

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд, представен пред научно жури,
сформирано със заповед № Р-ОХ-357 от 28.09.2017 г.
на Ректора на Химико-технологичен и металургичен университет, София
за получаване за получаване на образователната и научна степен “доктор”

Автор: **инж. ВЕРОНИКА ПЕНЧЕВА НЕМСКА**

Научни ръководители: **доц. д-р Нели Георгиева**
доц. Светла Данова, дбн

Тема: **БИОТЕХНОЛОГИЧНИ И ФУНКЦИОНАЛНИ**
ХАРАКТЕРИСТИКИ НА МЛЕЧНОКИСЕЛИ БАКТЕРИИ

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

1. Кратки биографични данни и характеристика на научните интереси на кандидата

Инж. Вероника Пенчева Немска е родена на 20.11.1989 г. През 2008 тя завършва средното си образование в СОУ „Васил Левски”, гр. Троян. Дипломира се като инженер-биотехнолог (бакалавърска и магистърска степен) в катедра „Биотехнология” при ХТМУ, София, съответно през 2012 и 2013 г. Непосредствено с приключване на висшето си образование, Вероника Немска започва работа като биохимик към катедра „Биотехнология” при ХТМУ. През 2014 г спечелва конкурс и е зачислена в редовна докторантура по научна специалност 4.2. Химически науки (Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества, 5.11 Биотехнологии) към същата катедра. От 2017 г е назначена за асистент. Вероника Немска има и учебна дейност – 4 семестъра води упражнения по микробиология и по пробиотици с общ хорариум 275 ч. Тя е научен консултант на 5 дипломанта от катедрата, успешно защитили през 2014, 2015 и 2016 г. За срока на докторантурата, Немска е положила всички изискуеми изпити с отлични оценки. Със заповед Р-ФХ-79 от 28.02.2017 г е отчислена с право на защита, считано от 01.04.2017 г.

Кариерното развитие на докторантката е фокусирано в областта на Биоорганична химия и по конкретно на биотехнологията – създаване на здравословни храни. Навлизането в тази област е обособило интересът ѝ към млечнокиселите бактерии и пробиотиците, които са в основата на разработваната от нея докторска теза.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Асоциирането на пробиотиците с доброто здраве има дълга история. Тя започва преди повече от век с откритието за бифидобактериите и поддържане здравето на кърмачетата, с откритието на *Lactobacillus bulgaricus* от д-р Стамен Григоров, минава през различни етапи до днес, когато термините про- и пребиотици са ключови думи за 21 век. Световният пазар на пробиотични продукти е реализирал за 2015 г продажби за над 35 млрд долара. Повече от 500 пробиотични продукта (храни и напитки) са били въведени за продажба в последните 10 години. В днешния ден сме свидетели на натрупването на неоспорими доказателства за полезната роля на млечнокиселите бактерии. Интересът към тях непрекъснато нараства едновременно с нарастващата осведоменост на потребителите и техните изисквания към създаването на нови продукти с пробиотични качества. В този аспект на големия проблем е насочено вниманието на докторантката и нейните научни ръководители – изолиране и охарактеризиране на нови пробиотични щамове с перспектива за биотехнологично приложение. Всичко отбелязано дотук подчертава актуалността на дисертацията и нейната значимост в научен и приложен аспект.

Дисертационният труд е конструиран в традиционна форма със съответните раздели. Написан е на 179 стандартни компютърни страници, които включват 156 страници текст и 20 страници литература. Литературният обзор е изготвен целенасочено и конкретно и отразява всички аспекти на изследването. Докторантката прави обстоен преглед на проучванията върху млечнокиселите бактерии, видовете млечнокисела ферментация, използваните суровини и традиционните за България домашни и индустриални продукти. Подробно са отразени подходящите методи за идентификация, представени са техните възможности за приложение с цел охарактеризиране на екосистемите от непроучени естествени среди. Сериозен акцент е поставен върху значението на млечнокиселите бактерии за създаване на стартерни култури, за получаването на ензими, витамини и други биологично активни вещества. Отделено е голямо внимание на най-актуалната част – създаването на пробиотици, като се фокусира върху характеристиките, задължителни за един ефективен пробиотичен продукт. Разделът завършва със заключение, което насочва читателя към новото в разработката.

В обзора са отразени 376 публикации (13 на кирилица и 363 на латиница), кореспондиращи с всяка една от поставените задачи. В него е представено състоянието на проблема в исторически план и по настоящем. Над 80% от статии са след 2000 г, а

над 30% от тях са от последните 5 години. Искам да подчертая, че докторантката коректно е отбелязала в обзора и постиженията на българските учени. В литературния списък няма място авторска статия № 256, която е част от материалите, представени за защита.

Въз основа на направения задълбочен анализ е изведена целта на настоящата дисертация: да се изолират и охарактеризират млечнокисели бактерии от традиционни млечни продукти като се подберат щамове с биотехнологично и функционално значими свойства. Тя е ясна, добре формулирана и обединява всички направления на експерименталната работа. За реализиране на тази цел са формулирани конкретни, взаимно обвързани и логически следващи задачи, които включват всички задължителни критерии за подбор на пробиотични щамове и разработването на добавки към закваски за млечни храни.

Раздел „Материал и методи” обхваща 20 страници и впечатлява с обхвата си. Докторантката използва 23 вида хранителни среди, голям брой тест култури и внушителен набор от рутинни и съвременни микробиологични, биохимични, молекулярно-биологични и биотехнологични методи. Всички те са описани ясно, дават възможност за бъдат възпроизведени, осигуряват коректно провеждане на експериментите и получаване на достоверни резултати. Искам да подчертая различните методи на основата на PCR (16SpДНК PCR, Multiplex PCR, RAPD PCR), методите за обработка на резултатите със специален софтуер MVSP и BLAST анализ, провеждането на експерименти в условия, близки до тези в чревния тракт, определяне на антибактериална, анигибна и антивирусна активност и др. Разработена е схема на адаптиран протокол за изолиране на млечнокисели бактерии. Експериментите са проведени с подходяща апаратура. Това, от своя страна още веднъж подчертава съвременното ниво на разработката.

В раздел „Резултати и дискусия” е включен впечатляващ обем изследователска работа. Местата, от които са събрани пробите (повече от 12 района в България) и броят на млечнокиселите продукти (34) очертават мащаба на изследването. В първата част на дисертационния труд докторантката получава данни за разнообразието и високата жизненост на изолираните МКБ, доказва вторичната микрофлора, придаваща специфичен вкус и аромат и откроява разликите при използване на краве, козе и биволско мляко. В съответствие с логиката на изследването, следва много подробна фенотипна и биохимична характеристика на новоизолираните лактобацили с обширен доказателствен материал, който Вероника Немска използва за изясняване

способностите на щамовете да усвояват хранителните източници. Специално внимание е отделено на молекулярно-генетична идентификация на базата на подходящи съвременни методи, с които е доказано преобладаващото количество на *Lactobacillus plantarum* и наличието на *L. rhamnosus*, *L. delbrukii*, *L. fermentum* и *L. paracasei*. Много добро впечатление прави използването на RAPD PCR анализа за разграничаване на представителите от отделните групи, който позволява да се направи заключението, че са изолирани оригинални щамове със значима вътревидова диференциация.

На същото високо ниво е и разделът за установяване функционалните свойства на новите МКБ от български традиционни продукти. В разработката са включени задължителните етапи за такъв род изследвания, характеризиращи избраните щамове по отношение устойчивостта им в чревния тракт - жизненост и транзитна толерантност, рН, наличие на чревен сок и жлъчни соли. Доказана е високата толерантност на 6 от изолираните МКБ. Към това се добавя и ясно изразената им адхезионна активност, която е важно условие за колонизиране на чревната лигавица. Отбелязаните по-горе характеристики отличават *L. fermentum* S4 като потенциален кандидат за ефективен пробиотик.

Дисертацията включва подробно изследване на антибактериалната, антитъбната и антивирусната активност, което допълва много удачно характеристиката им като естествена бариера срещу хранителните патогени. Новоизолираните щамове успешно подтискат растежа на *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium* и *E. coli*. Много впечатляващи са резултатите за фунгицидната и фунгистатичната активност на супернатанти от няколко щамове от вида *L. plantarum* срещу *Aspergillus niger* MIC05. Като се има предвид голямото търсене на фунгицидни препарати, тези данни са сериозно предизвикателство за разширяване на подобен род проучвания. Не по-малък интерес представляват установеният инхибиторен ефект на *L. plantarum* и *L. paracasei* срещу *Herpes simplex*. Докторантката поставя началото на изследвания за комбинирания ефект на супернатанти от новоизолираните щамове и друг антивирусен агент (ацикловир).

Искам да отбележа, че представените в дисертацията МКБ са добри продуценти на екзополисахариди, а това ги причислява към биотехнологично ефективните източници на съединения за хранителната и фармацевтичната индустрия.

За постигане на поставената цел, Вероника Немска проучва и способността на новите МКБ да усвояват пребиотици. Тя включва в експериментите 20 щамове и 6 въглерод-съдържащи източника – 3 вида олигосахариди, както и глюкоза, малтоза и

нишесте. Проведен е подробен анализ и е доказана тяхната приложимост във функционални храни.

Като логически завършек звучи последният дял от разработката, в който се установяват технологичните свойства на перспективните щамове и възможностите за приложение. Подробно са проучени параметрите на развитието им и тяхното поведение в условия, близки до реализирането им в практиката. Докторантката оптимизира вида и количеството на въглеродния източник за получаване на биомаса, анализира способността на щамовете да образуват биофилми в различни хранителни среди и тяхната чувствителност към натриев хлорид. Тези данни са особено важни за приложението им като пробиотици или закваски. В присъщия на тази дисертация обем е проучен ензимния профил на новоизолираните щамове по отношение на въглехидратния, белтъчния, липидния и фосфатния метаболизъм. Получени са данни за промените в активността на 19 ензима, като след това за някои от тях са проведени по-детайлни изследвания.

Разделът завършва с оценка на възможностите за използване на най-подходящите щамове в производството на ферментирани млека. В експериментите участват тези МКБ, които са показали добри функционални характеристики, едновременно с тяхната безопасност. Закваските, създадени на базата на *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei* и *L. salivarius* показват изключително висока клетъчна преживяемост, добра киселинност и подходящо реологично поведение. Добавянето им към индустриална закваска ускорява процеса на ферментация, подобрява консистенцията и лома на коагулата и придава щамово-специфичен ефект върху киселинността на продукта. Освен това, докторантката дава препоръки относно условията за съхраняване жизнеността на избраните щамове и на получените кисели млека. От представените данни се налага извода, че при използването на *L. plantarum* S6 и *L. plantarum* S12 се получават млека, които отговарят БДС 12:2000 и имат подобрени органолептични параметри. Това от своя страна е предпоставка за включването им състава на нови хранителни добавки.

В раздел „Резултати и дискусия“, едновременно с коректното отразяване на получените данни е представена и много убедителна дискусия на базата на литературата от последните години. Това, разбира се, е възможно благодарение на отличното познаване на проблема и задълбочената научна разработка. Много добра идея е представеното в края на дисертацията „Обобщение“, което дава възможност на читателя много точно да се ориентира в резултатите и да възприеме постиженията.

Искам със задоволство да подчертая отличното оформление на дисертацията, която е написана в стегнатия научен стил. Доказателственият материал е оформен професионално в 28 таблици и 29 фигури (повечето комплексни). Резултатите са отразени коректно в професионално изработени таблици и фигури, снимките са с отлично качество.

Докторантката представя 12 **извода**, които на пръв поглед са много, но като се има предвид големия обем на експерименталната работа, не считам, че това нарушава баланса в дисертационния труд. Според мен, те са логично следствие от получените данни и дават необходимата информация за стойността на проведените изследвания, изведени са коректно и са оформени в точния стил.

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Съдържанието на автореферата отразява коректно получените резултати, изводите и приносите на дисертационния труд.

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд;

Приемам и формулировката на приносите и искам да подчертая по-важните от тях, а именно:

1. Получени са нови данни за автохтонната млечнокисела микробиота на традиционни български млечни продукти.

2. От не-индустриално приготвени традиционни български продукти са изолирани перспективни пробиотични щамове от род *Lactobacillus* с висока жизненост и подходящи функционални и технологични характеристики.

3. В супернатанти от *L. plantarum* S8, S10, SB41 и 3V е доказана фунгицидна и фунгистатична активност, което ги характеризира като протективни/пробиотични добавки към стартерни култури за млечни продукти.

4. За първи път е установен инхибиращ ефект срещу вирус *Herpes simplex*.

5. Новоизолираните щамове притежават специфични характеристики, които подобряват вкусовите и ароматни свойства, както и реологичните и органолептични показатели на получените млечнокисели продукти. Това ги прави подходящи за пробиотични добавки при производството на кисело мляко, сирене и ферментирани млека с кремообразна консистенция.

5. Мнение за публикацииите на дисертанта по темата на дисертационния труд

Данните от дисертацията са включени в 3 журнални научни статии и 14 участия в научни форуми (5 международни и 9 национални). Във всички статии и в 8 доклада,

Вероника Немска е първи автор. Това ми дава основание да считам, че дисертацията основно е дело на докторантката.

Освен това, докторантката е участвала в научен колектив за разработването на 5 проекта, финансирани от ХТМУ, като 1 от тях е по темата на дисертацията. За ефективното докторантско обучение несъмнено са допринесли и обучителните семинари (3 бр.), също в областта на докторантурата.

6. Критични бележки и коментари

Искам да отбележа, че докторантката е взела в пред вид всички забележки и препоръки, посочени от мен по време на апробацията. Към нея имам следните въпроси:

1. Кой са най-новите тенденции в проучванията относно пробиотиците?
2. Според Вас, как трябва да продължи представеното в дисертацията изследване?
3. Какъв механизъм на действие предполагате за установения от Вас антигъбен ефект, проявен от някои от супернатантите на новоизолираните щамове?

7. Лични впечатления за докторанта

Познавам докторантката от работата ѝ в Института по микробиология като целенасочен и много работоспособен млад учен. Освен това, от представения дисертационен труд и от апробацията останах с впечатлението, че Вероника Немска е получила необходимата професионална и методическа подготовка, за което сериозен дял имат научните ѝ ръководители.

8. Заключение

Представеният материал е дисертабилен, разработена е много актуалната тема, която предлага нови, оригинални щамове МКБ с висока жизненост, характерни за млечнокисели продукти с отлични функционални и технологични характеристики и подходящи реологични и органолептични показатели. Те могат да бъдат използвани като стартерни култури или като пробиотични добавки, особено като се имат предвид проявените от тях антибактериални, антифунгални и антивирусни активности. Експериментите са поставени методично правилно, а получените резултати са достоверни и доказват тезата на дисертацията. По време на докторантурата, Вероника Немска е усвоила голям брой съвременни методи, придобила е умения за работа с модерна апаратура и това е повишило нейната квалификация. Безспорно представената дисертация е база за следващи научни и приложни разработки.

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 № Р-ОХ-357 от 28.09.2017 г. на Ректора на Химико-технологичен и металургичен университет, София **да присъдят на инж. Вероника Пенчева Немска образователната и научна степен “доктор”.**

01.11.2017 г

София

Рецензент:



/проф. М. Ангелова, дбн/