

РЕЦЕНЗИЯ

СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ	
СОФИЯ	
Вх. №	НУ1-170
	15.08.2024 г.

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

Тема и автор на дисертационния труд: „ТЕХНОЛОГИЯ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ЛИОФИЛИЗИРАНИ БИОАКТИВНИ ПРОДУКТИ НА ОСНОВАТА НА БЕЛТЪЧНИ ХИДРОЛИЗАНТИ“.

Член на научното жури: проф. д-р Николина Найденова Желева, Тракийски университет, гр. Стара Загора, научна специалност „Технология на млякото и млечните продукти”, избрана за член на научното жури със заповед № РД 05-167/28.06.2024 г. от Председателя на Селскостопанска академия, гр. София.

I. Кратко представяне на докторанта

Камелия Кирилова Логиновска е родена на 28.01. 1969 г. Средното си образование завършва в град Усогорск, Русия, а от 1986 до 1992 год. се обучава за Инженер биотехнолог в ОКС Магистър в Технологически институт “Ленсвѐт”, Санкт-Петербург, Русия (Преименуван: Санкт Петербургскии Държавен технологичен институт). Основните предмети, които изучава през това време са биотехнология, микробиология, биологично активни вещества, криобиология и лиофилизация, функционални и пробиотици храни.

От 1999 до 2008 г работи като лаборант последователно в следните институции: Селскостопански институт “Вулкани”, Тел Авив, Израел, Институт “Вулкани” към Селскостопанска Академия на Израел, Вегеринарен Институт “Кимрон”, Тел Авив, Израел. През 2008 г е назначена за Асистент, докторант по научна специалност: „Технология на биологично активните вещества (ензими, хормони, белтъчини), професионално направление шифър: 5.12 ” Хранителни технологии” в Института по Криобиология и Хранителни Технологии, София, където се занимава с биологично активни вещества, криобиология и лиофилизация, функционални и пробиотици храни. От 2018 г до сега участва в множество научни проекти към МОН, ФНИ, ННП, Селскостопанска академия. Владее три чужди езика – английски, иврит и руски.

II. Обща характеристика на дисертацията и автореферата – обем и структура

Дисертационният труд е в общ обем от 185 страници и представлява цялостно изследване за разработването на нови лиофилизирани биоактивни продукти на основата на хидролизати от прясно краве мляко и суроватка, което отговаря на съвременните тенденции в рационалното и здравословното хранене през последните години. Дисертационният труд е добре структуриран като следва класическият формат на разработване на дисертация и съдържа основните раздели – увод, литературен преглед, цел и задачи, материал и методи, резултати и обсъждане, изводи, използвана литература и приложения. Целта и задачите, обект и предмет на изследването са ясно формулирани и логично свързани. В литературният преглед са направени преглед и анализ на актуалността на проблема и на достигнатото ниво в тази област. Обемът на събраната информация отговаря на изискванията на изследването, обработката на данните е направена статистически, има много добра визуализация на представените данни, чрез използването на 49 таблици и 43 фигури. Има солиден брой използвани литературни източници – 243, от които 113 са от последните 10 години, което е добра основа за познаване на проблематиката.

Представеният автореферат е с обем от 45 страници. В него коректно е отразено съдържанието на дисертационният труд, като са посочени основните моменти от литературният преглед, материал и методи, цел и задачи, получени резултати, изводи, приноси и списък на публикациите във връзка с дисертацията.

III. Актуалност на проблема

Големият интерес към рационалното и здравословно хранене през последните години доведе до търсене на нови технологични решения в производството на храни и хранителни добавки. Една от насоките, която е все по-актуална тенденция е разработването и използването на протеинови хидролизати от растителен и животински произход като източници на биоактивни пептиди. Хидролизираният млечен протеин се отличава с бърза и пълна усвояемост от човешкия организъм и има биостимулативен ефект. Белтъкът от краве мляко е най-важният протеинов източник, използван при производството на хидролизати.

С увеличаващото се приложение на протеинови хидролизати от мляко и млечни продукти, както в протеинови добавки, така и в клинични диетични формули, се налага оптимизиране на технологиите за тяхното производство. Това изисква разработването на нови методи, които не само да запазват, но и да усилват биоактивните свойства на протеините.

Настоящият дисертационен труд е посветен на тази актуална област, като изследванията са насочени към разработване на технология за получаване на нови лиофилизирани биоактивни продукти на основата на хидролизати от прясно краве мляко и суроватка. Тези изследвания са от съществено значение както за научното разбиране на процесите, свързани с производството на протеинови хидролизати, така и за практическото приложение на тези технологии в хранителната индустрия. Това значително ще допринесе за подобряване на качеството и ефективността на здравословното хранене.

Разработката се фокусира върху някои от актуалните в тази област елементи:

- Използване на прясно краве мляко и суроватка като белтъчни субстрати за ензимна хидролиза, с цел превръщането им в продукти с висока добавена стойност.
- Оптимизиране на методи за ензимна хидролиза на казеинови и суроватъчни протеини за получаване на биоактивни хидролизати и пептиди, като се изследва влиянието на технологичните параметри като вид, време на действие и концентрация на протеолитични ензими върху степента на хидролиза.
- Проучване на ефекта от добавяне на щамове млечнокисели бактерии (*Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450, и *Lactocaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013) към хидролизирани белтъчни субстрати, за да се определи влиянието върху времето на ферментация и преживяемостта на пробиотичните бактерии.
- Определяне на оптималните параметри на процеса на сублимационно сушене и прилагане на криопротектори за повишаване преживяемостта на бактериалните клетки във ферментиралите млечни и суроватъчни хидролизати след замразяване и лиофилизация.
- Създаване на оригинална технология за производство на биоактивни продукти на основата на млечни хидролизати.

Съществува ограничена научна информация по отношение на използването на протеинови хидролизати като субстрат за ферментация с щамове млечнокисели бактерии, което още веднъж доказва нейната актуалност.

IV. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Литературният обзор на дисертацията съдържа седем раздела. В първият раздел са разгледани същността, получаването и приложението на ензимните протеинови хидролизати в храненето на човека, като на базата на направеният анализ е заключено, че

въпреки че производството на тези продукти е добре установен процес, има голям брой клинични и технологични проблеми, които изискват допълнителни проучвания и решения. Вторият раздел разглежда подробно методите и възможностите за хидролиза на протеини за получаване на биоактивни пептиди от мляко и млечни продукти, след което аналогично следва информация за млякото и суроватката като суровина за получаване на продукти с висока биологична и енергийна стойност. Направен е преглед и върху съществуващата информация в научната литература за пробиотиците – тяхното въздействие върху организма и положителното им влияние, изискванията към тях, за да могат да бъдат използвани при храненето на човека и основните им представители. Шестият раздел на литературният обзор закономерно включва информация за значението и ролята на технологичните параметри - рН, титруема киселинност, температура и време за коагулация за протичане на ферментационния процес. Сублимационното сушене - механизъм на процеса и фактори, влияещи върху качеството на крайните продукти е засегнато в последният раздел на литературният обзор, като по този начин са обхванати всички области, касаещи настоящият дисертационен труд. Отделните раздели са логично свързани и помежду си и са във връзка с темата на дисертационния труд.

Представеният литературен обзор показва добра теоретична подготовка на дисертанта относно разработваният проблем.

V. Методичен подход

Методичната част на дисертационния труд започва с подробно описание на биологичните материали, които са използвани – краве мляко, суроватка, протеолитични ензими, хранителни среди. В хронологична последователност са представени използваните суровини и реактиви, методите за анализ и използваната статистическа обработка.

Лабораторните изследвания са извършени със съвременна апаратура, гарантираща точност при съответните анализи. Използваните от дисертантката методически подходи са правилни, което е показател за много добрата и теоретична подготовка, за придобити умения за планиране и извеждане на експерименти, за анализ и интерпретация на получените данни.

VI. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретации и изводи

В първата точка на раздела Резултати и обсъждане е анализиран подбора на различни по произход протеолитични ензими и определяне на ензимната им активност с цел получаване на белтъчни хидролизати, като източник на биологично активни пептиди.

За провеждане на експериментите са използвани три търговски протеази – папаин, бромелин и химозин. Разгледана е спецификата на всеки един от тях и е обосновано тяхното използване. На трите ензима е определена протеолитична активност, при условия и рН на средата, специфични за дадения ензим. При подбора на подходящ белтъчен субстрат са направени предварителни изследвания върху физикохимичните и органолептични показатели на прясно краве мляко и суроватка от краве мляко. По отношение на биохимичната преценка е установен мастнокиселинният състав както на краве прясно мляко, така и на суроватка. Установен е и антиоксидантният капацитет на изходните продукти, както и техният микробиологичен статус.

След провеждане на подходящите експерименти, дисертанта продължава да работи с млечните и суроватъчните хидролизати показали най-висок антиоксидантен капацитет, а именно:

Хидролизати, получени чрез хидролиза на прясно краве мляко с ензима бромелин в концентрации 0,1mg/ml, 0,5mg/ml и 1,0mg/ml и в продължение на 30 min

Хидролизати, получени чрез хидролиза на суроватка от мляко с ензима папаин в концентрации 0,1mg/ml, 0,5mg/ml и 1,0mg/ml и в продължение на 30 min.

Следващата част от изследванията е свързана с подбор на подходящи щамове микробни култури и на техни сборни асоциации, което включва Ферментация с подобрени щамове млечнокисели бактерии и получаването на функционални продукти с нови физиологични ефекти. За целите на дисертационната работа са подобрени три пробиотични щамове млечнокисели бактерии с доказано полезни за здравето свойства *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lactocaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013. Много внимателно са подобрени показателите и дейностите по отношение на изследванията, които ще дадат необходимата значителност и убедителност на получените резултати - Възстановяване и активиране на бактериалните култури; Приготвяне на инокулум за ферментация; Приготвяне на среда за ферментация; Определяне на технологични параметри за протичане на ферментацията и общ брой микроорганизми; Подбор и приложение на криопротектор; Замразяване и сублимационно сушене на пробиотичните култури след ферментация; Преживяемост на млечнокиселата микрофлора след лиофилизация; Антиоксидантна активност на избрани хидролизати; Електрофоретичен анализ.

Формулирането на рецептурен състав и изготвяне на технологична схема за производство на биоактивни продукти от хидролизиран белтък е засегнато в отделна глава от раздела Резултати и обсъждане. Проведени са експерименти и са определени като подходящи два хидролизата:

- Хидролизат от прясно краве мляко, получен чрез ензимно третиране с бромелин с концентрация 0,1mg/ml за 30 минути (МБЗ);
- Хидролизат от суроватка, получена чрез ензимно третиране с папаин с концентрация 0,5mg/ml за 30 минути (СП7).

Формулирани са два рецептурни състава, включващи поотделно хидролизатите от мляко и суроватка. В състава на новите продукти са включени натурални съставки: Фруктоолигозахариди - нискокалорични, нехранасмилаеми въглехидратни съединения, които стимулират размножаването на полезната стомашно-чревна микробиота в дебелото черво и подпомагат усвояването на хранителните вещества; Ксилитол - захарен алкохол, който не съдържа смилаеми въглехидрати; Манитол - продукт със силно диуретично действие, полезен при състояния със системна констипация и като средство за прочистване на стомашно-чревния тракт; Микрокристална целулоза (МКЦ) – която се характеризира се физиологична инертност, липса на токсичност и голяма хигроскопичност; Фукоза - монозахарид, който е част от въглехидратните съединения на животински, растителни и бактериални клетки; Плод манго или малина.

Описан е подробно технологичният процес, който включва следните операции: I. Получаване и подготовка на основните компоненти по рецептурата; II. Обработка на компонентите по рецептурата; III. Дозиране, смесване, опаковане и етикетирание.

За да се получи една завършена картина на дисертационният труд са изследвани качествените характеристики на получените продукти - органолептични, физикохимични, биохимични и микробиологични показатели, с оглед определяне на техните здравни ползи. Установено е, че произведените функционални продукти на основата на млечни хидролизати са прахообразни с фина консистенция, с приятен, специфичен за състава аромат и цвят с доминиращ млечнокисел вкус. Получените данни, показват, че продуктите получени на основата на белтъчни хидролизати от мляко и суроватка представляват биоактивни хранителни концентрати. На базата на химичния състав е изчислена енергийната стойност на лиофилизираните продукти. И двата продукта са с висока енергийна стойност в сравнение с изходната суровина, като основният носител на енергия е въглехидратно-белтъчният комплекс. Изследвани са също така минералният, мастно- и аминокиселинният състав на произведените продукти, които доказват, че те са

продукти с балансиран състав и висока биологична стойност. Микробиологичното определяне на брой жизнеспособни клетки на пробиотичните бактерии и микробна обсемененост на новите продукти допълва този извод.

VII. Приноси на дисертационния труд

От извършената експериментална работа и получените иновативни резултати за биоактивни продукти на основата на белтъчните хидролизанти са направени три научни, пет научно-приложни и два приложни приноса, с които съм напълно съгласна. Направените приноси са лично дело на автора и произтичат от направеното всеобхватно изследване.

VIII. Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Съгласно приложеният списък са представени са три научни публикации във връзка с дисертационния труд:

1. Логиновска, К., 2021. Получаване на протеинови хидролизанти от краве мляко чрез ензимна обработка. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 24 (4), 10-22. Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troian.

2. Начева И., А. Вълчков, М. Донева, П. Методиева, К. Логиновска. Синбиотични концентрати-съвременно значение за преодоляване на дисбиозата. Институт по криобиология и хранителни технологии, гр. София.

3. Doneva M., K. Loginovska, S. Dyankova, I. Nacheva, P. Metodieva, N. Ninova-Nikolova, 2024. Application of whey protein hydrolysates as a fermentation medium with strains of lactic acid bacteria, *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 59, 1, 15- 22.

Представените научни трудове покриват изискванията на ЗРАСРБ и Правилника на ССА за получаване на ОНС Доктор .

IX. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Високо оценявам положеният труд и постигнатите резултати от докторантката. Препоръката, която бих направила е, че част от информацията, представена в раздел Резултати и обсъждане, може да бъде прехвърлена към раздел Литературен преглед – например описанието на ензимните активности на избраните протеолитични ензими, или към раздел Материал и методи – например методът за определяне на степента на хидролиза или описанието за възстановяване и активиране на бактериалните култури.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Въз основа на приложените от докторантката различни методи на изследване, правилно изведените експерименти, направените обобщения и изводи считам, че представения дисертационен труд отговаря на изискванията на ЗРАСРБ и Правилника за условията и реда придобиване на научни степени в ССА. Това ми дава основание да оценя **ПОЛОЖИТЕЛНО** дисертационният труд и да предложа да се присъди на асистент Камелия Кирилова Логиновска научната и образователната степен „Доктор“ в област на висшето образование 5. „Технически науки“, професионално направление 5.12. „Хранителни технологии“, „Технология на биологично активните вещества (включително ензими, хормони, белтъчини)“.

Дата: 05.08.2024 г.

ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯТА:

1 1 1
0 1 1

REVIEW

Regarding the dissertation for obtaining the academic degree of "Doctor" in the field of higher education 5. "Technical Sciences", professional field 5.12. "Food Technologies", scientific specialty "Technology of Biologically Active Substances (including enzymes, hormones, proteins)".

Topic and author of the dissertation: "TECHNOLOGY FOR OBTAINING LYOPHILIZED BIOACTIVE PRODUCTS BASED ON PROTEIN HYDROLYSATES".

Member of the scientific jury: Prof. Dr. Nikolinka Naydenova Zheleva, Trakia University, Stara Zagora, scientific specialty "Technology of Milk and Dairy Products", appointed as a member of the scientific jury by Order No. RD 05-167/28.06.2024 from the President of the Agricultural Academy, Sofia.

I. Brief presentation of the doctoral candidate

Kamelia Kirilova Loginovska was born on January 28, 1969. She completed her secondary education in Usogorsk, Russia, and from 1986 to 1992, she studied for a Master's degree in Biotechnology Engineering at the Lensovet Technological Institute, St. Petersburg, Russia (now known as St. Petersburg State Technological Institute). The main subjects she studied during this time include biotechnology, microbiology, biologically active substances, cryobiology and lyophilization, functional and probiotic foods.

From 1999 to 2008, she worked as a laboratory technician successively in the following institutions: Volcani Agricultural Research Institute, Tel Aviv, Israel; Volcani Institute of the Agricultural Academy of Israel; and the Kimron Veterinary Institute, Tel Aviv, Israel. In 2008, she was appointed Assistant and PhD candidate in the scientific specialty "Technology of Biologically Active Substances (enzymes, hormones, proteins)", professional field code 5.12 "Food Technologies" at the Institute of Cryobiology and Food Technologies, Sofia, where she focuses on biologically active substances, cryobiology and lyophilization, functional and probiotic foods. Since 2018, she has participated in numerous scientific projects funded by the Ministry of Education and Science, the National Science Fund, the National Scientific Program, and the Agricultural Academy. She is fluent in three foreign languages: English, Hebrew, and Russian.

II. General Characteristics of the Dissertation and Abstract – Volume and Structure

The dissertation is a comprehensive study of 185 pages, dedicated to developing new lyophilized bioactive products based on hydrolysates from fresh cow's milk and whey. This work aligns with contemporary trends in rational and healthy nutrition in recent years. The dissertation is well-structured, following the classical dissertation format, and includes the main sections: introduction, literature review, objectives and tasks, materials and methods, results and discussion, conclusions, references, and appendices. The objectives, tasks, object, and subject of the research are clearly formulated and logically connected. The literature review provides an overview and analysis of the problem's relevance and the level of knowledge in this field. The volume of collected information meets the research requirements, with data processed statistically and well-visualized using 49 tables and 43 figures. The work includes a substantial number of references – 243, of which 113 are from the last 10 years, providing a solid foundation for understanding the issues.

The abstract is 45 pages long and accurately reflects the content of the dissertation. It highlights the key points of the literature review, materials and methods, objectives and tasks, obtained results, conclusions, contributions, and a list of publications related to the dissertation.

III. Relevance of the Problem

The growing interest in rational and healthy nutrition in recent years has led to the search for new technological solutions in food and dietary supplement production. One of the increasingly relevant trends is the development and use of protein hydrolysates of plant and animal origin as sources of bioactive peptides. Hydrolyzed milk protein is characterized by rapid and complete absorption by the human body and has a biostimulatory effect. Cow's milk protein is the most important protein source used in hydrolysate production.

With the increasing application of milk and dairy protein hydrolysates in protein supplements and clinical dietary formulas, there is a need to optimize production technologies. This requires the development of new methods that not only preserve but also enhance the bioactive properties of proteins.

This dissertation is dedicated to this relevant area, with research focused on developing a technology for obtaining new lyophilized bioactive products based on hydrolysates from fresh cow's milk and whey. These studies are crucial for both the scientific understanding of the processes involved in protein hydrolysate production and the practical application of these technologies in the food industry. This will significantly contribute to improving the quality and effectiveness of healthy nutrition.

The research focuses on several current elements in this field:

- Utilizing fresh cow's milk and whey as protein substrates for enzymatic hydrolysis, aiming to convert them into high-value-added products.
- Optimizing methods for the enzymatic hydrolysis of casein and whey proteins to obtain bioactive hydrolysates and peptides, investigating the influence of technological parameters such as type, duration, and concentration of proteolytic enzymes on the degree of hydrolysis.
- Studying the effect of adding strains of lactic acid bacteria (*Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450, and *Lactocaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013) to hydrolyzed protein substrates to determine their impact on fermentation time and probiotic bacteria survival.
- Determining the optimal parameters of the sublimation drying process and applying cryoprotectants to enhance the survival of bacterial cells in fermented milk and whey hydrolysates after freezing and lyophilization.
- Creating an original technology for producing bioactive products based on milk hydrolysates.

There is limited scientific information regarding the use of protein hydrolysates as substrates for fermentation with strains of lactic acid bacteria, further proving its relevance.

IV. Literature Awareness and Theoretical Preparation of the Candidate

The literature review of the dissertation contains seven sections. The first section examines the nature, production, and application of enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Based on the analysis, it is concluded that although the production of these products is a well-established process, there are numerous clinical and technological problems that require further research and solutions. The second section provides a detailed review of the methods and possibilities for protein hydrolysis to obtain bioactive peptides from milk and dairy products. Following this, information on milk and whey as raw materials for obtaining products with high biological and energy value is provided. A review of the existing information in scientific literature on probiotics—their effects on the body, positive impacts, requirements for their use in human nutrition, and their main representatives—is also included. The sixth section of the literature review appropriately includes information on the importance and role of technological parameters—pH, titratable acidity, temperature, and coagulation time—in the fermentation process. The final section of the literature review discusses sublimation drying, its process mechanism, and factors affecting the quality of the final products. Thus, all areas related to the current dissertation are covered. The individual sections are logically connected and aligned with the dissertation topic.

The presented literature review demonstrates the candidate's good theoretical preparation regarding the researched problem.

V. Methodological Approach

The methodological part of the dissertation begins with a detailed description of the biological materials used—cow's milk, whey, proteolytic enzymes, and culture media. The raw materials and reagents used, methods of analysis, and applied statistical processing are presented in chronological order.

The laboratory studies were conducted using modern equipment, ensuring accuracy in the respective analyses. The methodological approaches used by the candidate are correct, indicating very good theoretical preparation, acquired skills for planning and conducting experiments, and the ability to analyze and interpret the obtained data.

VI. Significance and Convincingness of the Results, Interpretations, and Conclusions

The first section of the "Results and Discussion" chapter analyzes the selection of proteolytic enzymes of different origins and determines their enzymatic activity to obtain protein hydrolysates as sources of biologically active peptides. Three commercial proteases—papain, bromelain, and chymosin—were used for the experiments. The specificity of each enzyme is discussed, and their use is justified. The proteolytic activity of the three enzymes was determined under conditions and pH specific to each enzyme. Preliminary studies on the physicochemical and organoleptic properties of fresh cow's milk and cow's milk whey were conducted to select a suitable protein substrate. The biochemical assessment included the determination of the fatty acid composition of both fresh cow's milk and whey. The antioxidant capacity and microbiological status of the starting products were also established.

After conducting appropriate experiments, the candidate continued to work with milk and whey hydrolysates that demonstrated the highest antioxidant capacity, namely:

- Hydrolysates obtained by hydrolyzing fresh cow's milk with bromelain at concentrations of 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, and 1.0 mg/ml for 30 minutes.
- Hydrolysates obtained by hydrolyzing milk whey with papain at concentrations of 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, and 1.0 mg/ml for 30 minutes.

The next part of the research involved selecting suitable strains of microbial cultures and their composite associations, including fermentation with selected lactic acid bacteria strains to obtain functional products with new physiological effects. For the purposes of the dissertation, three probiotic strains of lactic acid bacteria with proven health benefits were selected: *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC

2450, and *Lactobacillus rhamnosus* NBIMCC 1013. The indicators and activities related to the research were carefully selected to ensure the significance and convincingness of the obtained results, including the revival and activation of bacterial cultures, preparation of inoculum for fermentation, preparation of fermentation medium, determination of technological parameters for the fermentation process and total number of microorganisms, selection and application of cryoprotectant, freezing and sublimation drying of probiotic cultures after fermentation, survival of lactic acid microflora after lyophilization, antioxidant activity of selected hydrolysates, and electrophoretic analysis.

Formulating the recipe and preparing the technological scheme for producing bioactive products from hydrolyzed protein is covered in a separate chapter of the "Results and Discussion" section. Experiments were conducted and two hydrolysates were deemed suitable:

- Hydrolysate from fresh cow's milk, obtained by enzymatic treatment with bromelain at a concentration of 0.1 mg/ml for 30 minutes (MB3).
- Hydrolysate from whey, obtained by enzymatic treatment with papain at a concentration of 0.5 mg/ml for 30 minutes (SP7).

Two recipes were formulated, each including the milk and whey hydrolysates separately. The new products' composition includes natural ingredients: fructooligosaccharides—low-calorie, indigestible carbohydrate compounds that stimulate the growth of beneficial gut microbiota in the colon and aid in nutrient absorption; xylitol—a sugar alcohol that contains no digestible carbohydrates; mannitol—a product with strong diuretic action, beneficial for conditions of systemic constipation and as a means for gastrointestinal tract cleansing; microcrystalline cellulose (MCC)—characterized by physiological inertness, lack of toxicity, and high hygroscopicity; fucose—a monosaccharide that is part of the carbohydrate compounds of animal, plant, and bacterial cells; and mango or raspberry fruit.

The technological process is detailed, including the following operations:

1. Obtaining and preparing the main components according to the recipe.
2. Processing the components according to the recipe.
3. Dosing, mixing, packaging, and labeling.

To provide a comprehensive view of the dissertation work, the qualitative characteristics of the obtained products were studied—organoleptic, physicochemical, biochemical, and microbiological indicators were evaluated to determine their health benefits. It was found that the functional products produced based on milk hydrolysates are fine powdered, with a pleasant, specific aroma and color, and a dominant lactic acid taste. The obtained data show that products based on milk and whey protein hydrolysates are bioactive food concentrates. Based on their

chemical composition, the energy value of the lyophilized products was calculated. Both products have higher energy values compared to the raw material, with the main energy carrier being the carbohydrate-protein complex. The mineral, fatty acid, and amino acid compositions of the produced products were also examined, proving them to be products with a balanced composition and high biological value. The microbiological determination of the number of viable probiotic bacterial cells and microbial contamination of the new products further supports this conclusion.

VII. Contributions of the Dissertation Work

From the experimental work conducted and the innovative results obtained for bioactive products based on protein hydrolysates, three scientific, five scientific-applied, and two applied contributions have been made, with which I fully agree. The contributions made are the personal work of the author and result from comprehensive research.

VIII. Publication Activity and Assessment of the Quality of Scientific Publications

According to the attached list, three scientific publications related to the dissertation work are presented:

1. Loginovska, K., 2021. Obtaining Protein Hydrolysates from Cow's Milk through Enzymatic Processing. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 24 (4), 10-22. Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan.

2. Nacheva I., A. Valchkov, M. Doneva, P. Metodieva, K. Loginovska. Synbiotic Concentrates—Modern Significance for Overcoming Dysbiosis. Institute of Cryobiology and Food Technologies, Sofia.

3. Doneva M., K. Loginovska, S. Dyankova, I. Nacheva, P. Metodieva, N. Ninova-Nikolova, 2024. Application of Whey Protein Hydrolysates as a Fermentation Medium with Strains of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 59, 1, 15-22.

The presented scientific works meet the requirements of ZRASRB and the SSA Regulations for obtaining the educational and scientific degree of PhD.

IX. Critical Remarks, Questions, and Recommendations to the Candidate

I highly appreciate the work and the results achieved by the doctoral candidate. The recommendation I would make is that some of the information presented in the "Results and Discussion" section could be transferred to the "Literature Review" section—such as the description of the enzymatic activities of the selected proteolytic enzymes, or to the "Materials and Methods" section—such as the method for determining the degree of hydrolysis or the description of the revival and activation of bacterial cultures.

CONCLUSION:

Based on the various research methods applied by the doctoral candidate, the correctly conducted experiments, and the summaries and conclusions drawn, I consider that the presented dissertation meets the requirements of ZRASRB and the Regulations for the conditions and procedures for obtaining scientific degrees in SSA. This gives me grounds to positively evaluate the dissertation and propose that Assistant Kamelia Kirilova Loginovska be awarded the scientific degree of "PhDr" in the field of higher education 5. "Technical Sciences", professional direction 5.12. "Food Technologies", "Technology of Biologically Active Substances (including enzymes, hormones, proteins)".

Date: 05.08.2024

Prepared by the Reviewer:

A white rectangular box redacting the signature of the reviewer. There are some faint handwritten marks above and to the right of the box.