

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Искра Иванова, д.б.н., СУ „Св. Климент Охридски”, Биологически факултет, Катедра „Обща и промишлена микробиология”

върху дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № РД-19-180/28.04.2011 на Ректора на Софийски университет „Св. Климент Охридски” за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор на дисертационния труд: Гергана Стоянова Добрева-Йосифова

Тема на дисертационния труд: “ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ МЛЕЧНО КИСЕЛАТА МИКРОФЛОРА НА БЪЛГАРСКИ РЪЖЕНИ КИСЕЛИ ТЕСТА”

Зърнените храни са съпровождали еволюцията на човешката цивилизация и представляват хранителна основа за преобладаващата част от населението по света. Тези храни са консумирани в по-голямата си част директно след варене. В някои случаи, като житото и ръжта, те са обект на една първоначална трансформация в брашно и последваща употреба в храни след трансформация чрез различни технологии като ферментациите например. Голямо е многообразието в използваните ферментационни технологии при зърнените храни, дължащо се на разнообразие в изходните суровини (жито, ръж, ориз, овес, ечемик), използваните технологии (ензимно третиране, ферментация, дистиляция, варене), както и на получените продукти (ферментирани напитки на основата на зърнени култури – като квас, боза, напитки, получени чрез дистиляция, хлебни продукти).

Хлябът е основна част от човешкия хранителен режим. Производството на хляб от кисело тесто датира от древен Египет преди 1500 г. пр. Хр. и вероятно това е бил първият начин за подквасване, използван в пекарството. Този начин се използва и в средните векове, след като се замества с подквасване от бирената мая, а по-късно и от култивирани дрожди. Продуктите от кисело тесто се характеризират с благоприятни технологични качества, богата микрофлора, уникален вкус и висока хранителна стойност. Присъствието на млечно киселите бактерии като доминантна популация в микрофлората на киселите теста е ендемично специфично. В България не са провеждани изследвания върху микрофлората на ръжените кисели теста. Ето защо, представеният от Гергана Добрева-Йосифова дисертационен труд на тема *„Проучвания върху млечно киселата микрофлора на български ръжени кисели теста”* е изключително интересен и дава информация за състава, биологичните и

технологичните свойства на млечно киселата микрофлора на ръжените кисели теста, както и разкрива възможност за разработване на полезни, качествени и разнообразни хлебни продукти и здравословни храни.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 175 стандартни страници с отличен научен стил, включващи увод – 1 страница, литературен обзор – 44 страници, цел и задачи – 2 страници, материали и методи – 16 страници, резултати и обсъждане – 78 страници и литература – 29 страници. Трудът е онагледен с 37 фигури и 25 таблици. Цитирани са 293 литературни източника, като от тях 11 са на кирилица и 282 на латиница.

Литературният обзор е правилно структуриран и има пряко отношение към целите на дисертацията и поставените задачи. Обзорът на дисертационният труд е изготвен възможно най-пълно и засяга важни аспекти на съвременната микробиология. Той може условно да бъде разделен на 4 части.

Първата част съдържа информация за киселата ферментация на хляба и млечно киселите бактерии като основен компонент в микрофлората на киселите закваски. Във втората, по-голяма част от обзора, авторката подробно разглежда млечно киселите бактерии, тяхната обща биохимична и таксономична характеристик, както и съвременните подходи за тяхната идентификация в кисели теста. Тук, авторката разглежда както класически и хемотаксономични подходи, така и молекулни методи за идентификация и типизиране. Бих искала да отбележа, че са разгледани всички използвани методи като 16S рДНК секвениране и PCR техники. Много добро впечатление прави таблица 4 в литературния обзор, в която Гергана Йосифова е представила предимствата и ограниченията при прилагането на основните молекулни техники за микробна идентификация. Третата част от дисертацията разглежда млечно киселите бактерии като пробиотици. Тук авторката подробно описва подходите при подбора на пробиотични щамове. В четвъртата част са разгледани млечно киселите бактерии в производството на хляб, като акцентът е главно върху подкисляващата способност на млечно киселите бактерии, тяхната протеолитична активност и антимикуробна активност. В тази част от литературният обзор има много конкретни данни за млечно киселите бактерии, изолирани от кисели теста по отношение на продукция на бактериоцини, спектър на антимикуробна активност и противогъбна активност.

Въз основа на направения задълбочен литературен преглед и ясно дефинираната цел на настоящата разработка, дисертантката много успешно поставя 6 конкретни и

логически свързани задачи, чието изпълнение ще доведе до реализацията на определената цел - изучаване на млечно киселата микрофлора на български ръжени кисели закваски и подбор на щамове с биологично и технологично значими свойства.

Разделът „Материали и методи” представлява важна част от дисертационният труд, която показва нивото на научните изследвания. Представени са съвременни микробиологични, молекулно-аналитични, молекулно-генетични методи и методи, свързани с приготвянето на ръжените закваски. В този смисъл, смелото им овладяване и успешно прилагане е един безспорен успех. Заслужава да се подчертаят методите 16S рДНК секвениране, RAPD-PCR, рестрикционен анализ на амплифицирани рДНК (ARDRA), които показват съвременното ниво на проведената експериментална работа от дисертантката.

Разделът „Резултати и обсъждане” обхваща 78 страници от дисертационният труд. Той представя една работа с изключителна стойност както за съвременното изучаване на микрофлората на български кисели закваски, така и за подбор на микроорганизми с технологично значими свойства. Представените резултати позволяват да се отговори на всички поставени задачи, като те са последвани от обективна дискусия в светлината на досегашните съвременни изследвания. Смятам, че получените резултати са убедителни и тяхната достоверност не подлежи на съмнение. Следвайки логическата последователност на поставените задачи, авторката:

1. Характеризира отделните етапи на спонтанната ферментация на ръжени брашна от различни географски райони на страната до получаването на „кисело тесто”. Резултатите показват, че при спонтанната ферментация микрофлората на трите изследвани кисели закваски след 24 час се ограничава до популация от млечно кисели бактерии и дрожди.
2. Изолира млечно кисели бактерии от трите ръжени кисели закваски и създава лабораторна колекция. Тук бих искала да отбележа, че не са провеждани изследвания върху киселите теста и тяхната микрофлора в България, поради което създадената лабораторна колекция е изключително ценна.
3. Провежда полифазно- таксономична характеристика на представителна извадка от млечно кисели бактерии от три ръжени кисели закваски. За начално определяне Йосифова използва физиолого-биохимични характеристики, включващи използване на API тест. Получените резултати се прилагат от авторката в молекулно-таксономичното изследване на млечно киселите бактерии. Видиво-специфичният PCR анализ и секвенционният

анализ на 16S рДНК доказват присъствието на следните видове млечно кисели бактерии в трите закваски: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus brevis* и *Pediococcus pentosaceus*. Тъй като важни пробиотични и технологични свойства на млечно киселите бактерии се определят като щамово специфични, за проучване на вътревидовото разнообразие сред идентифицираните млечно кисели бактерии дисертантката прилага RAPD-PCR анализ. Направеното обобщение на полифазно-таксономичната идентификация на млечно киселите бактерии от български ръжени закваски може успешно да послужи при бъдеща генетична паспортизация на тези изолати. Трябва да се отбележи, че са усвоени и творчески приложени набор от съвременни молекулни методи, широко използвани в таксономичните изследвания. Оценявам високо комплексния полифазен подход. Като логически завършек е представена много добре онагледена таблица, която обобщава полифазно-таксономичната идентификация на млечно киселите бактерии от български ръжени кисели закваски.

4. *In vitro* характеризира някои пробиотични свойства на изследваните млечно кисели бактерии. Установява, че 2 от изследваните 23 щамове показват добра преживяемост в моделна система на гастроинтестинален тракт, притежават устойчивост към най-често използваните в клиничната практика антибиотици и проявяват антимикробна активност спрямо патогени, което позволява тяхното определяне като потенциални пробиотични щамове.
5. Провежда подбор на изолираните млечно кисели бактерии по значими технологични свойства. Тук Йосифова изследва подкисляване на средата, устойчивост към различни концентрации на натриев хлорид, проучва протеолитичната и амилолитичната им активност, както и преживяемостта им при процеса на лиофилизация. Установява, че 3 от изследваните щамове млечно кисели бактерии (*L. plantarum* b1, *L. brevis* b47 и *L. brevis* b70) активно подкисляват средата и имат добра устойчивост към натриев хлорид. Антагонистични качества проявяват щамове *L. paraplantarum* b48 и *L. plantarum* c45. Дисертантката доказва присъствието на щамове млечно кисели бактерии с протеолитична и амилолитична активност в българските ръжени кисели закваски. Особен интерес представляват щамовете, съчетаващи тези две метаболитни активности, като напр. *L. plantarum* b32, *L.*

brevis b43, *L. brevis* c16a, *L. brevis* c23 и *L. brevis* c28. Висок е процента на преживяемост на изследваните щамове след лиофилизация.

6. Прави оценка на приложимостта на избрани щамове млечно кисели бактерии като стартерни култури за производство на ръжен хляб. Успешно са създадени прототипи на стартерни култури млечно кисели бактерии. Комбинацията от хетероферментативния щам *L. brevis* c16a с *L. brevis* b47 и *P. pentosaceus* b22 е с най-подходящи технологични показатели за млечно кисела ръжена закваска при производство на хляб с добри органолептични характеристики.

Бих искала да подчертая, че дисертационният труд на Гергана Йосифова се отличава с много добра дискусия, в която са включени публикациите и на български специалисти в областта на хранителните технологии. Много добро впечатление прави и оформлението на дисертацията, стегнатия ѝ научен стил и професионалното и коректното отразяване на резултатите в таблици и графики.

Направените от мен забележки при аprobацията са взети под внимание. Бих искала да задам следните въпроси:

1. Как бихте интерпретирали резултатите от наблюдаваното от вас видово разнообразие на млечно киселите бактерии в българските ръжени закваски спрямо докладваните видове млечно кисели бактерии в други кисели закваски по света?
2. Какви бяха мотивите ви при подбора на молекулярно- генетични методи в полифазно-таксономичната схема на характеризиране на млечно киселите бактерии от ръжени кисели закваски?
3. Каква е връзката между ръжените амилази и рН стойността на киселото тесто?

В дисертационния труд на Гергана Добрева- Йосифова се открояват значителни научно-приложни приноси:

1. За пръв път са проведени системни изследвания на микрофлората на български ръжени кисели закваски от различни географски райони на страната.
2. Създадена е първата у нас колекция от щамове млечно кисели бактерии и дрожди от български ръжени кисели закваски и е характеризирано видовото разнообразие на представителите от тази екологична ниша.

3. За първи път се докладва наличието на шамове млечно кисели бактерии, отговарящи на *in vitro* критериите за подбор на пробиотични култури в тази екологична ниша.
4. Научен и приложен принос имат получените за първи път данни за видовете доминиращи млечно кисели бактерии в български ръжени закваски, тяхната киселинообразуваща способност и антагонистично действие срещу микроорганизми развалящи храните.
5. Част от подбраните култури с пробиотичен потенциал могат да послужат за разработката на диетични ферментационни храни на зърнена основа, адресирани към консуматори с лактозна непоносимост и алергии към млечни продукти и да способстват развитието на пазара на функционални храни у нас.
6. Успешно са създадени прототипи на стартерни култури млечно кисели бактерии с подходящи технологични показатели за производство на ръжен хляб с добри органолептични свойства.

Изследванията във връзка с дисертацията са отразени в 5 научни публикации, в 4 от тях, Гергана Добрева-Йосифова е пръв автор, което допълнително потвърждава фактът, че тя има основно и водещо участие в изработването на дисертационния труд.

В заключение бих искала да отбележа, че поставената интересна и актуална цел на дисертационния труд е постигната. Дефинираните конкретни задачи са изпълнени с използването на съвременни и модерни подходи. Представеният дисертационен труд представлява едно цялостно и завършено научно изследване, което предоставя ценна научна информация и разкрива възможности за практическо приложение.

Дисертацията отговаря на всички изисквания за присъждане на автора й образователната и научна степен „доктор”.

16.06.2011 г.

София

Рецензент:.....

(проф. дбн. И. Иванова)