

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Пенка Ангелова Мончева, д-р, Софийски университет „Св. Кл. Охридски”,

Биологически факултет

на дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед № Р-ОХ-357/28.09.2017 г на Ректора на Химикотехнологичен и металургичен университет за получаване на образователната и научна степен „доктор”

Автор на дисертационния труд: Вероника Пенчева Немска

Тема на дисертационния труд: „Биотехнологични и функционални характеристики на млечнокисели бактерии”

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

Вероника Немска е родена през 1989 г в гр. София. През 2012 г завършва бакалавърска степен като инженер-биотехнолог в ХТМУ – София, а през 2013 г и магистърска степен в катедра Биотехнология на същия университет. От 2014 до 2017 г тя е редовен докторант в същата катедра и едновременно работи там като биохимик, а от 2017 г и понастоящем тя е асистент. Нейните научни интереси са в областта на Биоорганичната химия и химията на природните и физиологично активните вещества и биотехнологиите.

2. Преглед на дисертационния труд и анализ на резултатите

Млечнокиселите бактерии са хетерогенна по своя видов състав и свойства група, която е сред най-често използваните като пробиотици. Интересът на консуматори и изследователи към тези бактерии се дължи на факта, че те лежат в основата на получаването на редица млечнокисели продукти, които са част от хранителната диета на човека още от древността и са източник на полезни за здравето му микроорганизми. В този смисъл изучаването на биотехнологичните и функционални характеристики на млечнокиселите бактерии, каквато е темата на рецензирания дисертационен труд е важно и актуално не само от теоретична, но и от практическа гледна точка.

Дисертационният труд е построен по стандартния начин и е съставен от 9 раздела: Увод (1 стр.), Литературен обзор (38 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (21 стр.), Резултати и дискусия (79 стр.), Обобщение (2 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси (1 стр.), Литература (20 стр. съдържа 376 източника). Общият обем на труда е 176 А4 формат страници.

Литературният обзор е с оптимален обем спрямо общия обем на дисертацията. В него докторантът прави преглед на изследванията по тематиката на дисертационния труд. Разгледани са следните по-важни въпроси: млечнокиселата ферментация и продуктите,

получавани в резултат на нейното протичане, ролята на стартерните и нестартерни култури, използвани за нейното протичане, предоставени са данни за биологията на млечнокиселите бактерии, като по-специално внимание е отдадено на бактериите от род *Lactobacillus*. Разгледани са въпроси, свързани с тяхното таксономично положение, методите за идентифициране (класически и съвременни), разпространението, различни аспекти на тяхното практическо приложение и използването им като пробиотици. Литературният обзор е написан компетентно, целенасочено и показва, че докторантът познава в детайли постиженията на науката в областта на темата на дисертацията, борава умело с научната литература, т.е. неговата теоретична подготовка е на много добро ниво. Цитирани са огромен брой литературни източници (379), което е в потвърждение на казаното по-горе. Преобладаващата част от цитираните заглавия са публикувани след 2000 г, което показва, че литературният обзор е съвременен и че докторантът е осведомен за най-новите изследвания по темата.

Целта на дисертацията е формулирана ясно и точно. За нейното реализиране е предвидено изпълнението на 4 основни задачи, също формулирани точно и в пълно съответствие с поставената цел. За изпълнението на две от задачите са поставени не малко на брой подзадачи, което показва, че е предвидена значителен обем експериментална работа.

В раздел „Материали и методи” прецизно са описани използваните в работата материали (хранителни среди, разтвори, буфери, микроорганизми и др.) като са посочени всички необходими данни за тях. Използваните методи, които също са описани детайлно, включват изолиране на млечнокисели бактерии от различни източници, тяхното количествено определяне, методи за тяхното фенотипиране (микро- и макроморфология, физиолого-биохимична характеристика с използването на системата Biolog), молекулярно-биологични методи за идентификация (изолиране на ДНК, PCR-амплификация, агарозна гелелектрофореза, секвенционен анализ), аналитични методи за изследване на функционалните свойства на млечнокиселите бактерии (*in vitro* толерантност към условията на ГИТ, способност за формиране на биофилм в условия, симулиращи тези в ГИТ, адхезионна способност); методи за определяне на антимикробната и антивирусна активност; методи за анализ на продукцията на екзополisahариди и усвояване на пребиотици; методи за определяне на антибиотична чувствителност; методи за изследване ролята на въглеродния източник върху растежа и формирането на биофилм, устойчивост към NaCl; методи за определяне на пет биотехнологични характеристики на млечнокиселите бактерии. Описана е използваната за анализите апаратура. Считам, че този раздел е написан и оформен много добре и е налице цялата необходима информация, касаеща използваните от дисертанта материали и методи. Прави впечатление широкият диапазон от съвременни и класически

методи, което показва че докторантът е придобил не само теоретични знания, но е разширил сериозно своите методични умения. Методите са подбрани правилно, така че да осигурят надеждно изпълнение на задачите и получаването на недвусмислени резултати, а от там и постигането на целта.

В раздел „Резултати дискусия” са представени получените от докторанта резултати. Те са представени, съобразно поставените задачи. Прави впечатление, че този раздел е онагледен с много добре оформени фигури и таблици, което улеснява възприемането на получените резултати. Едновременно с представянето на резултатите е направено и тяхното обсъждане, като са сравнявани с резултати, получени от други автори. Анализирани са впечатляващ брой проби (34 на брой), от които са изолирани също така голям брой щамове (78 броя). Направен е микробиологичен анализ на 5 традиционни за страната ни млечнокисели продукти – катък, кисело мляко, бяло саламурено сирене, кашкавал и извара, събрани от различни райони на страната. Щамовете са характеризирани по фенотипни признаци (микро- и макроморфология и някои физиологични характеристики). За 6 от щамовете е направена биохимична характеристика на базата на техния Biolog метаболитен профил, като данните са използвани и за целите на тяхната идентификация. 45 от изолатите, притежаващи признаци, характерни за род *Lactobacillus* са идентифицирани чрез молекулярно-генетични методи. Приложен е мултиплекс PCR за щамовете, чрез който се идентифицират такива, принадлежащи към групата на *L. plantarum* – това са 23 от щамовете. За 9 от щамовете е направен секвенционен анализ на 16S рДНК, в резултат на което принадлежността на два от щамовете, идентифицирани с мултиплекс PCR към вида *L. plantarum* се потвърждава и се идентифицират още 4 вида. Чрез RAPD-PCR е постигнато щамово генотипиране в групите на *L. plantarum*, *L. rhamnosus* и *L. fermentum*. Анализирани са следните функционални свойства на бактериите, които са важни при избора на пробиотични щамове: ин витро жизнеспособност и транзитна толерантност при симулирани условия на стомашно-чревен тракт: при различни стойности на рН, към жлъчни соли, към условията на чревен тракт. Изследвана е адхезионната способност на 6 от щамовете, антимикробна активност (антибактериална, антигъбна и противовирусна). Изследвана е способността за продукция на екзополisahариди, като за седем от щамовете е установена такава способност. Представени са резултатите за способността на щамовете да усвояват три вида олигозахариди в качеството на пребиотици, както и способност към формиране на биофилм при тяхното усвояване. Като критерий, на който трябва да отговарят пробиотичните микроорганизми е изследвана тяхната чувствителност към антибиотици, инхибитори на синтеза на клетъчната стена (8 антибиотика), инхибитори на синтеза на белтъци (6 антибиотика) и инхибитори на синтеза на нуклеинови киселини (4 антибиотика). Изследвани са и следните

технологични свойства на млечнокиселите бактерии – растеж и развитие в среда с различни въглеродни източници, устойчивост към различни концентрации на натриев хлорид (4 концентрации), ензимна активност (20 ензимни активност), коагулазна способност. Като завършек е направена оценка на приложимостта на новоизолираните щамове млечнокисели бактерии при производството на ферментирани млека.

Считам, че резултатите са коректно представени и обсъдени от докторанта, като са онагледени с 24 фигури и 18 таблици. Извеждането на списъка на таблиците и фигурите в началото на дисертационния труд считам за положително, което улеснява читателя.

В кратко по обем обобщение дисертантът прави кратък преглед на извършената от него работа.

Въз основа на експерименталната работа по изпълнение на задачите на дисертацията са изведени 12 извода. Те са добре формулирани и произтичат от получените резултати.

3. Оценка на съответствието между автореферата и дисертационния труд

Прегледът на изготвения автореферат показва, че по съдържание той съответства на представеното в дисертационния труд. В съкратен вид е представен разделът «Материали и методи», което е разбираемо от гледна точка на изискванията за неговия общ обем. Всички резултати са представени коректно в идентичен с този в дисертацията вид. Като техническа неточност ще отбележа несъответствието между номерата на някои таблици и цитираните в текста (напр. на стр. 15, 32, 41).

4. Характеристика и оценка на приносите в дисертационния труд

Разработената дисертация несъмнено има приносен характер, като приносите могат да се определят като такива с теоретико-приложен характер. Струва ми се, че техният брой би могъл да се съкрати. Напр. първият принос би могъл да отпадне, без това да омаловажи работата, тъй като подобен подход се използва и от други автори при характеризиране на автохтонната микрофлора на млечнокисели продукти. Вторият и третият принос биха могли да се обединят.

5. Публикации на дисертанта, свързани с темата на дисертацията

Докторантът е представил списък с три публикации, свързани с дисертационния труд. Те са публикувани в български списания без импакт фактор (научни трудове на Русенския университет, Journal of Chemical Technology and Metallurgy и Хранително-вкусова промишленост). Публикациите обхващат периода на докторантурата. В тях са представени част от резултатите, свързани с дисертацията. Едната от статиите третира технологичните

параметри на новоизолирани лактобацили от традиционни за България млечни продукти, които са обект на дисертационния труд, другата представя данни от идентификацията на млечнокисели бактерии, изолирани от същите продукти, а обект на последната работа е изследването на тяхната антивирусна активност. Две от статиите са публикувани на английски език, което ще направи резултатите, достъпни за по-широк кръг от научната общност.

6. Критични бележки и коментари

Към дисертацията имам критични бележки, които имат технически характер:

- Не би било лошо да има обосновка на каква база е правен изборът на щамове за всеки един от анализите
- На стр. 81 се казва, че 45 щамове, които са лактобацили са фенотипно характеризирани, като се прави препратка към Табл. 11 и 12. В едната таблица щамове са 36, а в другата 29. Каква е причината да има разминаване в броя на щамове?
- В заглавието на табл. 11 трябва да се конкретизира, че става дума само за лактобацилите, а не въобще за млечнокисели бактерии.
- Не би било лошо с едно изречение в началото на частта, в която коментирате анализите с Biolog да кажете какви са резултатите от идентификацията и след това да анализирате техните профили, използвайки вече видовите имена, които са станали известни именно с този анализ (стр. 83).
- На Фиг. 11 би било добре да се посочат номерата на пътеките, а в легенда да се дадат номерата на щамове от всяка пътека, вместо техните видови имена, които са станали известни след провеждането на този анализ. Така оформена фигурата обръква читателя.
- В табл. 14, последната колона отразява не вероятността, а процентът на сходство, така както е коментирано и в текста.
- По-правилно е използването на термина „жизнеспособни”, вместо „витални” и „ферментирани”, вместо „ферментирани”

Към докторанта имам следните въпроси:

1. Защо сте съсредоточили вниманието си само върху млечнокиселите бактерии, които са представители на род *Lactobacillus*?
2. Използването на неутрализирани супернатанти за изследване на антимикробна активност достатъчно доказателство ли е за да се твърди, че то се дължи на синтезирането на антимикробни пептиди, както е посочено на стр. 104?

3. Съществуват ли разлики във видовия състав на микрофлората от един вид продукт в зависимост от мястото на неговото произвеждане?
4. Какви други видове млечнокисели бактерии са откривани в катъка, преди вашето изследване?

7. Лични впечатления за дисертанта

Не познавам лично дисертанта Вероника Немска и нямам преки впечатления от нея. Прочитът на нейния дисертационен труд обаче формира у мен мнение за един отговорен и сериозен млад човек, който за период от три години е свършил не малка по обем работа, резултатите от която е успял в срок да обобщи, публикува и оформи в дисертация. Това показва много добра организация на цялостната ѝ работа.

8. Заключение

Оценката ми за дисертационния труд на Вероника Немска базираща се на направения анализ на всички негови раздели и на неговото оформяне е изцяло положителна. Всичко това ми дава основание да смятам, че в хода на докторантурата тя е усвоила теоретични знания и методични умения, напълно съответстващи на изискванията се за образователната и научна степен „доктор“, което я е изградило като млад учен. Извършено е значително по обем и задълбоченост изследване чрез умелото съчетаване на разнообразни методи. Дисертационният труд съдържа значими приноси с теоретичен и приложен характер.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академични състав в Република България и този на ХТМУ считам, че настоящият труд напълно отговаря на изискванията за докторска дисертация, оценявам го положително и препоръчвам на Научното жури да присъди образователната и научна степен „доктор“ по научна специалност 4.2. Химически науки (Биоорганична химия, химия на природните и физиологичноактивните вещества) на Вероника Пенчева Немска.

17.11.2017 г.

София

Подпис:



(проф. д-р П. Мончева)