

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд, представен за защита по процедура за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по професионално направление 4.3. Биологически науки (Микробиология)

Тема: „Характеристика на пробиотичния потенциал на млечнокисели бактерии с различен произход“

Автор: редовен докторант **Йорданка Димитрова Дерменджиева**

Научен ръководител: **проф. д-р Петя Христова**

Рецензент: **доц. д-р Траяна Недева**

Биологически факултет на СУ „Св. Климент Охридски”

Настоящата рецензия е изготвена в съответствие с нормативните документи – Закон за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и Препоръките на Факултетния Съвет на Биологически Факултет за критериите при придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в СУ за професионално направление „Биологически науки”, съобразени с тях.

1. Съвременно състояние на научния проблем и актуалност на дисертационната тема

Млечнокиселите бактерии (МКБ) са микроорганизми - космополити, които могат да бъдат открити в растенията, чревната лигавица на бозайниците и различни ферментирали храни. Те се използват широко в здравословни и функционални хранителни формулировки като стартерни култури за получаване на ферментирали продукти. Употребата им е гарантирано безопасна, благодарение на GRAS статуса им.

МКБ се считат за основна група пробиотични бактерии. Някои от ползите за здравето, за които се твърди, че МКБ като пробиотици предоставят, включват подобряване на нормалната микрофлора, предотвратяване на инфекциозни заболявания и хранителни алергии, намаляване на серумния холестерол, антиканцерогенна активност, стабилизиране на бариерната функция на чревната лигавица, свойства на имуно-адюванти, облекчаване на симптомите на заболяване на червата и подобряване на усвояването на лактозата при лактозо-нетолерантни гостоприемници.

Поради тези причини, през последните години се наблюдава нарастващ интерес в търсенето и изолирането на нови щамове МКБ, с потенциални полезни свойства. В научната литература могат да се открият съвременните постижения в изучаването на екологичното разнообразие на МКБ (изолирани от традиционни и алтернативни източници), изследвания върху биологичните активности на МКБ, както и тяхната роля във функционалните хранителни формулировки. Напредъкът в изучаването на генетиката, молекулярната биология, физиологията и биохимията на МКБ предостави

нови прозрения за тези микроорганизми. През последните 2 декади (след секвениране на генома на *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* IL1403) са разработени МКБ-култури със специфични характеристики и приложения в различни търговски стартерни, функционални, био-протективни и пробиотични култури с желани свойства и пазарен капацитет. Очевидно е обаче, че разнообразните ефекти на МКБ като промотори на здравето са специфични на видово и вътревидово ниво, а използването на пробиотични култури, съставени от множество видове е голямо предизвикателство.

Във връзка с гореизложеното, проучването на биоразнообразието и биотехнологичния потенциал на МКБ в недобре характеризирани в България екологични ниши представлява амбициозна и актуална научна задача, с широк потенциал за практическо приложение. Точно такава задача е обект на настоящия дисертационен труд.

2. Оценка на структурата, специфичните задачи и тяхното съответствие с поставения научен проблем

Дисертационният труд е с обем 210 стр., от които основен текст 151 стр. и списък на използваните литературните източници – 19 стр. (206 заглавия), други приложения – 33 стр., (в т.ч. допълнителна информация за изследваните пробиотични препарати и протоколите за това, макроморфологична и микроморфологична характеристика на МКБ от изследваните изолати, списък с приложени таблици и фигури, използвани съкращения и справка за приносите в дисертацията). Работата е структурирана по общоприетия за такъв вид труд схема, като включва част „Увод“ (2 стр.), „Литературен обзор“ (50 стр.), „Цел и задачи“ (2 стр.), „Материали и методи“ (30 стр.), „Резултати и обсъждане“ (67 стр.), „Изводи“ (3 стр.). Научните доказателства са представени с фигури (30 бр.), таблици (40 бр.) и снимки (над 300 бр. в основния текст и Приложения 7-9). Съотношението на текст към илюстративен материал е приблизително 1:1, което е очаквано за една експериментална работа. Представени са 16 извода, за обсъждане на резултатите са цитирани над 100 автора.

Приложеният към основния труд Автореферат с 47 стр. основен текст е изготвен съгласно изискванията и отразява пропорционално и адекватно същността на дисертацията.

В работата е формулирана 1 цел, 4 основни задачи и цели 18 специфични подзадачи. Те представят подробно логичната последователност от изследователски решения, които започват с изолиране и идентификация на млечнокисели бактерии от различни, недобре проучени на национално ниво биотопи и съхранението им в новосъздадена колекция; следва оценка на тяхната безопасност, като задължително изискване за потенциалното им включване в пробиотичен продукт и характеризиране на пробиотичния им потенциал; и за финал - проучване на възможностите за разработване на качествен и стабилен пробиотичен продукт.

Структурирането на експерименталната част от работата в последователност от индивидуални, ясно формулирани задачи и подзадачи оценявам като умение на докторантката да планира рационално и същевременно с перспектива, и да демонстрира широк поглед върху основните научни проблеми на работата си.

3. Оценка на съответствието на методичните подходи с поставените цели

За реализиране на научния труд е използван набор от методи, съобразени както с конкретните изисквания на експерименталните задачи, така и с цялостния подход, възприет за решаването им. Разделът „Материали и методи“ включва значително разнообразие от методи и техники, типични за микробиологията, биохимията, молекулярната биология. Това са микробиологични техники за морфологично, физиологично, биохимично и генетично охарактеризиране на изследваните щамове; аналитични биохимични методи, методи за оценка на антимикробен ефект и биологична активност, оценка на качеството на пробиотични крайни продукти, оценка на стабилността на R&D мостри на пробиотични продукти в капсула.

Така очертаният комплексен методичен подход (19 типа методични подходи, включващи над 40 методи и тестове) е гаранция за задълбочено проучване за разрешаване на научните задачи и за достоверност на формулираните изводи. Освен това, възприетият от докторантката методичен подход позволява да се проследи последователно и в детайли хода на изследователския процес и да се канализират получените експериментални данни, натрупани при сериозен обем аналитична работа в достоверни резултати и изводи.

Разделът „Материали и методи“ е представен в подробен, но много добре структуриран и ориентиран към потребителя вид. Отразява коректно и в детайли всички използвани материали, методи и апаратура; позволява лесно възпроизводство на представената методология.

4. Оценка на съответствието на теоретичната обосновка с експерименталните решения, резултати и приноси

Увод и Литературен обзор

Уводът предоставя най-обща информация за необходимостта от изолиране на МКБ от подходящи естествени екологични ниши и селектиране на щамове с обещаващ пробиотичен потенциал, запазена жизнеспособност и физиологична ефективност. Това всъщност е в основата на научното предизвикателство и съществуващите проблеми в областта и насочва към рационалността от разработването на дисертационния труд за тяхното решаване.

Литературният обзор е написан въз основа на над 200 заглавия на публикации от тематичния обхват на дисертацията. Те отразяват световните постижения и съвременни тенденции по научната проблематика – повече от половината от цитираните публикации са излезли от печат след 2010 година. Тези данни показват, че докторантката е приложила принципа на изчерпателност и библиографска точност, а така също, че се е съобразила с изискванията за актуалност на използваната информация.

По отношение на структурата на обзора: съгласно съдържанието си е структуриран в 3 основни части (обща характеристика на млечнокиселите бактерии, приложение на млечнокиселите бактерии като пробиотици и етапи на разработване и внедряване на пробиотичен продукт), които адекватно покриват формулираните задачи и

представените резултати. Разделът е вътрешно балансиран, не само структурно, но и по съдържание. Представена е коректно доста фактология, в повечето случаи обобщена в тенденции и заключения, която въвежда читателя в същината на научната проблематика на дисертацията. Обзорът е написан интелигентно, разбираемо и е онагледен с подходящ снимков и схематичен материал; излагането на научните факти е направено на професионално издържан и академичен език. Като цяло този раздел от дисертацията е добра теоретична обосновка на експериментите, резултатите и приносите.

Експериментални решения, резултати, анализи и изводи

Получените резултати са представени и интерпретирани в логическата последователност на поставените задачи и подзадачи. Така и ще бъдат коментирани в рецензията.

1. *Изолиране и идентификация на млечнокисели бактерии от кърма, ферментирани зеленчукови храни и сурово-сушени меса. (стр. 98 – 183)*

В този подраздел са отразени коректно резултатите по подбор на екологични ниши от човешки (майчина кърма), растителни (ферментирани зеленчукови храни) и животински (сурово-сушени меса) екосистеми, нетипични източници на пробиотични щамове МКБ и не достатъчно добре проучени в България. Представени са данни за общата микробиологична характеристика на пробите от кърма (в количествен и качествен аспект), тяхната видова идентификация чрез класически и молекулярно-генетични подходи. Видова идентификация е реализирана и за изолатите от останалите два типа местообитания - ферментирани зеленчукови храни и сурово-сушени меса. В резултат на широко мащабна и комплексна експериментална работа са избрани 47 от общо 64 изолата, таксономично отнесени към родовете *Lactiplantibacillus*, *Lactobacillus* и *Lacticaseibacillus* на семейство *Lactobacillaceae*, а 25 от тях (15 изолата от кърма, 7 от ферментирани зеленчукови храни и 3 от сурово-сушени меса) са обект на последващите анализи.

Експерименталната постановка и логика на този раздел позволява на докторантката да направи аргументиран подбор на представителна извадка от щамове от трите изследвани екологични ниши, с преимущество на майчината кърма. Всъщност, по-подробният анализ на майчината кърма като потенциален източник на микробно обилие и разнообразие от МКБ е защитен с определяне на качествения и количествен състав на микрофлората там и нивото на нейната странична контаминация и с обвързване на получените данни с историята на доброволките. Вероятно поради тази причина данни за общата микробиологична характеристика на изолатите от другите две ниши не са представени. Независимо от този факт, в Приложения 7, 8 и 9 е отразен пълен набор от микро- и макро-морфологични характеристики на всички изолати с представителен снимков материал.

Считам, че информацията, представена на стр. 111-112, която касае описание на молекулните техники, използвани за молекулярно-генетичен анализ за таксономични

цели би могла да се позиционира в раздел Материали и методи, защото допълва методичната стратегия на труда.

Този първи раздел от дисертационния труд е най-обемният като фактология – реално отражение на експерименталната работа. Обобщението на получените по него експериментални данни е направено в 6 от общо 16-те извода на труда. Получените резултати позволяват на докторантката не само да обработи представително количество изолати, но и да формира колекция от таксономично идентифицирани МКБ, новоизолирани от три нетрадиционни и слабо проучени в нашата страна екологични ниши. Това е достатъчно представителен „суров“ материал за провеждане на последващите изследвания по оценка на безопасността и приложимостта на МКБ като потенциални компоненти на пробиотични формулировки.

Особено ценни са резултатите по микробиологичната характеристика на проби от кърма от клинично здрави български жени, които допринасят за изучаването на разнообразието на МКБ в кърма на български жени, в т.ч. и установяването на недокладвани до момента видове и определяне на факторите, които влияят на качествения и количествения състав на тази микрофлора. Тези факти са с приносен характер към научно-обоснованите аргументи в подкрепа на насърчаване на кърменето в светлината на формиране на микрофлората на новородените и кърмачетата.

2. Оценка на безопасността на новоизолирани млечнокисели бактерии. (стр. 124 – 126)

Този подраздел включва експериментална работа, посветена на оценка на безвредността на потенциални пробиотични щамове, съобразно утвърдените в практиката критерии: антибиотична резистентност и хемолитичен капацитет. Причина за това е факта, че сред МКБ има таксономични единици, които крият потенциални рискове за здравето на гостоприемника, бидейки донори на гени за антибиотична резистентност, или са асоциирани с инфекциозни заболявания. Получените резултати категорично доказват липса на антибиотична резистентност, която да предполага хоризонтален трансфер на гени за устойчивост към антибиотици и не притежават хемолитична активност.

Тези данни са особено ценни от научно-приложна гледна точка, защото поставят на здрава основа създаването на пробиотични формулировки, съдържащи предложените новоизолирани щамове МКБ.

3. Оценка на пробиотичния потенциал на новоизолирани щамове млечнокисели бактерии. (стр. 127 – 146)

Този подраздел е посветен на оценка на някои физикохимични, биохимични и микробиологични характеристики на изследваните щамове по отношение на техния пробиотичен потенциал. Изследвани са 9 основни показатели (подкисляваща способност, продукция на водороден пероксид, антимикуробна активност, агрегационен капацитет, хидрофобност, продукция на екзополisahариди, формиране на биофилм, толерантност към пепсин и панкреатин, усвояване на пребиотик), резултатите от които

са систематизирани и анализирани за формулиране на различни комбинации от щамове с преобладаващи ценни свойства, както за прилагане като комплексни пробиотични формулировки, така и като перспективни за успешното им комбиниране с пребиотик в състава на синергични синбиотични продукти. Тези характеристики са фокусирани върху антимикробен потенциал, агрегационни и адхезионни свойства, транзитна толерантност и симбиотичен потенциал.

С други думи, формирана е колекция от МКБ с много широк диверситет по отношение на техния потенциал да служат като основа на про- и симбиотични препарати. Това е особено ценно, защото позволява аранжирането на подходящи комбинации според нуждите на крайния потребител, т.е. осигурява гъвкав пазарен потенциал.

4. Изследване на възможностите за разработване на качествен и стабилен пробиотичен продукт. (стр. 147 – 164)

В този последен раздел от дисертационния труд са представени резултатите от оценка на състоянието на представителна извадка от предлагани на пазара пробиотици и изследване на факторите, повлияващи стабилността на пробиотичните продукти. Бих определила тази част от труда като едно находчиво решение за завършване на потенциален производствен цикъл на пробиотични препарати – подбор на най-подходящата и най-надеждната форма на представяне и съхранение на препаратите, която да гарантира техният максимален биологичен ефект. Извършена е оценка на качеството на 45 крайни пробиотични продукти и са определени факторите, които повлияват стабилността на пробиотичен продукт в капсула при съхранение на стайна температура (30 R&D мостри на пробиотични капсули в различни вариации на състав и първична опаковка). Наблюдаваните резултати доказват убедително, че съществуват съществени отклонения от декларирания и реален състав на пробиотичните препарати. Изпитванията на R&D мостри на пробиотични капсули въз основа на комплекс от показатели дават основание за подбор на идеалната капсула, която би гарантирала най-успешна защита на инкапсулирания пробиотик.

5. Коментари от общ характер, допълнения и въпроси

Дисертационният труд е написан интелигентно и четимо, с подчертано усещане за детайлите и интерпретацията им. Постиженията му са концентрирани в 16 изводи. Те следват логичната последователност на основните проблеми в труда и отразяват както обхвата на проведените изследвания, така и тяхната значимост във фундаментален и приложен аспект. Всъщност, окрупняването и синтезирането на тези 16 изводи би допринесло още повече за научната ценност на труда и би ограничило разводняването и твърде описателното представяне на отделните факти. Този коментар касае по-скоро формално реаранжиране на направените заключения и не омаловажава тяхната научна стойност.

Въпроси:

1. С какъв състав, според Вас, би бил най-ефективният пробиотичен препарат, композиран от представители на Вашата колекция от МКБ. Аргументирайте избора си по отношение на критерии за подбор и параметри за оценка.
2. Какви перспективи за практическо приложение на постигнатите от Вас фундаментални резултати можете да очертаете?

6. Публикации във връзка с дисертационния труд

Публикационната дейност изцяло съответства на нормативните документи – ЗРАСРБ, ППЗРАСРБ и Препоръките ФС на БФ за критериите при придобиване на научни степени, съобразени с тях. Подробности от публикационната дейност са отразени коректно в автореферата. Кратката статистика в цифри показва 2 публикации, 3 презентации на национални научни форуми, участие в 1 национален научен проект.

7. Съответствие на придобитата компетентност с изискванията на образователната и научна степен „доктор”.

Знания:

Докторантката е усвоила нови знания в конкретна научна област: изследване на биоразнообразието, таксономичния статус и биологичния потенциал на млечнокисели бактерии и проучване на факторите, повлияващи качеството и стабилността на пробиотичните продукти.

Умения:

Докторантката е придобила умения за прилагане на разнообразен методичен подход за разрешаване на конкретни изследователски задачи. Тя е усвоила микробиологични, физико-химични, биохимични и молекулярно-биологични методи. В допълнение на специализираните техники докторантката е придобила умения за анализ, интерпретация и оценка на експериментални данни. Тези умения са принос към съществуващите практики в професионалното направление.

Самостоятелност и отговорност:

Докторантката демонстрира самостоятелност при разработването на новаторски идеи и научни изследвания в работен контекст; независимост и поемане на отговорност при разрешаване на научни проблеми, успешно адаптиране към работна среда и екип.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въз основа на посочените по-горе аргументи изразявам подкрепа на актуалността на проблемите, обект на дисертационната работа. По отношение на структура, специфични задачи за разрешаване на поставения научен проблем, методични подходи, експериментални решения, реализирани резултати и тяхната интерпретация, изразявам мнение, че дисертацията на докторант Йорданка Дерменджиева е напълно завършен авторски труд, който изцяло отговаря на критериите обем, съдържание и творчество.

Във връзка с това, препоръчвам почитаемото Научно Жури, назначено със Заповед № РД 38-107 / 15.02.2022 г. на Ректора на СУ „Св. Климент Охридски“, да присъди на **Йорданка Димитрова Дерменджиева** образователната и научна степен „доктор“.

19.04.2022 г.
София

рецензент:
(доц. д-р Траяна Недева)