

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Георги Тодоров Добрев
Университет по хранителни технологии, гр. Пловдив

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“
в област на висше образование **4. Природни науки, математика и информатика,**
професионално направление **4.3. Биологически науки,**
докторска програма по „Биохимия“

Автор: Даниела Георгиева Моллова-Дошкова

Тема: „Изследване влиянието на структурно-функционалните свойства на олигозахариди върху ензимната кинетика на микробиални гликозидхидролази, продуцирани от лактобацили, изолирани от микробиота на кърмачета“

Научен ръководител: проф. д-р Илия Илиев и доц. д-р Тонка Василева, ПУ „Паисий Хилендарски“

1. Общо описание на представените материали

Със заповед № Р33-4366 от 23.07.2019 г. на Ректора на ПУ „Паисий Хилендарски“ съм определен за член на научното жури по процедурата за защита на дисертационен труд на тема **„Изследване влиянието на структурно-функционалните свойства на олигозахариди върху ензимната кинетика на микробиални гликозидхидролази, продуцирани от лактобацили, изолирани от микробиота на кърмачета“** за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“ от Даниела Георгиева Моллова-Дошкова – докторантка в редовна форма на обучение към катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“ с научен ръководител проф. д-р Илия Илиев и доц. д-р Тонка Василева.

Представеният от докторантката комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл. 36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва всички изискуеми документи.

2. Актуалност на тематиката и целесъобразност на поставените цели и задачи

Интересът към микробните съобщества, съжителстващи с човека датира от няколко столетия и започва с откритието на Антони ван Льовенхук в края на 17 век за наличие на микроорганизми в устната кухина на човека. След бурното развитие на омикс-технологиите и свързаната с тях биоинформатика става възможно задълбоченото изучаване на човешкия микробиом и за изясняване на неговата роля за здравето на човека.

През 2008 г. водещи институции в САЩ стартират проекта „Човешки микробиом”, който има за цел да характеризира микробиота на 300 здрави индивида в различни части на човешкото тяло – горни дихателни пътища, устна кухина, кожа, стомашно-чревен тракт и урогенитални пътища. Вторият етап на проекта е насочен към изясняване на механизмите, по които микробиомът оказва влияние върху здравето на човека.

През последните 10-15 години широко приложение като хранителни добавки намират пробиотиците, пребиотиците и синбиотиците, с помощта на които се цели да се въздейства върху състава на гастроинтестиналната микробиота. Много автори приемат, че ключов момент при разясняване на ролята на гастроинтестиналния микробиом върху здравето на човека е изследване на равновесието между симбиотично живеещите микроорганизми. Според тях състоянието на „дисбиоза” или нарушен състав на микробиота е основна причина за голям брой заболявания, в т.ч. диабет тип 2, затлъстяване, Алцхаймер и други заболявания на съвременното. Последни проучвания показват, че трябва да се търсят специфични пробиотични микроорганизми за различните здравни проблеми. По този начин комплексното изучаване на човешкия микробиом се разглежда като стъпка към т.нар. персонализирана медицина.

Изследванията в рецензирания труд са насочени към изучаване на микробиотата на майчината кърма и устната кухина на новородени както и изследване на ензимните активности на изолираните щамове, с участието на които се хидролизират олигозахаридите от майчината кърма и гликаните, изграждащи муцините.

Хипотезата, която е в основата на дисертационния труд е, че микроорганизмите притежаващи ензимни активности, с които могат да ферментират пребиотични олигозахариди биха притежавали по-ясно изразен пробиотичен ефект. Докторантката обосновава приема, че метаболизирането на тези специфични олигозахариди от определени микроорганизми им дава преимущество, което им позволява да се развият и колонизират в гастроинтестиналния тракт. Става ясно, че това е механизмът, по който съставът на кърмата оказва влияние върху формирането на микробиота на гастроинтестиналния тракт на новородените. Доказването на тази хипотеза ще позволи чрез бърз скрининг на ензимни активности да се съди за пробиотичен капацитет на изследваните микробни щамове.

За да докаже хипотезата, докторантката формулира 7 научноизследователски задачи, които съответстват на целта. Научноизследователските задачи са насочени към изолиране и идентификация на бактерии от майчина кърма и слюнка на новородени и изследване на основните ензимни активности отговорни за хидролиза на олигозахариди от майчината кърма и други пребиотични олигозахариди. Темата на дисертационния труд е актуална, а научноизследователските задачи са адекватни и целесъобразни.

3. Познаване на проблема

В раздел литературен обзор от дисертационния труд, докторантката дава добре подредена и изчерпателна съвременна информация за микробния състав, функции и характеристики на човешкия микробиом. Основно внимание е отделено на микробиотата на гастроинтестиналния тракт и ролята ѝ за човешкото здраве. От посочената информация става ясно, че според някои автори формирането на микробиома на гастроинтестиналния тракт започва още преди раждането на плода. Съществено влияние върху състава на микробиота оказва самият родилен процес както и начина на хранене на новороденото. Кърмата оказва огромно влияние върху колонизирането на специфични микроорганизми в гастроинтестиналния тракт. Съдържащите се в нея сложни олигозахариди притежават изразен пребиотичен ефект и служат като хранителни вещества за развитие на желани микроорганизми. Част от микроорганизмите, населяващи стомашно-чревния тракт на новородените притежават набор от специфични ензими като фукозидази, които подпомагат метаболизма на олигозахаридите на кърмата. Подобен силно изразен пребиотичен ефект оказват и галактоолигозахаридите. Добавянето им към диетата и храната води до увеличение на фекалните бифидни бактерии и лактобацили при кърмачета и възрастни. Тази информация аргументира селектирането на щамове с ензимни активност, които да им позволява лесно и бързо да метаболизират олигозахаридите от майчината кърма, което гарантира по-силно изразен пробиотичен капацитет. Доказано е, че видовете от род *Lactobacillus* са част от микробиома в стомашно-чревния тракт и други мукозни повърхности при хората. Този род включва щамове от различни видове с голям потенциал за пробиотични свойства. За да проявят пробиотичен ефект микроорганизмите трябва да могат да оцеляват в специфична екологична ниша и да бъдат метаболитно активни на целевите си места, а именно повърхности на лигавицата на гостоприемника. Един от факторите, осигуряващ оцеляване и метаболитна активност е възможността за метаболизирането на произведени от лигавицата гликани. Способността за метаболизиране на олигозахаридите на човешкото мляко, гликозаминогликани и гликанови остатъци на гликопротеини и гликолипиди, открити на повърхността на лигавицата, дава конкурентно предимство на лактобацилите.

В хода на проучването на научната литература става ясно, че способността на някои микроорганизми да усвояват олигозахаридите в майчиното мляко и/или сложните гликани изграждащи муцините им дава преимущество за тяхната адхезия и колонизация в гастроинтестиналния тракт. Основните ензими участващи в метаболитното разграждане на тези гликани са β -галактозидаза, фукозидаза, сиалидаза, лакто-N-фосфорилаза и β -хексозаминидаза. Това дава основание на докторантката да формулира хипотеза, че щамове притежаващи ензими, с които могат да метаболизират посочените гликани биха имали преимущество при тяхното колонизиране.

4. Методика на изследването

При разработването на дисертационния труд, докторантката е използвала голям брой микробиологични, химични, ензимни и инструментални методи за анализ. Трябва да се отбележи овладяването на съвременни молекулярно-генетични методи като секвенцията на 16s rРНК и свързаните биоинформационни софтуерни продукти, без които е невъзможно провеждането на този тип изследвания върху човешкия микробиом. Овладяла е методи за определяне на ензимна активност. Докторантката е придобила нужните практически опит и знания за провеждане на научни изследвания на съвременно ниво. Използваните методи и постановката на експериментите съответстват на поставените цел и задачи в дисертационния труд.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 156 страници. Съдържанието е правилно структурирано в следните раздели: Въведение (2 стр.), Литературен обзор (34 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (14 стр.), Резултати и дискусия (70 стр.), Обобщение (5 стр.), Изводи (1 стр.), Приноси (1 стр.), Литература (19 стр.).

Формулираната цел е ясна и изпълнима. Изследванията са насочени към изолиране и идентификация на бактерии от майчина кърма и слюнка на новородени и проучване на ензимните активности на изолираните шамове отговорни за метаболизиране на олигозахаридите в майчиното мляко, гликани изграждащи муцините, галактоолигозахаридите и други гликани с пребиотични свойства.

Поставени са 7 конкретни задачи. Задача номер 6 е неясно формулирана, но в хода на изложението се изяснява идеята на докторантката. Извършена е целенасочена експериментална работа, която е отразена коректно, а опитните резултати са онагледени с 24 таблици и 72 фигури. Получените резултати са аргументирано дискутирани и критично сравнени с резултатите от достъпната литература.

Получените опитни резултати са представени в три глави.

Глава I е озаглавена „Скрининг на шамове млечнокисели бактерии от кърма и слюнка на новородени”. Изолирани са 174 чисти култури - 124 от кърма и 50 от слюнка на новородени. Проведен е скрининг спрямо усвояване на различни въглеродни източници – глюкоза, лактоза и захароза. Установено е, че всички изолати усвояват глюкоза. Приблизително 75% от изолатите от кърма усвояват лактоза в концентрации от 2 и 5 %, а 50% от изолатите усвояват захароза в концентрации от 2 и 5 %. Изолатите от слюнка се развиват добре на почти всички изследвани среди. За по-нататъшно идентифициране чрез секвениране на 16S rРНК са подбрани 28 изолата от кърма и 28 изолата от слюнка, които са показали растеж на MRS среда и на mMRS с 2% и 5% лактоза.

Приблизително 50 % от изолатите от майчина кърма са идентифицирани като представители на вид *Lactobacillus fermentum*, 30% на *Enterococcus faecalis*, 4% на *Bifidobacterium animalis*, 4% на *Enterococcus durans*, 4% на *Enterococcus faecium*, 4% на

Enterococcus lactis и 4% на *Lactobacillus gasseri*. Около 54% от изолатите от слюнка на новородени са идентифицирани като представители на вид *Lactobacillus fermentum*, 21% като *Enterococcus faecalis* и 4% като *Lactobacillus gastricus*.

От получените резултати се потвърждава информацията от литературния обзор, че голяма част от микроорганизмите от микробиота на човека образуват некултивируеми форми. От изследваните 56 изолата са идентифицирани само 3 вида лактобацили, които са огромна група съставена от около 180 вида. При последните проучвания на микробиотата на стомашно-чревния тракт са идентифицирани повече от 1000 вида и над 7000 щама бактерии, като по-голямата част от тях (80%) са некултивируеми.

В глава II "Изследване на ензимния профил на подобрените щамове" са обобщени изследванията върху ензимния профил на изследваните щамове. Докторантката установява клетъчносвързана β -галактозидаза при всички изследвани лактобацили и при *Enterococcus lactis* St 21 при култивиране на среда с 2 % лактоза. При същите условия останалите щамове ентерококи проявяват β -галактозидазна активност само на 9 и 12 час от култивирането, а на 24 час β -галактозидазна активност липсва. Всички изследвани лактобацили и *Enterococcus lactis* St 21 синтезират α -галактозидазна активност на среда с 2 % глюкоза, а на среда с 2 % лактоза α -галактозидазна активност синтезират само лактобацилите *Lactobacillus fermentum* St 5, St 6, St 24 и St 26.

Най-силно изразен индуциращ ефект върху β -галактозидазна активност продуцирана от почиващи клетки от изследваните лактобацили оказва лактулозата. При изследване на индуциращия ефект на различни захари (фукоза, муцин, олигозахариди от майчина кърма и фукозиллактоза) върху α -фукозидазаната и β -галактозидазна активност на изолираните лактобацили е установено, че α -фукозидазата се индуцира най силно от фукоза и муцин, а β -галактозидазата от 2% муцин и олигозахариди от майчината кърма. Присъствието на жлъчни соли значително повишава фукозидазната активност, а при същите условия β -галактозидазната активност намалява.

Докторантката установява, че лактозата значително индуцира β -галактозидазата, но действа като катаболитен репресор на биосинтеза на α -фукозидаза.

Глава III „Сравнителен анализ на пробиотичния потенциал на изолираните щамове *L. fermentum* St5 и *L. fermentum* St22”. Анализът започва с установяване на гена за α -фукозидаза *afcA* в изследваните лактобацили, който е типичен за бактерии от род *Bifidobacterium*. Установена е 100% идентичност на *afcA* при *Lactobacillus fermentum* St 22 с типичния ген на *afcA* от *Bifidobacterium bifidum*. До момента не съществува информация за гена кодиращ фукозидаза при щамове *Lactobacillus fermentum*.

И от двата щама е изолирана β -галактозидаза с молекулна маса 116 kDa.

Щамовете *Lactobacillus fermentum* St 5 и *Lactobacillus fermentum* St 22 показват способност да адхезират върху клетъчна линия HT 29, като при щам *Lactobacillus fermentum* St 5 е установена адхезия и спрямо муцин-продуциращата клетъчна линия LS 180.

За основни приноси на дисертационния труд приемам:

1. За първи път е доказано наличието на *afcA* гена, кодиращ 1,2- α -L-фукозидаза (Е.С. 3.2.1.63) и е отчетена фукозидазна ензимна активност при щамове *Lactobacillus fermentum*, изолирани от кърма.

2. За първи път е доказан индуциращият ефект на L-фукоза, муцин, 2-фукозил-лактоза и олигозахариди от майчина кърма върху синтеза на α -L-фукозидаза при щамове *Lactobacillus fermentum*, изолирани от майчина кърма.

3. Установена е щамовата специфичност по отношение на индукцията на ензимите β -галактозидаза, α -галактозидаза и β -глюкозидаза при култивиране на *Lactobacillus fermentum*, изолирани от майчина кърма върху хранителни среди в присъствие на различни концентрации на лактоза, лактулоза, галактоолигозахариди и олигозахариди от майчина кърма.

7. Преценка на публикациите по дисертационния труд

Част от резултатите от дисертационния труд са публикувани в 2 научни статии на английски език. Едната публикация е в списание *Engeneering in Life Science* (IF 1.936), а другата в списание *Journal of Bioscience and Biotechnology*. На една от публикациите докторантката е първи автор. С посочените 2 публикации докторантката покрива минималните критерии на Биологически факултет към ПУ „Паисий Хилендарски” в направление 4.3 Биологически науки, докторска програма по „Биохимия”. Докторантката е участвала в три национални научни конференции с международно участие, където е представила 3 постера.

8. Автореферат

Авторефератът е оформен според изискванията на правилниците на ПУ „Паисий Хилендарски” и коректно отразява структурата и съдържанието на дисертационния труд.

9. Критични забележки и препоръки

Критичните препоръки имат за цел да подобрят бъдещата работа на докторанта, а поставените въпроси да дадат възможност за провеждане на дискусия, в която дисертанката да покаже своята компетентност и да открие ключови резултати от дисертационния труд.

Като критична забележка трябва да отбележа, че голяма част от резултатите са представени едновременно във фигури и таблици, което затруднява техния анализ. Има някои технически грешки, които внасят неяснота.

Например в глава II, т. 1 „Влияние на 2% глюкоза и 2% лактоза върху активността на ензимите β -галактозидаза, α -глюкозидаза и β -глюкозидаза” липсват резултати за β -галактозидазна активност при 2% глюкоза. В същата точка се появяват резултати за α -галактозидазна активност без това да е описано в заглавието, а липсват данни за α -глюкозидазна и β -глюкозидазна активност (79-85 стр.).

Обобщението след раздела резултати и дискусия е добре написано, но прилича на обобщение на литературния обзор, защото в него никъде не се коментират и обобщават получените собствени резултати.

Имам следните въпроси към докторантката:

1. Имате ли някаква информация за вероятния механизъм за индукция на α -фукозидазата от фукоза, която се явява продукт на ензимната реакция?
2. Съществуват 2 типа пробиотични продукти на пазара. Единият тип препарати съдържат само един пробиотичен шам, а другият тип съдържат повече от един микробен шам. От гледна точка на получените от Вас резултати, свързани с щамовата специфичност на синтезираните ензими и процеса на индукция, кой от двата типа пробиотици е по-подходящ?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дисертационният труд съдържа научни, научно-приложни и приложни резултати, които представляват оригинален принос в науката и отговаря на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане и съответния правилник на ПУ „Паисий Хилендарски“. Представените материали и дисертационни резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Биологическия факултет, приети във връзка с правилника на ПУ за приложение на ЗРАСРБ.

Дисертационният труд показва, че докторантката притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научна специалност „**Биохимия**“ като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено от рецензираните по-горе дисертационен труд, автореферат, постигнати резултати и приноси и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „**Доктор**“ на **Даниела Георгиева Моллова-Дошкова** в област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма по „Биохимия“.**

12.09.2019 г.

Рецензент:

доц. д-р Георги Добрев