

РЕЦЕНЗИЯ

от проф. д-р **Вяра Николаева Иванова-Пашкулова,**
катедра “Микробиология”,

Университет по хранителни технологии (УХТ) - Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен 'доктор'
в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика
професионално направление 4.3. Биологически науки
научна специалност Микробиология

Автор: инж. **ЦВЕТАНКА ГЕНЧЕВА ТЕНЕВА-АНГЕЛОВА**

Тема: “Биоразнообразие от млечнокисели бактерии в лечебни растения и възможности за използване на биологичния им потенциал”

Научен ръководител: доц. д-р **Дора Миленова Бешкова**, Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН

Със заповед № № I - 18/05.02.2018 г. на Директора на Института по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН, съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура за защита на дисертационен труд на тема “**Биоразнообразие от млечнокисели бактерии в лечебни растения и възможности за използване на биологичния им потенциал**” за придобиване на образователната и научна степен ‘доктор’ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност **Микробиология**. Автор на дисертационния труд е **инж. ЦВЕТАНКА ГЕНЧЕВА ТЕНЕВА-АНГЕЛОВА** – редовен докторант към **Лаборатория по приложни биотехнологии**, Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН, с научен ръководител **доц. д-р Дора Миленова Бешкова** от Института по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН. Дисертационният труд е апробиран на 18.01.2018 г. на заседание на Националния семинар по „Приложна микробиология и микробни биотехнологии“ при Института по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН.

Представеният от **инж. Цветанка Генчева Тенева-Ангелова** комплект материали на хартиен и електронен носител включва изискваните документи и материали, дисертация, автореферат и декларация за оригиналност на резултатите. Докторантката е приложила 4 броя публикации. В тях тя е водещ автор, като три са в чуждестранни списания и една в българско списание на английски език. Две са реферирани в Scopus, една е публикувана в списание с импакт фактор и една е публикувана в справочник на издателството ELSEVIER (Academic Press), САЩ.

Докторантката **инж. Цветанка Генчева Тенева-Ангелова** е бакалавър и магистър по биотехнологии. Завършила е висше образование (магистърска степен) през 2011 г. в Университета по хранителни технологии, Пловдив. От 2012 г. е редовен докторант към **Лаборатория по приложни биотехнологии**, Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН. Отчислена е с право на защита със заповед I-38/02.03.2016 г. на Директора на Института по микробиология “Стефан Ангелов”, БАН. От 2015 г. е асистент в същата лаборатория. Положила е успешно всички (4) изпита и два допълнителни курса, включени в Индивидуалния план за обучение, и е събрала 170 кредита. Има една специализация в Швеция.

Професионалните ѝ интереси и умения са в областта на изолирането, селекцията и култивирането на щамове млечнокиселиибактерии от растителен и млечен произход; изследването на морфологични, физиологични и биохимични характеристики на микроорганизми; идентификационните методи за диференциране на различни видове микроорганизми (API тестове; PCR анализи); HPLC, GC/MS, определянето на антиоксидантна и антимикробна активност, спектрофотометрия, денситометрия; статистическите анализи. Има общо седем научни публикации и петнадесет участия в научни форуми. Получила е общо три награди и е участвала в два научни проекта, в един от които е ръководител.

1. Актуалност и значимост на изследвания проблем

Дисертационният труд на инж. Цветанка Генчева Тенева-Ангелова е посветен на търсенето на нови източници на млечнокисели бактерии. Като такива са използвани лечебни растения, прилагани широко в традиционната и народната медицина. Като крайна цел се очертава приложението на изолираните МКБ във ферментирали млека, което представлява една нова насока за създаване на функционални храни. Включването на здравословни храни (ферментирали млека) в храненето е начин за преодоляване въздействието на негативните фактори, съпътстващи съвременния живот. Увеличаването на потреблението на тези продукти води до подобряване на здравния статус на хората и намаляване употребата на лекарствени препарати. На тази база оценям като актуална представената научна разработка.

2. Обем и структура на дисертационния труд

Дисертационният труд съдържа 189 страници заедно със списъка на използваната литература, 16 таблици, 33 фигури и 4 фигури в приложение. В библиографската справка са включени 271 заглавия на латиница. Резултатите и дискусията към тях заемат 84 страници, 11 таблици и 28 фигури. Дисертацията е написана стегнато, а графичният материал е оформен добре. Съотношението между отделните части на дисертацията е спазено.

3. Литературна осведоменост, цел и задачи

Избраната за решаване задача е комплексна и предполага добро познаване на литературните източници и методите за решаването ѝ. Докторантката е направила обстоен преглед на постиженията на други изследователи, които е успяла да предаде и анализира върху 41 страници в литературния обзор. Разгледани са таксономията, характеристиката и класификацията на млечнокиселите бактерии, техния метаболизъм, традиционните и алтернативни източници за изолиране на млечнокисели бактерии, специфичните за изолиране хранителни среди. Спряла се е обстойно върху таксономичното идентифициране на МКБ чрез предварителни тестове и молекулярно-генетични методи. Обзорът завършва с информация за биологично-активните вещества в лечебни растения от родовете *Salvia*, *Panax*, *Geranium*, *Hypericum* и потенциала за приложение на МКБ, изолирани от растителни източници за създаване на храни със здравословен ефект. Литературната справка според мен е оптимална по обем предвид сложността на тематиката. Подкрепена е с 5 фигури и една таблица. Обзорът се чете лесно, написан е ясно и интелигентно. Литературните източници са правилно и коректно цитирани.

Данните от справката са послужили за ясното и правилно определяне на целите, задачите за решаване в дисертацията и избраните методи, а именно - да се изследва биоразнообразието на млечнокисели бактерии в медицинските растения *Geranium sanguineum* L. (кръвен

здравец), *Hypericum perforatum* L. (жълт кантарион), *Panax ginseng* C.A.Meyer (жен-шен), *Salvia officinalis* L. (градински чай), *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegeе ex Epling, *Salvia scabiosifolia* Lam. и *Salvia tomentosa* Mill. и да се направи оценка на биологичния потенциал на млечнокиселите бактерии.

Задачите включват: 1/Изолиране и характеризиране на млечнокисели бактерии от посочените по-горе медицински растения; 2/ Морфологична, физиологична и биохимична характеристика на чистите култури МКБ; 3/ Видова идентификация на млечнокисели бактерии от растителен произход, съгласно съвременната полифазна таксономия; 4/ Характеристика на екстракти от *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L. - анализ на полифенолния профил на получените екстракти чрез HPLC анализ, определяне на съдържанието на общи фенолни съединения и анализ на антиоксидантна активност; 5/ Определяне на устойчивостта на растителните млечнокисели бактерии към екстракти от изследваните растения; 6/ Ферментационни и растежни характеристики на млечнокисели бактерии от растителен и млечен произход при култивиране в мляко.

4. Оценка на използваните методи и материали

Формулираните от дисертанта задачи предполагат владение на голям набор от **съвременни микробиологични, биохимични, молекулярнобиологични и аналитични методи**, което е видно и от раздела Материали и методи. Приложени са подходящи методи, които са надлежно описани. Те включват изолиране и охарактеризиране на чисти микробни култури, изолиране на тотална ДНК от млечнокисели бактерии, съвременни гентични анализи и видова идентификация на новоизолираните щамове, получаване на растителни екстракти с анализ на биологично-активни вещества чрез високоефективна течна хроматография и оценка на технологичния потенциал на екстрактите и на новоизолираните МКБ. Генетичната идентификация е извършена в Лаборатория Валенберг, Гьотеборгски университет, Швеция. Анализите са проведени със спазване на изискуемите повторения. Използвани са съвременни компютърни методи за доказване на достоверност на резултатите - програми Microsoft Excel 2016, Microsoft Word 2016, API web version 1.1.0, BioEdit, Mega 4.1 и други. Всичко тези методи повишават значително научното ниво на дисертационния труд на инж. Цв. Тенева-Ангелова.

5. Оценка на получените резултати

Инж. Цветанка Генчева Тенева-Ангелова развива докторската си теза в няколко направления:

Най-напред чрез широкомащабен скрининг на 800 микробни изолата от цвят, листа или стъбла на 5 вида *Salvia*, на 300 микробни изолата от *G. sanguineum*, и по 50 микробни изолата от *H. perforatum* и *P. ginseng* са селектирани общо 188 броя смесени микробни култури, които образуват твърд коагулум, не отделят газ и нямат неспецифичен аромат. След последващи многократни трансфери и развитие на селективни среди, от всички изследвани растения са изолирани 718 единични бактериални колонии, които в последствие са идентифицирани посредством класическите техники за доказване на фенотипната им характеристика и съответната им принадлежност към групата на МКБ. Чрез проведените задължителни и потвърждаващи тестове, е доказана идентичност с групата на МКБ на 154 броя единични колонии .

Във втората част докторантката изследва морфологичната, физиологичната и биохимичната характеристика на единичните бактериални изолати, показващи фенотипна идентичност с групата на МКБ. Доказано е, че всичките изолати са Грам-положителни, каталазо-отрицателни, оксидазо-отрицателни, индол-отрицателни и са морфологично дефинирани като клетки с коковидна и пръчковидна форма. 85.45% от тях синтезират L(+)-млечна киселина и 14.55% D(-)/L(+)-МК. Определено е, че почти всички изолати - коки от *G. sanguineum* и четирите вида *Salvia*, както и пръчки от *P. ginseng*, показват много добър растеж в широк температурен интервал (15 °C – 45 °C) и добър такъв при 4 °C. Отчетен е по-тесен интервал (30 °C – 45 °C) за коките, изолирани от *H. perforatum*. Доказано е, че рН интервалът за развитие на повечето изолати от всички изследвани растения е в широк диапазон между рН 5.0-9.6, както и липса на такъв при стойност на рН 3.0. Освен това е установено, че единичните бактериални изолати, показващи фенотипна идентичност с групата на МКБ, показват способност за развитие в по-широк температурен и рН диапазон, както и по-висока степен на халотолерантност, в сравнение с МКБ от млечен произход. На база способността им да ферментират 49 различни въглехидрата (API 50 CHL), изолатите с пръчковидна форма, изолирани от *P. ginseng* са отнесени към вида *Lactobacillus rhamnosus* с висока степен на достоверност – над 99%. Въз основа на въглехидратния метаболизъм и на някои специфични ензимни реакции (API 20 STREP), изолатите с коковидна форма са идентифицирани като различни видове от родовете *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*. От различните видове *Salvia* са идентифицирани представители на родовете *Enterococcus*, *Lactococcus* и *Streptococcus*. Изолатите от *G. sanguineum* са отнесени към родовете *Streptococcus* и *Enterococcus*, а тези от *H. perforatum* – само към *Enterococcus*.

В третата част от изследванията докторантката прави генетична идентификация на млечнокисели бактерии от растителен произход. Доказано е, че всички изолати от *H. perforatum*, както и преобладаващата част от анализираните изолати от *G. sanguineum* (73.3%) и от 4-те вида *Salvia* (69.0%), показват принадлежност към род *Enterococcus*. За щамове изолирани от *H. perforatum*, е показано 99% и 97% подобие към вида *E. faecium*. Щамове изолирани от *G. sanguineum* и *Salvia* са определени като принадлежащи към вида *E. faecium* на база на 99%-100% хомоложност на нуклеотидната им последователност. Щамове, изолирани от *Salvia*, са определени като принадлежащи към *E. casseliflavus* с 99% хомоложност, а други са доказани, че принадлежат на *E. mundtii* със 100% хомоложност на нуклеотидната последователност. 26.7% от анализираните изолати от *G. sanguineum* и 10.7% от изолатите от 4-те вида *Salvia*, са идентифицирани като представители на род *Streptococcus*. Някои от тях са с доказана висока степен на сходство (99.0%) със *S. thermophilus*. 20.7% от изолатите, получени от видовете *Salvia*, са идентифицирани като представители на род *Lactococcus*. С висока степен на сходство (99%-100%) с *Lc. lactis subsp lactis* са доказани 6 щама. Анализираните изолати от *P. ginseng* са идентифицирани като *Lactobacillus rhamnosus* с хомоложност 99%-100%. Получените нуклеотидни последователности са депозириани в NCBI GenBank.

В следващата част от дисертационния труд докторантката инж. Цв. Тенева-Ангелова е направила характеристика на водно-алкохолни екстракти от корени или листа на *Salvia officinalis* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer и *Geranium sanguineum* L. Тя се е насочила правилно към този анализ поради възможността те да бъдат прилагани в хранителни продукти като носители на различни биологични активности. Изследвани са съдържанието на полифенолни съединения (фенолни киселини и флавоноиди) чрез HPLC и

спектрофотометричен метод, направен е анализ на общите феноли и анализ на антиоксидантна активност чрез четири метода. Изследвана е способността да се улавя дифенил-пикрил-хидразил-радикал (DPPH), азино-бис-етилтиазолино-сулфонов радикал (ABTS), желязо-редуцираща антиоксидантна активност (FRAP) и мед-редуцираща антиоксидантна активност (CUPRAC). Резултатите доказват наличието на полифенолни съединения (фенолни киселини и флавоноиди), както и високата антиоксидантна активност на екстракти от *S. officinalis*, *G. sanguineum* и *H. perforatum*, и много ниски концентрации на фенолните съединения и съответно антиоксидантна активност на екстрактите от *P. ginseng*.

Петата част от изследването е голяма по обем и анализира устойчивостта на МКБ изолирани от растителни източници и от млечни продукти към различни растителни екстракти във връзка с евентуално култивиране на щамове в мляко, в присъствие на екстракти. Изследвано е влиянието на растителните екстракти, разтворени в 30% етанол и във вода, поради по-подходящото ѝ приложение в хранителни продукти. В литературата няма данни за изследване на устойчивостта на млечнокисели бактерии, изолирани от растения към екстрактите от растенията, от които са изолирани и това е едно от достойнствата на дисертационния труд на инж. Цв. Тенева-Ангелова. След изследване на устойчивостта на растителните щамове МКБ от видовете *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii* и *Lactobacillus rhamnosus* е установено както междувидово, така и междущамово разнообразие по отношение на устойчивостта им към изследваните растителни екстракти. Доказан е различен резистентен профил на щамове *E. faecium*, изолирани от различни растения и находища. В сравнение с млечните щамове МКБ, растителните щамове проявяват по-голяма устойчивост към изследваните екстракти. Всички растителни щамове МКБ проявяват резистентност към растителните екстракти, което доказва потенциал за култивирането им в присъствие на екстрактите и е принос за приложението им в нови функционални ферментирани храни.

На финала на това мащабно изследване докторантката се е спряла на ферментационните и растежни характеристики на млечнокисели бактерии от растителен и млечен произход при култивиране в мляко. Изследвани са усвояването на лактоза, синтезът на млечна киселина, изменението на рН и жизнеспособността (брой жизнеспособни клетки) по време на ферментационния процес, както и времето на коагулация на млякото. Направено е и сравнение с щамове от същите видове, изолирани от млечни продукти. Установено е, че изследваните растителни щамове *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* и *Enterococcus faecium* показват по-добри или сходни ферментационни и растежни характеристики при култивиране в мляко, в сравнение с млечните щамове и имат потенциал за включването им като компоненти в стартери за получаване на ферментирани млечни продукти.

6. Приноси и значимост на разработката за науката и практиката

Като основен резултат и научен принос от проведените експерименти от докторантката инж. Цв. Тенева-Ангелова считам депозираните 54 секвенции в NCBI GenBank.

Другите научни приноси са свързани с изследването за първи път на биоразнообразието на млечнокисели бактерии в различни органи на медицинските растения *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Salvia officinalis* L., *Salvia ringens* Sibth. & Sm., *Salvia blepharophylla* Brandegees ex Epling, *Salvia scabiosifolia* Lam. и *Salvia tomentosa*

Mill. от различни находища. Доказана е перспективността на лечебните растения като източник за изолиране на млечнокисели бактерии, притежаващи подобрени физиологични и биохимични характеристики.

Научно-приложните приноси са свързани с установяването на перспективността на растителните млечнокисели бактерии за култивиране в среда, обогатена с растителни екстракти, носители на биологични активности и създаването на колекция от млечнокисели бактерии, изолирани от медицинските растения *Geranium sanguineum* L., *Hypericum perforatum* L., *Panax ginseng* C.A.Meyer и видове *Salvia*, с потенциал за включването им като компоненти в стартери за получаване на ферментирани млечни продукти.

Искам специално да отбележа направения от инж. Цв. Тенева-Ангелова коментар по всеки експеримент, съпоставката на резултатите за отделните щамове и експерименти, и съпоставката с литературните данни, което още веднъж подчертава качествата на докторантката и владенето на експерименталната теория. С това инж. Цв. Тенева-Ангелова доказва, че е овладяла напълно третата степен на обучението си и е завършен експериментатор.

Имам някои забележки към дисертацията, които са несъществени на фона на получените резултати. Отнасят се до оформлението на дисертационния труд. Прието е всички основни раздели като Увод, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати и обсъждане, Изводи и приноси, Използвана литература да досят съответна номерация с арабски цифри. Подразделите също се номерират, като първата цифра е винаги тази на основния раздел. Не се допуска наличието на два подраздела с еднаква номерация в една дисертация. При изброяване на литературни източници е прието най-напред да се посочи най-стария източник. Тези принципи не спазени от дисертанта. Допуснати са и правописни грешки.

Нямам съществени забележки и препоръки към научните експерименти и дискусията по тях. Изследването е твърде обширно, но за в бъдеще бих препоръчала резултатите за изолираните щамове МКБ да се обвържат с химическата характеристика на растителните органи, от които са изолирани.

Позволявам си да задам следните въпроси на докторанта:

1. Как е определена видовата принадлежност на медицинските растения, събрани от естествени местообитания (нямам предвид ботаническите градини на Институт на БАН и на Техническия университет, Дрезден, Германия)?
2. Растителният материал от *Panax ginseng* C.A.Meyer (корен, смлян) е закупен от търговската мрежа – Има ли докторанта сертификат, доказващ достоверността на използвания материал и неговия произход?
3. Как може да се обясни факта, че МКБ не са изолирани от *S. officinalis* L., събрана от местностите в района на Източните Родопи (стр. 69 от дисертацията)?
4. Защо е използван материал от *Salvia officinalis* L. от Източните Родопи в експериментите за определяне на устойчивостта на МКБ, изолирани от растителни източници и от млечни продукти, към растителни екстракти?
5. Как може да се обясни високата резистентност на почти всички изолирани МКБ към екстракти от *Salvia officinalis* L. от Източните Родопи? Има ли докторанта данни за въздействието на екстракти от *Salvia officinalis* L. от други местообитания?
6. Според данните в дисертацията някои от изследваните новоизолирани МКБ показат по-добри или сходни ферментационни и растежни характеристики при култивиране

в мляко, в сравнение с млечните шамове, което според докторанта доказва техния потенциал за включването им като компоненти в стартери за получаване на ферментирани млечни продукти. В тази връзка се интересувам дали е правена вкусова характеристика като важна предпоставка за приложението им за получаване на здравословни продукти.

Представени са 4 броя публикации. В тях инж. Цв. Тенева-Ангелова е водещ автор, като три са в чуждестранни списания и една в българско списание на английски език. Две са реферирани в Scopus, една е публикувана в списание с импакт фактор и една е публикувана в справочник на издателството ELSEVIER (Academic Press), САЩ. Импакт факторът е 1.122. Има единадесет участия с доклади по тематиката на дисертационния труд в научни форуми в чужбина или в международни у нас. Получила е три награди и е участвала в два научни проекта, на един от които е ръководител. Докторантката е водещ автор във всички публикации и доклади. Публикациите отразяват резултатите от дисертационния труд и са дело основно на дисертантката.

Авторефератът е направен според изискванията на съответните правилници и отразява основните резултати, постигнати в дисертацията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд на тема: **“Биоразнообразие от млечнокисели бактерии в лечебни растения и възможности за използване на биологичния им потенциал”** с автор редовния докторант **инж. Цветанка Генчева Тенева-Ангелова** *съдържа научни и научно-приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания* на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и на Правилника за прилагане на ЗРАСРБ. Представените материали и дисертационни резултати **напълно съответстват** на специфичните изисквания на Правилника на ИмикБ-БАН, приети във връзка със ЗРАСРБ и Правилника за приложение на ЗРАСРБ. Дисертационният труд показва, че докторантът **инж. Цветанка Генчева Тенева-Ангелова притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения** по научна специалност **Микробиология** като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси, и **предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен ‘доктор’** на **инж. Цветанка Генчева Тенева-Ангелова** в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност **Микробиология**.

15.03.2018 г.

Изготвил рецензията:

проф. д-р Вяра Николаева Иванова-Пашкулова