от докторант Живка Кръстева Атанасова от катедра „Обща и промишлена микробиология” към СУ „Св. Климент Охридски“ за придобиване на образователна и научна степен „ДОКТОР” по професионално направление по област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Микробиология.

Получени материали: Дисертация, автореферат, списък с публикации по дисертацията, папка с материали, описани в заявление на дисертантката в 9 позиции, CD с материали по дисертацията.

Със заповед № РД 38-294/08.05.2015г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ съм определен за член на научно жури за защита на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор” от докторант Живка Кръстева Атанасова на тема „ **Проучване на пробиотичния капацитет на млечнокисели бактерии, влизаци в състава на стартерни култури за различни видове сирене**”. Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в лаборатория «Микробиология» на НИРД в «Ел Би Булгарикум» ЕАД, в катедра «Обща и промишлена микробиология» към СУ „Св. Климент Охридски“ и в INRA Center Nantes, Франция.

Представяне на докторантката

Госпожа Живка Кръстева Атанасова е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка със заповед на ректора на СУ „Св. Климент Охридски“ № РД 20-1009/30.06.2014г. към катедра „Обща и промишлена микробиология“. Живка Атанасова получава диплома за висше образование № 111155 на 20.03.1990г. след успешно преминаване на пълния курс на обучение по специалност биология на СУ „Св. Климент Охридски“ в периода 1983 – 1989 г.

От октомври 1989г. до момента работи в „Ел Би Булгарикум“ ЕАД, като последователно заема различни ръководни длъжности – ръководител лаборатория, управител на производствена база, мениджър „Осигуряване на качеството“. Научен сътрудник е към НИРД на „Ел Би Булгарикум“ ЕАД от 2000 г. Има няколко успешни специализации в областта на контрола на храните.

Актуалност и значимост на темата на дисертацията

В индустриализирания свят много инфекциозни заболявания се разпространяват чрез храните и могат да достигнат ниво на епидемия. Поддържането на здравния статус при съвременния човек налага използването на нови функционални компоненти, които да контролират микробиалната популация от полезни микроорганизми в гастро-интестиналния тракт и да се използват като бариера срещу навлизането на патогенни микроорганизми. Известен е интересът на хранителната промишленост от една страна към производството на функционални и здравословни храни. Голяма част от тях са ферментирани храни с участието на млечнокисели бактерии. От друга страна фармацевтичната индустрия интензивно разработва пробиотични, пребиотични и симбиотични препарати, които да се използват за контрол на чревната микрофлора при човека, имуномодулация, намаляване холестерола в кръвта и други показатели, свързани с риска от заболявания на сърдечно-съдовата и гастроинтестиналната система.

Предлаганата дисертационна работа е по актуална тематика в областта проучване на пробиотичните свойства на избрани производствено значими щамове млечнокисели бактерии, които се използват при производството на закваски за българско бяло саламурено сирене. Независимо че, има различни изследвания върху щамовете МКБ за производство стартерни култури, посоката на проведените изследвания в настоящата дисертация показват едно съвременно научно мислене по проблемите на пробиотиците. Освен това много обещаващи са изследванията върху биоактивните пептиди в този традиционен български продукт, което би създавало условия за производството на здравословни хранителни продукти с ясно определен здравословен ефект.

Анализ на дисертационния труд

Дисертацията е оформена по стандартен за България модел, написана е на 182 стандартни машинописни страници, първите десет от които не са включени в общата номерация, и съдържа следните основни глави: Съдържание – 5стр., Увод

– 1 стр., Литературен обзор – 41 стр., Цел и задачи – 2 стр., Материали и методи – 18 стр., Резултати и обсъждане – 85 стр., Изводи – 2 стр., Приноси – 1 стр., Литература – 17 стр., Публикации, свързани с дисертацията – 2 стр. Литературният преглед и резултатите са удачно онагледени с 41 фигури и 22 таблици. Докторант Живка Атанасова е използвала достатъчно голям брой литературни източници общо 274, от които 16 на кирилица и 258 на латиница, 44% от които са след 2000г.

Литературният обзор фокусира вниманието ни върху последните научни търсения и достижения относно млечнокиселите закваски, млечнокиселата флора на сирената, функционалните храни и пробиотиците, биологично-активните протеини. Авторката на дисертацията специално е разгледала и някои технологични проблеми и успехи при използването на козето мляко и производството на бяло саламурено сирене. В резултат на направения литературен обзор, авторката на дисертацията ясно формулира целта на изследването, която включва две подцели – от една страна да се проучи пробиотичния капацитет на млечнокиселите бактерии от състава на закваските за сирене и определянето на показатели за дефиниране на бялото саламурено сирене като функционална храна. Постигането на целта изисква решаването на множество разнообразни задачи, които докторантката е формулирала спрямо двете основни направления на изследването.

В раздел „Материали и методи” са описани прецизно основните методи, които са прилагани при изпълнението на поставените задачи в дисертацията. Мащабността на заложения експеримент при разработването на дисертационния труд изисква прилагането на голям брой както класически, така и съвременни микробиологични, физикохимични, биохимични и ензимологични методи, които дисертантката е усвоила. Трябва специално да се отбележи прилагането на специфични хроматографски и мас-спектрометрични методи за охарактеризиране структурата на пептидите, което придава много висока научна стойност на получените резултати. Всичко това е основание да се счита че Живка Атанасова е придобила необходимия методичен опит при извеждане на научен експеримент.

Резултатите от направените изследвания са представени детайлно в раздел „Резултати и обсъждане” като са разделени в седем отделни точки и онагледени в 10 таблици и 36 фигури. Докторантката стартира с определяне антимикробната активност на щамовете млечнокисели бактерии, включени в стартери. За да охарактеризирам мащабността на проведения експеримент ще подчертая, че докторантката изследва общо 22 закваски (7 за бяло саламурено сирене, 13 за кисело мляко и 2 за кашкавал) и общо 72 щамата като монокултури от 6 различни

вида млечнокисели бактерии. Докторантката Живка Атанасова проучва описаните закваски и щамове и по отношение на протеолитичната и антихолестеролната им активност, показатели свързани с техните пробиотични свойства. Авторката установява щамовата специфичност по отношение на трите изследвани показателя и възможността за комбинирането им в определни закваски. С най-широк спектър на антимикробна активност са установени 5 монокултури: *L. helveticus* Q40, *L. delbrueckii lactis* 1043, *Str. thermophiles* t12, *L. bulgaricus* b21 и *L. bulgaricus* b5 и стартерните култури за кисело мляко ВУ21 и ВУ24. Протеолитичната активност е определна по ОРА спектрофотометричен метод при култивиране на козе и краве мляко и като цяло тя е по-висока при култивиране на козе мляко. С най-висока протеолитична активност са 4 щамове: *L. lactis* 1598, *L. bulgaricus* b39, *L. delbrueckii lactis* 1043 и *Str. thermophiles* tc1. Единствено щам *L. delbrueckii lactis* 1043 показва едновременно най-високи показатели за антимикробност и протеолитична активност. Интересни резултати са получени и по отношение на антихолестероловата активност. Установено е например, че щам *L. lactis* L598 редуцира съдържанието на холестерол на 90% докато щамове от *L. bulgaricus* намаляват холестерола в рамките на 60 – 70 %. Единствено щам *Str. thermophiles* t12 показва както антимикробна така и антихолестеролова активност, като редуцира холестерола до 73%.

В следващия етап от изследването докторантката Живка Атанасова проследява възможността да се образуват нискомолекулни пептиди от изследваните щамове и закваски. Най-висока степен на хидролиз на млечните протеини се постига от щамове *L. bulgaricus* b5 и *Str. thermophiles* t12, които се очертават като най-перспективни за обявяването им като пробиотични щамове. От изследваните закваски най-висока степен на хидролиз се постига с ВУ2 и ВУ5-12. Резултатите от проверка преживяемостта на монокултурите и закваските в условията на стомашен сок и интестинален сок още веднаж доказват тяхната чувствителност особено към стомашен сок. Това предопределя използването на специфични технологични схеми и специфични покрития за защита на пробиотичните щамове млечнокисели бактерии. Все пак е установено, че щам *Str. thermophiles* tc1 показва най-висока степен на преживяемост – 80%.

Едно от важните свойства на пробиотичните щамове е да адхезират успешно върху епителните клетки на чревната лигавица. Проведен е ин витро експеримент с използване на клетъчната линия Сасо-2. Резултатите показват отново щамова специфичност по този показател, като е намерен щам с най-висока степен на адхезия 62% - *L. bulgaricus* b21.

Най-висока научна стойност имат резултатите за идентификация на биоактивните пептиди, изолирани от различни видове бяло саламурено сирене, след различен период на зреене. Доказани са секвенциите на биоактивните пептиди по два метода LC/MS/MS – изследвани са 2000 пептида и MALDI-TOF изследвани са 3000 пептида. Установени са различен брой биоактивни пептиди след 30 дни зреене при трите различни вида сирена: краве сирене – 51 пептида, овче сирене – 31 пептида, козе сирене – 22 пептида. По-голямата част от идентифицираните биоактивни пептиди са ACE-инхибитори. Най-голямо е количеството на фрагментите от козе сирене α S1-CN(f1-9; f24-30) и β CN(f194-209 и F203-219). Идентифицирани са пептиди, получени от хидролизата на α S1, α S2 и β -казеини. Установени са ACE-инхибиторни пептиди като VPP и IPP, за които е интересно да се разработи технология за получаване.

Всички резултати са представени и дискутирани в отделните глави от раздела „Резултати и обсъждане”, които логично следват хода на решаването на поставените задачи. Необходимо е да се отбележи факта, че докторантката представя много оригинални данни от направеното проучване особено що се касае за биоактивните пептиди от българско бяло саламурено сирене, при участието на български закваски.

В резултат на проучването докторантката е формулирала 14 извода, които по принцип следват хода на изследването и решаването на задачите.

Докторантката има един изключително оригинален и няколко основни научни приноси според мен:

- 1 За първи път е доказана възможността за получаване на биоактивни пептиди с различни функционални свойства след зреене на българско бяло саламурено сирене, което предварително е подквасено с оригинални български закваски.
- 2 Доказани са няколко пробиотични свойства, които притежават някои от изследваните щамове млечнокисели бактерии.
- 3 Доказан е синергистичен ефект на пробиотичните свойства на щамовете, поставени в закваска и проявени при производството на бяло саламурено сирене.

Автореферат и публикации

Дисертацията, независимо от обема си, е написана на ясен и стегнат научен език. Авторефератът отговаря напълно на целите, задачите и постигнатите резултати в дисертационния труд.

Резултатите от дисертацията са публикувани в четири научни публикации, в две от които докторантката е първи автор. Три от публикациите са в списания с импакт фактор. Една от публикациите е цитирана 14 пъти, което е отличен атестат за оригиналния характер на проведеното изследване. Резултатите от дисертацията са представени и на 5 научни форума, 2 от които са международни. Експерименталната работа в дисертацията е част от изпълнението на един научен проект.

Въпроси, забележки и препоръки

Към докторатката имам следните въпроси:

1. При изследване антихолестероловата активност на щамовете имате ли данни за тяхната обща липолитична активност и нейното влияние за вкусовите качества на крайния продукт?
2. В каква степен условията, при които се обработва суровината с ензима ренин повлияват получаването на биоактивни пептиди в процеса на зреене на сиренето в присъствие на закваска с определени протеолитични ензими?

Към докторатката имам следните препоръки:

1. При формулиране на задачите, задача 1.4 би могло да се прередактира.
2. Допуснати са някои неточни изрази в раздел „Материали и методи“: „биоаналитична наука“, „сирене на различна възраст“, „слаби киселинообразувачи“.
3. Изразът от стр. 98 „Киселото мляко е един от най-старите пробиотици, използвани от човека“ не е коректен спрямо възприетото определение за пробиотици.
4. Изводите според мен са много на брой и предлагам обединение на изводи 10 и 14, както и на 11, 12 и 13. В изводи 7 и 8 да се цитират конкретни цифри за да се избегне описателния характер на изводите.
5. В литературата някои цитати са некоректни и непълни (20, 21, 57, 180, 267).

Заклучение:

Оценката ми за дисертационния труд, автореферата, научните публикации и научните приноси на докторантката Живка Кръстева Атанасова е напълно положителна. Въпреки направените препоръки, бих искал да отбележа още веднаж достойнствата ѝ – на първо място

една мащабна по размер изследователска работа, надхвърляща значително необходимия минимум за една дисертация, съдържаща огромно количество резултати, правилно интерпретирани и обобщени. Оригиналният характер на получените данни за биоактивните пептиди в бяло саламурено сирене разкриват переспективи за получаване на здравословни храни с конкретен профилактичен и лечебен ефект на базата на технологията за бяло саламурено сирене и оригинални български закваски. Открива се възможност за производство на оригинални пробиотични стартери за различни млечни продукти.

Представената дисертация напълно отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за неговото прилагане. Постигнатите резултати ми дават основание да предложа да бъде присъдена образователна и научна степен „доктор” на **Живка Кръстева Атанасова** по професионално направление по област на висше образование 4.Природни науки, математика и информатика; професионално направление 4.3 Биологически науки; научна специалност по Микробиология.

31.05.2015г.

Изготвил:

Пловдив

(проф. д-р Илия Илиев)