

СТАНОВИЩЕ

върху дисертационен труд за получаване на образователна и научна степен „доктор“ в област на висше образование 5. Технически науки, професионално направление 5.12. Хранителни технологии, научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини).

Тема и автор на дисертационния труд: „Технология за получаване на лиофилизирани биоактивни продукти на основата на белтъчни хидролизати“ от ас. Камелия Кирилова Логиновска.

Член на научното жури: доц. д-р Светла Максимова Дянкова, Институт по криобиология и хранителни технологии - ССА, гр. София, научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини), Заповед за назначаване на НЖ № РД-05-167/23.06.2024 г. на Председателя на ССА.

I. Актуалност на проблема

Концепцията за добро качество на живота включва много аспекти - материално благополучие, социални и трудови взаимоотношения и на първо място физическо и психическо здраве, което е ключът към дълголетие и добро самочувствие. Задълбочени научни изследвания пред последните десетилетия са установили огромното значение на балансираното хранене за поддържане на здравословен начин на живот. В тази връзка например, е доказано намаляване на риска от появата на редица социално значими заболявания при консумация на храни, обогатени с пробиотични бактерии. Значителна част от иновациите в областта на хранителните технологии са свързани със създаване нови функционални продукти, съдържащи пробиотици както и развитие на пазарните ниши, обвързани с тях. Друга актуална тенденция е получаването и използването на протеинови хидролизати от растителен и животински произход като източници на нискомолекулни пептиди с биологична активност. Протеиновите хидролизати от мляко и млечни продукти намират широко приложение под формата на протеинови добавки или клинични диетични формули с доказан благоприятен физиологичен ефект. От тази гледна точка дисертацията е актуална и значима. В работата са обединени два биотехнологични подхода: 1) ензимна хидролиза на млечни продукти и получаване на белтъчни хидролизати; 2) прилагане на получените хидролизати като субстрат за ферментация на подбрани щамове млечнокисели бактерии и установяване на ефекта върху времето за протичане на ферментацията и преживяемостта на пробиотичните бактерии.

Безспорната актуалност на дисертационния труд се допълва и от създадената оригинална технология за производство на лиофилизирани биоактивни продукти на основата на млечни хидролизати.

II. Цел, задачи и методи на изследване (хипотези на дисертационния труд)

Целта на дисертацията е ясна и много добре дефинирана. Основната хипотеза на дисертационния труд се основава на очакванията, че ензимни протеинови хидролизати от прясно краве мляко и суроватка могат да се използват при ферментацията на млечнокисели бактерии като в резултат се получат пробиотични продукти с висока биологична и по-специално антиоксидантна активност. В изпълнение на поставената цел са формулирани шест научни задачи, които са успешно изпълнени.

Използваната методология отговаря на поставените цел и задачи и включва широк набор от физикохимични, биохимични и микробиологични методи. В раздел „Материали и методи“ (10 стр.) е дадено подробно описание на извършените анализи като са цитирани и съответните литературни източници.

III. Нагледно представяне и интерпретация на получените резултати. **Използвана литература**

Раздел „Резултати и обсъждане“ (97 стр.) заема най-голям обем от дисертационния труд. Много добро впечатление прави извършената експериментална работа. В раздела са представени, в добър научен и аналитичен стил, основните резултати от проведените технологични опити и анализи, съобразно поставените научни задачи. В началния етап от изследването са подбрани подходящите протеолитични ензими и субстрати за провеждане на хидролизата. Получените варианти протеинови хидролизати са анализирани и оценени по отношение степен на хидролиза, електрофоретични профили и антиоксидантна активност. Въз основа на резултатите от анализите са избрани вариантите, използвани в следващите експерименти - ферментационни опити с различни щамове млечнокисели бактерии. На този етап са изследвани три различни по произход и вид щамове пробиотични бактерии и е установено, че два от тях - *Lactiplantibacillus plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 показват добро развитие и висок брой жизнеспособни клетки при култивиране в среди с добавени хидролизати. Последният етап от експерименталната работа е свързан със сублимационно сушене на подбраните варианти пробиотични култури в съответните ферментационни среди, като е анализирано влиянието на режимните параметри и два криопротектора върху преживяемостта на бактериалните клетки. В заключение са формулирани рецептурни състави за два пробиотични продукта на основата на ензимни хидролизати от

мляко или суроватка, ферментирани с подобранияте щамове: *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013. Разработените продукти са изследвани по органолептични, физикохимични, биохимични и микробиологични показатели и е определена тяхната стабилност при съхранение.

Получените резултати са визуализирани на 38 фигури и 47 таблици. Представени са експериментални изследвания и дискусия по всяка една от научните задачи, което е показателно за добре планираните научни експерименти. Разделът завършва с 11 извода, които са добре обосновани и обобщават експерименталните данни.

Литературният обзор представлява много добър преглед на научни изследвания в областта. Цитирани са 243 автори, от които 22 на кирилица. Може да се твърди, че представената библиография е актуална и в пряка връзка с поставените цели и задачи на дисертацията.

IV. Приноси на дисертационния труд (оценяват се поотделно научно-фундаменталните и научно-приложните приноси)

Приемам напълно представените от ас. Логиновска приноси на дисертационния труд. Авторката е формулирала 3 научни, 5 научно-приложни и 2 приложни приноса.

С **научно значение** са получените резултати, че ензимната хидролиза с протеолитични ензими и последващата ферментация с пробиотичните бактерии *L. plantarum* и *L. rhamnosus* повишава значително антиоксидантната активност на краве прясно мляко и суроватка. Доказан е и високият криозащитен ефект на гума Локуст бийн върху преживяемостта на бактериалните клетки във ферментирани млечни и суроватъчни хидролизати след замразяване и лиофилизация.

Приносите с **научно-приложен характер** са свързани с проучване влиянието на технологичните параметри върху степента на хидролиза на протеините в прясно краве мляко и суроватка и оптимизиране на процеса; установяване на ефекта от добавянето на хидролизирани белтъчни субстрати в културалната среда върху процеса на ферментация и преживяемостта на три щам пробиотични млечнокисели бактерии; експериментално определяне на най-благоприятните среди за размножаване на щамове. Определени са и основните технологични параметри на процеса сублимационно сушене осигуряващи висока преживяемост на лактобацилите в млечните и суроватъчни хидролизати.

Представените два **приложни приноса** са потвърдени с разработването и охарактеризирането на двата вида оригинални лиофилизирани функционални храни, съдържащи висок брой пробиотични бактерии.

V. Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Асистент Логиновска е включила 3 публикации по темата на дисертацията, включително и една самостоятелна статия, публикувани в издания реферирани в Scopus или Web of Science. От тях една статия е в списание със SJR - 0.190 (2023). Общият брой точки е 54.66, което покрива и надвишава минималните изисквания съгласно ЗРАРБ. Докторантката е посочила и 6 участия в научни форуми. Един от разработените по дисертацията функционални продукти е получил диплома в конкурса за иновации на Международната селскостопанска изложба Агра 2023.

Представената наукометрична справка напълно покрива минималните национални изисквания и изискванията на Правилника за развитие на академичния състав на ССА за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

VI. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Нямам критични бележки и въпроси към кандидата. Моята препоръка е ас. Логиновска да продължи изследванията, започнати с дисертационната работа като експериментира и с други щамове млечнокисели бактерии, което може да доведе до разработването на нови пробиотични функционални продукти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Въз основа на приложените, от докторантката, различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представеният дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ССА, което ми дава основание да го оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО**.

Въз основа на гореизложеното предлагам да се присъди на ас. Камелия Кирилова Логиновска научната степен “доктор” в област на висше образование: Технически науки, професионално направление 5.12. Хранителни технологии, научна специалност „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини).

Дата: 14.08.2024 г.

ИЗГОТВИЛ СТАНОВИЩЕТО: 

(доц. д-р Светла Дянкова)

OPINION

on a dissertation work for obtaining an educational and scientific degree "doctor" in the field of higher education 5. Technical sciences, professional direction 5.12. Food technologies, scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins).

Topic and author of the dissertation: "Technology for obtaining lyophilized bioactive products based on protein hydrolysates" by assistant professor Kamelia Kirilova Loginovska.

Member of the scientific jury: Assoc. Prof. Svetla Maksimova Dyankova, Ph.D., Institute of Cryobiology and Food Technologies – Agricultural Academy, Sofia, scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins), appointed as a member of the scientific jury by Order No. RD-05-167/23.06.2024 of the Chairman of the Agricultural Academy.

I. Actuality of the problem

The concept of a good quality of life includes many aspects - material well-being, social and work relationships, and above all, physical and mental health, which is the key to longevity and self-confidence. Extensive scientific research over the past decades has established the great importance of a balanced diet in maintaining a healthy lifestyle. In this regard, for example, it has been proven to reduce the risk of the occurrence of a number of socially significant diseases when consuming foods enriched with probiotic bacteria. A significant part of the innovations in the field of food technology are related to the creation of new functional products containing probiotics as well as the development of market niches related to them. Another current trend is the preparation and use of protein hydrolysates of plant and animal origin as sources of low molecular weight peptides with biological activity. Protein hydrolysates from milk and milk products are widely used in the form of protein supplements or clinical dietary formulas with a proven beneficial physiological effect. From this point of view, the dissertation is relevant and significant. The work combines two biotechnological approaches: 1) enzymatic hydrolysis of dairy products and production of protein hydrolysates; 2) applying the obtained hydrolyzates as a substrate for fermentation of selected strains of lactic acid bacteria and establishing the effect on the fermentation time and the survival of the probiotic bacteria. The indisputable actuality of the dissertation work is complemented by the created original technology for the production of lyophilized bioactive products based on milk hydrolysates.

II. Purpose, tasks and methods of research (hypotheses of the dissertation work)

The goal of the dissertation is clear and very well defined. The main hypothesis of the dissertation is based on the expectation that enzymatic protein hydrolysates from fresh cow's milk and whey can be used in the fermentation of lactic acid bacteria, resulting in probiotic products with high biological and especially antioxidant activity. In fulfillment of the set goal, six scientific tasks were formulated, which were successfully completed. The methodology used meets the set goals and objectives and includes a wide range of physicochemical, biochemical and microbiological methods. In the section "Materials and methods" (10 pages) a detailed description of the performed analyzes is given, citing the relevant literature sources.

III. Visual presentation and interpretation of the obtained results. References

Section "Results and discussion" (97 pages) occupies the largest volume of the dissertation work. The experimental work done makes a very good impression. The section presents, in a good scientific and analytical style, the main results of the conducted technological experiments and analyses, according to the set scientific tasks. In the initial stage of the study, the appropriate proteolytic enzymes and substrates were selected to carry out the hydrolysis. The resulting variant protein hydrolysates were analyzed and evaluated in terms of degree of hydrolysis, electrophoretic profiles and antioxidant activity. Based on the results of the analyzes are selected the variants used in the following experiments - fermentation trials with different strains of lactic acid bacteria. At this stage, three strains of probiotic bacteria, different in origin and type, were studied and it was found that two of them -*Lactiplantibacillus plantarum* NBIMCC 3447 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 showed good growth and high viable cell numbers when cultured in media supplemented with hydrolysates. The last stage of the experimental work is related to freeze-drying of the selected variants of probiotic cultures in the respective fermentation media, and the influence of the regime parameters and two cryoprotectants on the survival of the bacterial cells was analyzed. In conclusion, two probiotic products based on enzymatic hydrolysates of milk or whey fermented with the selected strains: *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 were formulated. The developed products were examined for organoleptic, physicochemical, biochemical and microbiological indicators and their storage stability was determined.

The obtained results are visualized in 38 figures and 47 tables. Experimental studies and discussion on each of the scientific tasks are presented, which is indicative of well-planned scientific experiments. The section ends with 11 conclusions that are well-founded and summarize the experimental data.

The literature review is a very good overview of research in the field. The number of cited authors is 243, of which 22 are in Cyrillic. It can be argued that the presented bibliography is up-to-date and in direct relation to the set goals and objectives of the dissertation.

IV. Contributions of the dissertation work (scientific-fundamental and scientific-applied contributions are evaluated separately)

I fully accept the contributions to the dissertation presented by Assistant Professor Loginovska. The author formulated 3 scientific, 5 scientific-applied and 2 applied contributions.

The contributions of scientific importance are the results that enzymatic hydrolysis with proteolytic enzymes and subsequent fermentation with the probiotic bacteria *L. plantarum* and *L. rhamnosus* significantly increases the antioxidant activity of fresh cow's milk and whey. The high cryoprotective effect of locust bean gum on the survival of bacterial cells in fermented milk and whey hydrolysates after freezing and lyophilization was also proven.

The scientific-applied contributions are related to the study of the influence of technological parameters on the degree of hydrolysis of proteins in fresh cow's milk and whey and optimization of the process; determining the effect of addition of hydrolyzed protein substrates in the culture medium on the fermentation process and survival of three strains of probiotic lactic acid bacteria; experimental determination of the most favorable culture media for the propagation of the strains. The main technological parameters of the freeze-drying process ensuring high survival of lactobacilli in milk and whey hydrolysates have also been determined. The presented two **applied contributions** are confirmed with the development and characterization of the two types of original lyophilized functional foods containing a high number of probiotic bacteria.

V. Publication activity and evaluation of the quality of scientific publications

Assistant Loginovska has presented 3 publications on the topic of the dissertation, including one paper as a single author, published in journals, referenced in Scopus or Web of Science. Of these, one article is in a journal with SJR - 0.190 (2023). The total number of points is 54.66, which covers and exceeds the minimum requirements according to LDASRB. The doctoral student has also indicated 6 participations in scientific forums. One of the functional products developed according to the dissertation received a diploma in the innovation competition of the International Agricultural Exhibition Agra 2023. The presented scientometric table fully covers the minimum national requirements and the requirements of the Regulations for the development of the academic staff of the Agricultural Academy for the acquisition of the educational and scientific degree "doctor".

VI. Critical notes, questions and recommendations to the candidate

I have no critical remarks and questions for the candidate. My recommendation is that Assistant Professor Loginovska should continue the research started with the dissertation work by experimenting with other strains of lactic acid bacteria, which could lead to the development of new probiotic products.

CONCLUSION:

Based on the research methods applied, the correctly conducted experiments, the summaries and conclusions made, I consider that the presented dissertation meets the requirements of the LDASRB and Regulations for the Development of the Academic Staff of the Agricultural Academy, which gives me reason to evaluate it **POSITIVELY**.

On the basis of the above, I propose to award Assistant Professor Kamelia Kirilova Loginovska the scientific degree "Doctor" in the field of higher education: Technical Sciences, professional direction 5.12. Food technologies, scientific specialty "Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)".

14.08.2024 г.

MEMBER OF THE JURI:



(Assoc. Prof. Svetla Dyankova, Ph.D)