

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната 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“, разработен от ас. Камелия Кирилова Логиновска, задочен докторант в ИКХТ-София

научни ръководители: проф. д-р Илиана Борисова Начева и доц. д-р Мария Дончева Донева - Николова

Член на научното жури: проф. д-р Гюрга Стефанова Михайлова, Тракийски университет - Стара Загора (пенсионер), 5. Технически науки, 5.12 Хранителни технологии, научна специалност: „Технология на млякото и млечните продукти“, определена за член на научното жури със заповед № РД-05-167/ 23.06.2024 г. на Председателя на ССА - София.

I. Кратко представяне на докторанта

Ас. Камелия Кирилова Логиновска е родена 1969 г. През 1992 г. завършва висше образование в Ленинградски технологически университет - Русия в ОКС „магистър“ със специалност „Биотехнология“ и професионална квалификация инженер-технолог. Съгласно нормативната уредба у нас придобитото в чужбина висше образование е признато от МОН на Р България през 2008 г.

През периода 1995-1996 г. инж. Логиновска работи като инспектор застрахователна дейност в гр. София. През 1999 г. започва работа в Селскостопански институт „Вулкани“, Тел Авив - Израел, където е назначена като лаборант и придобива умения свързани с култивиране и размножаване на семена. Годишите 2000-2006 тя е ръководител на хистологична лаборатория в Селскостопанска академия „Вулкани“ - Тел Авив, а 2007-2008 г. е на работа във Ветеринарен институт „Кимрон“, Тел Авив - Израел, където извършва лабораторна дейност насочена към изследване на вируси. От 2008 г. до настоящия момент е на работа в Институт по криобиология и хранителни технологии - София.

През 2019 г. тя е зачислена за докторант в задочна форма на обучение по докторска програма „Технология на биологично активните вещества (вкл. ензими, хормони, белтъчини)“ в ИКХТ - София. По време на докторантурата е положила изпити – обща и специална част, на които е получила отлични оценки. Отчислена е с право на защита през 2023 г.

Компетенциите, които ас. Логиновска посочва, че притежава са: отлично владение на руски език и иврит, и добро на английски, умения за работа със специфична лабораторна апаратура, компютърни умения, способност за работа в екип и добри комуникационни и организационни качества. От 1998 до 2006 г. има проведени различни курсове и обучения в Израел по: Разпознаване и проверка чистотата на сортове семена, Биотехнология в селското стопанство, От биология към нанотехнология, Биоинформатика, Физиология на растенията, Биология на растенията, Безопасност и проверка на качеството по стандарта ISO. Представеното е доказателство, че по време на

професионалното ѝ развитие се наблюдава стремеж за придобиване на теоретични знания и практически умения с оглед повишаване на квалификацията.

Докторантът извършва активна научноизследователска дейност, свидетелство за което е участието в 6 научни конференции проведени у нас и 9 научни проекта, като 4 бр. са към ССА, 4 бр. – към ФНИ при МОН и 1 бр. е по Национална научна програма към МОН.

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

Представеният дисертационен труд е оформен на 185 стр. в т. ч. 49 таблици и 43 фигури. Същият е структуриран правилно по отношение на основните раздели необходими за дисертационен труд и по форма отговаря на изискванията за този вид научни трудове. Дисертационният труд включва следните глави: въведение, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати и обсъждане, основни изводи, литературни източници, приноси и публикации във връзка с дисертацията, което е в съответствие със специфичните изисквания на ССА. Допълнително са изнесени списък с използвани съкращения, списъци с включените в текста фигури и таблици, както и участия в научни конференции и проекти, и обучения и награди.

Въведението е оформено на 2 стр., насочено към получаването на протеинови хидролизати от животински произход, респ. млечни продукти, като източници на биоактивни пептиди.

Литературният обзор включва 7 раздела, систематизирани на 30 стр. В него са обхванати въпроси свързани с експерименталната дейност по разглежданата тема. Първият раздел е насочен към приложение на ензимни протеинови хидролизати в храненето на човека; втория касае възможности за хидролиза на протеини за получаване на биоактивни пептиди от мляко и млечни продукти; в следващия раздел са описани видове биоактивни пептиди, след което се разглежда биологична и енергийна стойност на млякото и суроватката, следва приложение на пробиотичните бактерии, роля на технологичните параметри за протичане на ферментационен процес и прилагане на сублимационно сушене при получаване на функционални продукти.

Целта кореспондира на заглавието, дефинирана е ясно. Посочени са 6 задачи за нейното реализиране. За изпълнение на поставените задачи е използван широк набор от подходящи методи на изследване. Реализирането на поставената цел е съпроводено с: анализ на сурово краве мляко и суроватка от бяло саламурено сирене; биохимични изследвания на хидролизати; проследяване на ферментационния процес с подобрени щамове млечнокисели бактерии; получаване на нови функционални продукти; разработване на технология за производство на биоактивни продукти от хидролизиран белтък, и качествена характеристика на получените продукти.

Авторефератът е структуриран на 45 стр. и отразява основните резултати от дисертационния труд, илюстрирани чрез 25 таблици и 15 фигури.

III. Актуалност на проблема

Основната цел на дисертационния труд е разработване на технология за получаване на лиофилизирани биоактивни продукти на основата на хидролизати от краве мляко и суроватка. През последните години се наблюдава повишен интерес към биоактивните пептиди, получени от хранителни протеини, като един от начините за получаване на хидролизирани хранителни протеини е чрез ферментация на суровини от растителен и животински произход с млечнокисели бактерии. Темата е актуална тъй като интересът към рационалното и здравословно хранене създава предпоставки за търсене на технологични решения при производството на функционални храни със

здравословни ползи за организма. Актуална тенденция в тази област е получаването и използването на протеинови хидролизати от млечни продукти, като източници на биоактивни пептиди поради факта, че хидролизиращият млечен протеин бързо се усвоява от човешкия организъм, а белтъкът от краве мляко е важен протеинов източник при получаване на хидролизати.

Представеният дисертационен труд съдържа комплексни проучвания с широк обхват на изследвани показатели. Извършени са изследвания, в резултат на което са получени данни в 3 основни направления, а именно – получаване на млечни и суроватъчни хидролизати и характеристика на получените хидролизати; установяване ефекта на някои щамове млечнокисели бактерии върху ферментационния процес и параметри на сублимационно сушене; и разработване на технология за производство на функционални храни на основата на млечни хидролизати използвайки криопротектори за повишаване преживяемостта на бактериалните клетки.

Приложени са биотехнологични подходи за получаване на функционални продукти, което е дало възможност за провеждане на интересни научни проучвания в това направление. В този смисъл темата избрана от докторанта и научните ръководители е съвременна, актуална, свързана с практиката и потребностите от разработване на нови функционални продукти на база хидролизирани протеини от мляко и суроватка.

Считам, че дисертацията има научно-теоретична и практическа стойност, с висока степен на актуалност, като дава възможност изследванията да продължат.

IV. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Прегледът на литературата е изцяло във връзка с изследването, повечето литературни източници са в областта на темата и са предпоставка за получаване на оригинални резултати. В литературният списък са включени 243 литературни източници, от които 22 на кирилица. Над 60% от заглавията са след 2010 г. Представения литературен преглед показва, че авторът на дисертацията е компетентен по темата и познава състоянието на проблема, което е дало възможност за ясно формулиране на задачите с оглед търсене на отговор на поставената цел. Постигната е необходимата информираност по разработваните задачи, знания по провеждането на експерименти, по представяне на сравнителните анализи и дискусията на резултатите. Анализът на литературата позволява на ас. Логиновска да открие обективни предпоставки за избора на тема и възможност за надграждане на знанията в областта на функционалните храни.

Намирам за положително завършването на литературния преглед с обобщение на постигнатото по проучваната тема. Прави впечатление, че в обобщените изводи на обзора се акцентира на клиничното хранене, здравословните ползи на пептидите и пробиотичните млечнокисели бактерии, и мястото на сублимационното сушене като предпоставка за получаване на функционални пробиотични продукти на основата на млечни хидролизати, в което се съдържа актуалността на разработката. Отбелязвам този факт, защото това синтезирано обобщение е в основата на предвидените от автора изследвания, които са насочени от една страна към оптимизиране на ензимната хидролиза на протеини (казеин и суроватъчни) и от друга към ефекта на щамове млечнокисели бактерии върху ферментационния процес с оглед получаването на функционални продукти на основата на млечни хидролизати. На тази база е разработена технология и е формулиран рецептурен състав за производството на два функционални продукта.

V. Методичен подход

Смятам че избраният методичен подход при разработването на дисертационния труд е много добър. Разделът Материали и методи е структуриран на 10 стр. и включва описание на етапите на разработката. Към Материали е посочено, че са изследвани проби от краве мляко и суроватка, представена е информация за използваните суровини и реактиви, протеолитични ензими, микроорганизми, пребиотични компоненти и хранителни среди. Постановката на експерименталната работа е правилна и кореспондира на задачите, а избраната методика съответства на комплексния характер на изследването. Използвани са класически и съвременни методи за оценка и анализ – физикохимични, биохимични, микробиологични, хроматографски, статистически методи за обработка на данните. Подбраните аналитични методи са референтни и гарантират достоверност на резултатите.

В резултат на разработката е предложена технология за производство на функционални продукти като по този начин е постигната практическа завършеност на дисертационния труд. По време на проучването и провеждането на експериментите докторантът е усвоил и приложил значителен брой техники и методи на изследване, придобил е необходимия опит за обобщаване на литературни източници и за провеждане на научен експеримент, което е основание да се даде висока оценка на постигнатото в това отношение. Считаю, че е изпълнен образователния елемент на ОНС „доктор“.

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

Получените резултати заемат съществен дял в структурата на дисертацията – представени са на 95 стр., което е и доказателство за значителния обем от извършената експериментална работа. Резултатите и тяхната дискусия са представени в 8 раздела, които съответстват на поставените задачи. В отделните подраздели е представена богата информация от данни, илюстрирани с таблици и фигури, на базата на следното: Ензимна активност на два растителни и един животински ензими; Данни от качествена характеристика на краве мляко и суроватка; Промени в степента на хидролиза при различни концентрации на използваните ензими; Биохимични изследвания на получените хидролизати; Експерименти с подбрани щамове микроорганизми; Ферментация на селектираните щамове; Разработване на технология за получаване на биопродукти от хидролизиран белтък и Качествена характеристика на получените продукти. Много добро впечатление прави и приложения собствен снимков материал.

В началото на Резултатите е отделено внимание на произхода на използваните протеолитични ензими – папаин, бромелин и химозин, механизма им на действие и тяхната протеолитична активност. В следващия раздел ас. Логиновска представя информация за кравето мляко и суроватката – физикохимични показатели, групи мастни киселини, антиоксидантна активност, общ брой микроорганизми, плесени и дрожди.

Съществена част в дисертацията представляват данните касаещи промените, които настъпват по време на хидролизата в зависимост от вида на протеолитичния ензим (за посочените по-горе 3 ензима), концентрацията на ензимите (проучени са 3 различни концентрации) и времето им на действие (проследени са 4 времена на хидролиза). В резултат на експериментите са получени стойности за степен на хидролиза, извършено е електрофоретичното разделяне на белтъчните хидролизати и са получени данни за антиоксидантен капацитет на хидролизатите от краве мляко и суроватка, на базата на което са подбрани млечните и суроватъчни хидролизати показали най-висок антиоксидантен капацитет. Такива са хидролизатите на краве мляко с ензима бромелин в концентрации 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml и 1.0 mg/ml и в продължение на 30 min, и на

суроватка с ензима папаин в концентрации 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml и 1.0 mg/ml и в продължение на 30 min.

Следващата част касае процеса ферментация – подбрани са 3 пробиотични щама получени от различни източници, в случая кисело зеле, фекалии и млечни продукти (съответно *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013) с оглед осигуряване на специфични характеристики в крайния ферментирал продукт. Отчетен е броят на жизнеспособните клетки на трите изследвани пробиотични бактерии при различни температурни режими – 32, 37 и 40 °C. Показани са микроскопски картини, направени след ферментация на шамовете в среди с млечни и суроватъчни хидролизати с ниски и високи концентрации на ензимно третиране на субстрата. Експериментирани са два варианта за криопротектори при лиофилизация на разработените пробиотични продукти. Проследена е преживяемостта на пробиотичните бактерии след лиофилизация. Установена е антиоксидантната активност на изследваното мляко и суроватка и техните хидролизати, както и на тези след ферментация. Проведени са електрофоретични анализи на вариантите хидролизати, показали най-висока антиоксидантна активност.

Последната част от дисертационния труд е свързана с разработване на нови функционални продукти, на които е формулиран рецептурен състав и е изготвена технологична схема за производство на биоактивни продукти от хидролизиран белтък. С оглед определяне на здравните ползи е извършена качествените характеристики на получените продукти по отношение на органолептични, физикохимични, биохимични и микробиологични показатели, а при три температурни режима – стайна температура на съхранение, хладилна температура (+4 °C) и съхранение във фризер (-18 °C) е проследена преживяемостта на микроорганизмите за период от 1 година. Получените данни показват, че новите продукти на основата на белтъчни хидролизати от краве мляко и суроватка, получена от краве бяло саламурено сирене, представляват биоактивни хранителни концентрати.

Получените резултати са обобщени в таблици и представени чрез фигури, което ги прави лесни за възприемане и проследяване. Така представени резултатите са убедителни и значими, а интерпретацията им е достоверна чрез направеното качествено и количествено сравнение.

В резултат на проведените изследвания са оформени 11 основни извода, които произтичат от получените резултати. Намирам за положителен факта, че някои от изводите са подкрепени с конкретни експериментални данни.

VII. Приноси на дисертационния труд

Дисертационния труд на ас. Камелия Логиновска съдържа елементи на оригинална научно-приложна разработка, с която се усъвършенстват и надграждат знанията в актуалната тема насочена към създаване на функционални продукти с полезни за здравето биологични свойства. Значителна част от резултатите са свързани с провеждане на експерименти за разработване и получаване на краен продукт, което показва завършеност и реализация на една научна идея. Авторът на дисертационния труд е оформил приноси в 3 направления – научни, научно-приложни и приложни, чийто общ брой е 10, които принципно приемам като ги систематизирам по следния начин:

Научни приноси

Извършено е комплексно изследване върху ензимна хидролиза на краве мляко и суроватка от краве бяло саламурено сирене в качеството им на белтъчни субстрати и

превръщането им в продукти с висока биологична стойност, в резултат на което са получени данни по отношение на антиоксидантен капацитет на хидролизатите.

Установен е ефекта от добавянето на щамове млечнокисели бактерии, изолирани от 3 различни източника (*Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013), към хидролизирани белтъчни субстрати върху времето на протичане на ферментацията и преживяемостта на пробиотичните бактерии.

Проведени са електрофоретични анализи на вариантите хидролизати, показали най-висока антиоксидантна активност и подбрани за провеждане на ферментация с два от изследваните щамове – *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013.

Научно-приложни приноси

Проучено е влиянието на технологичните параметри – вид, концентрация и време на действие на 3 протеолитични ензими (папаин, бромелин и химозин), върху степента на хидролиза на протеинови субстрати (мляко и суроватка), при което е установено, че хидролизата зависи в по-голяма степен от концентрацията на използвания ензим и в по-малка степен – от времето на третиране.

Установено е, че хидролизатите както при млякото така и при суроватката, получени при третиране с папаин и бромелин в концентрации 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml и 1.0 mg/ml, проявяват нарастващи антиоксидантни свойства до 30 min от действието на ензима и леко понижаване към 60 min.

Определени са оптималните параметри на сублимационно сушене и прилагане на криопротектори за повишаване преживяемостта на бактериалните клетки във ферментирани млечни и суроватъчни хидролизати след замразяване и лиофилизация като е установено, че използването на криопротектори повишава преживяемостта на бактериалните клетки на *Lactiplantibacillus plantarum* NBIMCC 3447 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 в млечните и суроватъчни хидролизати.

Установен е по-висок криозащитен ефект на гума Локуст бийн в качеството ѝ на криопротектор в сравнение с комбинацията от захароза и пектин като криопротектор върху преживяемостта на бактериалните клетки.

Приложни приноси

Проведени са експерименти, при които като най-благоприятни вариантни среди за размножаване на щамове млечнокисели бактерии (*Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013) са определени хидролизат от краве мляко, получен чрез ензимно третиране с бромелин с концентрация 0.1 mg/ml за 30 min и този от суроватка, получен чрез ензимно третиране с папаин с концентрация 0.5 mg/ml за 30 min.

Разработена е технологична схема за експериментално производство на два биоактивни продукта, включващи млечен или суроватъчен хидролизат, пробиотичен щам показали най-високи стойности на преживяемост по време на ферментация и след процеса на лиофилизация, пребиотични компоненти, плодове и натурални подсладители.

Представени са рецептурните състави на 2 лиофилизирани продукта на основата на хидролизат с 10% добавен плод, съответно от краве мляко с лиофилизирано манго и от суроватка с лиофилизирана малина.

Полученият обем от данни дава възможност за използването им при бъдещи изследвания свързани с получаването на функционални храни на основата на белтъчни хидролизати.

VIII. Публикационна активност и оценка на качеството на научните публикации

Във връзка с дисертационния труд са представени 3 научни публикации, които са отпечатани в списания реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация (Web of Science). На 1 публикация автора е единствен, в 1 бр. е първи, и в 1 бр. – втори автор. Представените публикации са от периода 2021-2024 г. За публикациите е представена попълнена справка за изпълнение на минималните национални изисквания, респ. тези на ССА, от която е видно, че с тях се покриват необходимите наукометрични точки, заложи в националните изисквания за образователната и научна степен „доктор“ – постигнати 54.6 т. при необходими 30 т.

Представените публикации във връзка с данни от дисертационния труд, постигнатите резултати в резултат на проведените експерименти и тяхната интерпретация, оформените изводи и формулирането на приноси ми дават основание да считам, че е постигнат и научния елемент на степента „доктор“.

IX. Критични бележки, въпроси и препоръки към кандидата

Към представеният дисертационен труд нямам съществени бележки и препоръки, тъй като по-голямата част от направените предложения за промени при предварителното разглеждане на проекта за дисертация са взети под внимание от ас. Логиновска. В дисертационния труд са допуснати някои пропуски от технически характер, които се отнасят до следното: Наблюдават се елементи на литературен преглед в раздела Резултати и обсъждане, например стр. 65-66 касаещи описание на използваните ензими (папаин, бромелин и химозин), също стр. 94 както и стр. 100-101 свързани с шамове бактерии. По отношение на списъка с литературните източници при представяне на авторите се среща различен начин на изписването им – напр. при някои източници не са използвани инициалите на името, а авторите са представени с име и фамилия (№ 27, 34, 36, 37, 39, 45, 48).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложеният дисертационен труд е научно изследване в актуална област, съдържа научни, научно-приложни и приложни приноси. Въз основа на приложените, от докторанта, 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 образователната 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)“.

Дата: 29.07.2024 г.
гр. Стара Загора

ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯТА: ..
(проф. дсн Гюрга Михайлова)

REVIEW

on a dissertation work for obtaining of the educational and scientific degree “doctor” in the field of higher education 5. Technical sciences, professional area 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”, developed by Assistant Professor Kamelia Kirilova Loginovska, part-time doctoral student at the Institute of Cryobiology and Food Technology - Sofia

scientific supervisors: Prof. Iliana Borisova Nacheva, PhD and Associate Professor Maria Doncheva Doneva - Nikolova, PhD

Member of the scientific jury: Prof. Gyurga Stefanova Mihaylova, DSc, Trakia University - Stara Zagora (retired), 5. Technical sciences, 5.12 Food technologies, scientific specialty: “Technology of milk and dairy products”, appointed as a member of the scientific jury by order № RD-05-167/ 23.06.2024 by the Chairman of the AA - Sofia

I. Brief presentation of the doctoral student

Assistant Prof. Kamelia Kirilova Loginovska was born in 1969. In 1992, she completed higher education at the Leningrad Technological University - Russia, Master's educational and qualification degree in the specialty “Biotechnology” and a professional qualification as an engineer-technologist. According to the regulations in our country, the higher education acquired abroad was recognized by the Ministry of Education and Science of the Republic of Bulgaria in 2008.

During the period 1995-1996, eng. Loginovska worked as an insurance activity inspector in the city of Sofia. In 1999, she started working at the Agricultural Institute “Vulcani”, Tel Aviv - Israel, where she was appointed as laboratory assistant and acquires skills related to seed cultivation and propagation. In the years 2000-2006, she was the head of the histology laboratory at the Agricultural Academy “Vulcani” - Tel Aviv, and 2007-2008 she worked at the Veterinary Institute “Kimron”, Tel Aviv - Israel, where she carries out laboratory activities aimed at researching viruses. Since 2008 until now she is working at the Institute of Cryobiology and Food Technologies - Sofia.

In 2019, she was enrolled as a doctoral student in part-time study in the doctoral program “Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)” at ICFT - Sofia. During her doctoral studies, she took exams - general and special part, in which she passed excellent grades. She was charged with the right of defense in 2023.

The competencies that Assistant Professor Loginovska states that she possesses are: excellent command of Russian and Hebrew, and good English, skills in working with specific laboratory equipment, computer skills, ability to work in a team and good communication and organizational qualities. From 1998 to 2006, various courses and trainings were held in Israel on: Identification and purity verification of seed varieties, Biotechnology in agriculture, From biology to nanotechnology, Bioinformatics, Plant physiology, Plant biology, Safety and quality control in the ISO standard. The presented evidence is that during her professional development there was an aspiration to acquire theoretical knowledge and practical skills with a view to increasing her qualifications.

The doctoral student carries out active research activities, evidence of which is the participation in 6 scientific conferences held in our country and 9 scientific projects, such as 4 pcs. belong to the AA, 4 pcs. - to the Scientific Research Fund at the Ministry of Education and Science and 1 pc. is under the National Science Program at the Ministry of Education and Science.

II. General characteristics of the dissertation and abstract - volume and structure

The presented dissertation consists of 185 pages, including 49 tables and 43 figures. It is structured correctly in terms of the main sections required for a dissertation work and in terms of form meets the requirements for this type of scientific works. The dissertation includes the following chapters: introduction, literature review, aim and objectives, materials and methods, results and discussion, main conclusions, literature sources, contributions and publications in connection with the dissertation, which is in accordance with the specific requirements of the AA. In addition, a list of used abbreviations, lists of figures and tables included in the text, as well as participation in scientific conferences and projects, and trainings and awards are presented.

The introduction is formatted on 2 pages, aimed at the preparation of protein hydrolysates of animal origin, resp. dairy products as sources of bioactive peptides.

The literature review includes 7 sections, systematized on 30 pages. It covers questions related to the experimental activity on the subject under consideration. The first section is aimed at application of enzymatic protein hydrolysates in human nutrition; the second concerns possibilities of hydrolysis of proteins to obtain bioactive peptides from milk and milk products; in the next section, types of bioactive peptides are described, then the biological and energy value of milk and whey is considered, followed by the application of probiotic bacteria, the role of technological parameters for the fermentation process and the application of freeze-drying in the preparation of functional products.

The purpose corresponds to the title, it is clearly defined. 6 tasks are indicated for its realization. A wide range of appropriate research methods was used to fulfill the set tasks. The realization of the set goal is accompanied by: analysis of raw cow's milk and whey from white brine cheese; biochemical studies of hydrolysates; tracking the fermentation process with selected strains of lactic acid bacteria; obtaining new functional products; development of a technology for the production of bioactive products from hydrolyzed protein, and qualitative characteristics of the obtained products.

The abstract is structured on 45 pages and reflects the main results of the dissertation work, illustrated by 25 tables and 15 figures.

III. Relevance of the problem

The main goal of the dissertation work is to develop a technology for obtaining lyophilized bioactive products based on hydrolysates from cow's milk and whey. In recent years, there has been an increased interest in bioactive peptides derived from food proteins, and one of the ways to obtain hydrolyzed food proteins is through the fermentation of raw materials of plant and animal origin with lactic acid bacteria. The topic is relevant because the interest in rational and healthy nutrition creates prerequisites for the search for technological solutions in the production of functional foods with healthy benefits for the body. An actual trend in this field is the preparation and use of protein hydrolysates from dairy products as sources of bioactive peptides due to the fact that hydrolyzed milk protein is quickly absorbed by the human body, and cow's milk protein is an important protein source in the preparation of hydrolysates.

The presented dissertation contains complex studies with a wide range of investigated indicators. Research was carried out, as a result of which data was obtained in 3 main directions, namely – production of milk and whey hydrolysates and characterization of the obtained hydrolysates; establishing the effect of some strains of lactic acid bacteria on the fermentation process and freeze-drying parameters; and development of a technology for the production of functional foods based on milk hydrolysates using cryoprotectants to increase the survival of bacterial cells.

Biotechnological approaches have been applied to obtain functional products, which has made it possible to conduct interesting scientific studies in this direction. In this sense, the topic chosen by the doctoral student and the scientific supervisors is contemporary, relevant, related to practice and the needs of developing new functional products based on hydrolyzed proteins from milk and whey.

I believe that the dissertation has a scientific-theoretical and practical value, with a high degree of relevance, giving the opportunity to continue the research.

IV. Literary awareness and theoretical preparation of the candidate

The literature review is entirely related to the research, most literature sources are in the subject area and are a prerequisite for obtaining original results. The literature list includes 243 literary sources, of which 22 are in Cyrillic. Over 60% of the titles are after 2010. The presented literature review shows that the author of the dissertation is competent on the subject and knows the state of the problem, which made it possible to clearly formulate the tasks with a view to finding an answer to the set goal. The necessary awareness of the developed tasks, knowledge of conducting experiments, presentation of comparative analyzes and discussion of the results has been achieved. The analysis of the literature allows Assistant Professor Loginovska to identify objective prerequisites for choosing a topic and an opportunity to upgrade knowledge in the field of functional foods.

I find it positive to conclude the literature review with a summary of what has been achieved on the researched topic. It is noteworthy that the summary conclusions of the review emphasize clinical nutrition, the health benefits of peptides and probiotic lactic acid bacteria, and the place of freeze-drying as a prerequisite for obtaining functional probiotic products based on milk hydrolysates, which contains the actuality of the development. I note this fact because this synthesized summary is the basis of the author's intended research, which is aimed on the one hand at optimizing the enzymatic hydrolysis of proteins (casein and whey) and on the other at the effect of strains of lactic acid bacteria on the fermentation process with a view to obtaining of functional products based on milk hydrolysates. On this basis, a technology has been developed and a recipe composition has been formulated for the production of two functional products.

V. Methodical approach

I think that the methodical approach chosen in the development of the dissertation work is very good. The Materials and Methods section is structured on 10 pages and includes a description of the development stages. In Materials, it is indicated that samples of cow's milk and whey were examined, information is presented on the used raw materials and reagents, proteolytic enzymes, microorganisms, prebiotic components and nutritional environments. The setting of the experimental work is correct and corresponds to the tasks, and the chosen methodology corresponds to the complex character of the research. Classical and modern evaluation and analysis methods were used - physicochemical, biochemical, microbiological, chromatographic, statistical data processing methods. The selected analytical methods are reference and guarantee the reliability of the results.

As a result of the development, a technology for the production of functional products was proposed, thus achieving practical completion of the dissertation work. During the research and conducting the experiments, the doctoral student has absorbed and applied a significant number of research techniques and methods, gained the necessary experience for summarizing literary sources and conducting a scientific experiment, which is a reason to give a high assessment of the achievements in this regard. I consider that the educational element of this ESD “doctor” is fulfilled.

VI. Significance and persuasiveness of the obtained results, interpretations and conclusions

The obtained results occupy a significant part in the structure of the dissertation – they are presented on 95 pages, which is also proof of the significant volume of the experimental work performed. The results and their discussion are presented in 8 sections that correspond to the tasks set. In the separate subsections, a wealth of information is presented from data, illustrated with tables and figures, based on the following: Enzyme activity of two plant and one animal enzymes; Data from quality characteristics of cow's milk and whey; Changes in the degree of hydrolysis at different concentrations of the enzymes used; Biochemical studies of the obtained hydrolysates; Experiments with selected strains of microorganisms; Fermentation of the selected strains; Development of a technology for obtaining bioproducts from hydrolyzed protein and Qualitative characteristics of the obtained products. The attached own photo material also makes a very good impression.

At the beginning of the Results, attention is paid to the origin of the used proteolytic enzymes – papain, bromelain and chymosin, their mechanism of action and their proteolytic activity. In the next section, Associate Professor Loginovska presents information about cow's milk and whey – physicochemical indicators, groups of fatty acids, antioxidant activity, total number of microorganisms, molds and yeasts.

An essential part of the dissertation is the data regarding the changes that occur during hydrolysis depending on the type of proteolytic enzyme (for the 3 enzymes mentioned above), the concentration of the enzymes (3 different concentrations were studied) and their time of action (monitored 4 hydrolysis times). As a result of the experiments, values for the degree of hydrolysis were obtained, the electrophoretic separation of the protein hydrolysates was performed, and data were obtained on the antioxidant capacity of the hydrolysates from cow's milk and whey, on the basis of which the milk and whey hydrolysates that showed the highest antioxidant capacity were selected. Such are the hydrolysates of cow's milk with the enzyme bromelain in concentrations of 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml and 1.0 mg/ml and for 30 min, and of whey with the enzyme papain in concentrations of 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml and 1.0 mg/ml and for 30 min.

The next part concerns the fermentation process – 3 probiotic strains obtained from different sources, in this case sauerkraut, faeces and dairy products (respectively *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013) were selected in order to provide specific characteristics in the final fermented product. The number of viable cells of the three tested probiotic bacteria at different temperature regimes – 32, 37 and 40 °C was reported. Microscopic pictures taken after fermentation of the strains in media with milk and whey hydrolysates with low and high concentrations of substrate enzyme treatment are shown. Two options for cryoprotectants during lyophilization of the developed probiotic products were experimented. Survival of probiotic bacteria after lyophilization was monitored. The antioxidant activity of the examined milk and whey and their hydrolysates, as well as those

after fermentation, was determined. Electrophoretic analyzes of the hydrolysates variants that showed the highest antioxidant activity were carried out.

The last part of the dissertation work is related to the development of new functional products, for which a recipe composition has been formulated and a technological scheme for the production of bioactive products from hydrolyzed protein has been prepared. In order to determine the health benefits, the quality characteristics of the obtained products were carried out in terms of organoleptic, physicochemical, biochemical and microbiological indicators, and at three temperature conditions – room temperature storage, refrigerator temperature (+4 °C) and storage in a freezer (-18 °C) the survival of the microorganisms was followed over a period of 1 year. The obtained data show that the new products based on protein hydrolysates from cow's milk and whey from cow's white brine cheese are bioactive food concentrates.

The obtained results are summarized in tables and presented through figures, which makes them easy to perceive and follow. The results presented in this way are convincing and significant, and their interpretation is credible through the qualitative and quantitative comparison.

As a result of the conducted research, 11 main conclusions were formed, which derive from the obtained results. I find it positive that some of the conclusions are supported by concrete experimental data.

VII. Contributions of the dissertation

The dissertation work of Assistant Professor Kamelia Loginovska contains elements of original scientific and applied development, with which knowledge is improved and upgraded in the current topic aimed at creating functional products with biological properties useful for health. A significant part of the results are related to conducting experiments to develop and obtain a final product, which indicates the completion and realization of a scientific idea. The author of the dissertation made contributions in 3 directions – scientific, scientific-applied and applied, the total number of which is 10, which I generally accept by systematizing them in the following way:

Scientific contributions

A complex study was carried out on the enzymatic hydrolysis of cow's milk and whey of cow's white brine cheese as protein substrates and their transformation into products of high biological value, as a result of which data were obtained regarding the antioxidant capacity of the hydrolysates.

The effect of adding strains of lactic acid bacteria isolated from 3 different sources (*Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013) to hydrolyzed protein substrates on fermentation time and survival of probiotic bacteria was determined.

Electrophoretic analyzes were carried out on the hydrolyzates that showed the highest antioxidant activity and were selected for fermentation with two of the studied strains – *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013.

Scientific and applied contributions

The influence of the technological parameters – type, concentration and time of action of 3 proteolytic enzymes (papain, bromelain and chymosin) on the degree of hydrolysis of protein substrates (milk and whey) was studied, in which it was found that the hydrolysis depends more to a large extent by the concentration of the enzyme used and to a lesser extent – by the time of treatment.

It was found that the hydrolysates of both milk and whey obtained by treatment with papain and bromelain at concentrations of 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml and 1.0 mg/ml exhibited increasing antioxidant properties up to 30 min of enzyme action and slightly lowering to 60 min.

The optimal parameters of sublimation drying and application of cryoprotectants to increase the survival of bacterial cells in fermented milk and whey hydrolysates after freezing and lyophilization were determined, and it was found that the use of cryoprotectants increased the survival of bacterial cells of *Lactiplantibacillus plantarum* NBIMCC 3447 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013 in milk and whey hydrolysates.

A higher cryoprotective effect of Locust Bean rubber as a cryoprotectant was found compared to the combination of saccharose and pectin as a cryoprotectant on bacterial cell survival.

Applied contributions

Experiments were carried out, in which hydrolyzate of cow's milk, obtained by enzymatic treatment with bromelain, was determined as the most favorable variant media for the propagation of strains of lactic acid bacteria (*Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBIMCC 3447, *Lactobacillus gasseri* NBIMCC 2450 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* NBIMCC 1013) with a concentration of 0.1 mg/ml for 30 min and that of whey obtained by enzymatic treatment with papain with a concentration of 0.5 mg/ml for 30 min.

A technological scheme was developed for the experimental production of two bioactive products, including milk or whey hydrolyzate, a probiotic strain that showed the highest survival values during fermentation and after the lyophilization process, prebiotic components, fruits and natural sweeteners.

The recipe compositions of 2 lyophilized products based on hydrolyzate with 10% added fruit are presented, respectively from cow's milk with lyophilized mango and from whey with lyophilized raspberry.

The amount of data obtained makes it possible to use them in future research related to the preparation of functional foods based on protein hydrolysates.

VIII. Publication activity and quality assessment of scientific publications

In connection with the dissertation, 3 scientific publications are presented, which were printed in journals, referenced and indexed in world-famous databases with scientific information (Web of Science). On 1 publication, the author is the only one, in 1 pc. is first, and in 1 pc. – second author. The publications presented are from the period 2021-2024. For the publications, a completed reference for the fulfillment of the minimum national requirements is presented, resp. those of the AA, from which it is evident that they cover the necessary scientometric points laid down in the national requirements for the educational and scientific degree “doctor” – achieved 54.6 points out of the required 30 points.

The publications presented in connection with data from the dissertation work, the results achieved as a result of the experiments carried out and their interpretation, the conclusions formed and the contributions formulated give me reason to consider that the scientific element of the degree “doctor” has also been achieved.

IX. Critical remarks, questions and recommendations to the candidate

I have no significant comments and recommendations for the presented dissertation work, since most of the suggestions for changes made during the preliminary examination of the dissertation project were taken into account by Assistant Professor Loginovska. There are some technical errors in the thesis which refer to the following: Elements of literature review are observed in the Results and Discussion section, for example pp. 65-66 regarding the

description of the enzymes used (papain, bromelain and chymosin), also pp. 94 as well as pp. 100-101 related strains of bacteria. Regarding the list of literary sources, when presenting the authors, there is a different way of spelling them - e.g. in some sources, the initials of the name are not used, and the authors are represented by first and last name (No. 27, 34, 36, 37, 39, 45, 48).

CONCLUSION

The proposed dissertation work is a scientific study in a topical area, contains scientific, scientific-applied and applied contributions. Based on the various research methods applied by the doctoral student, the correctly performed experiments, the generalizations and conclusions made, I believe that the presented dissertation meets the requirements of the LDASRB and the Regulations on the terms and conditions for acquiring scientific degrees and for holding academic positions in AA, which gives me reason to rate it positively.

Based on the above, I propose to award to Assistant Professor Kamelia Kirilova Loginovska the educational and scientific degree “doctor” in the field of higher education 5. Technical sciences, professional area 5.12 Food technologies, scientific specialty “Technology of biologically active substances (incl. enzymes, hormones, proteins)”.

Date: 29.07.2024 г.
Stara Zagora

PREPARED THE REVIEW:
(Prof. Gyurga Mihaylova, DSc)