

СТАНОВИЩЕ

от доц.д-р Соня Костадинова Трифонова

катедра „Биохимия и микробиология“

Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

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 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 микробиотата на кърмачета“

Научни ръководители: проф.д-р Илия Илиев и доц.д-р Тонка Василева – Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“

1. Общо представяне на процедурата и докторанта

Със заповед № Р33-4366 от 23.07.2019 г. на Ректора на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ съм определена за член на научното жури за осигуряване на процедура 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 микробиотата на кърмачета“ за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, докторска програма Биохимия.

Автор на дисертационния труд е Даниела Георгиева Моллова-Дошкова – редовен докторант в катедра „Биохимия и микробиология“ с научни ръководители проф.д-р Илия Илиев и доц.д-р Тонка Василева от ПУ „Паисий Хилендарски“.

Представеният от Даниела Моллова-Дошкова комплект материали на хартиен носител е в съответствие с Чл.36 (1) от Правилника за развитие на академичния състав на ПУ и включва следните документи:

1. Молба по образец до Ректора за откриване на процедура;
2. Автобиография по европейски формат;

3. Протокол от предварителното обсъждане в катедрата;
4. Автореферат;
5. Декларация за оригиналност и достоверност на приложените документи;
6. Справка за спазване на специфичните изисквания на Биологическия факултет;
7. Списък на публикациите;
8. Дисертационен труд;
9. Копия на публикациите по темата на дисертацията;

Даниела Моллова е възпитаник на ПУ „П. Хилендарски“; завършила е ОКС „бакалавър“, специалност „Биология“ през 2003 г. и ОКС „магистър“, специалност „Антропология“ през 2005 г. Работи като биолог в катедра „Анатомия и физиология на човека“ от 2006 г., а през 2017 г., по собствено желание, съгласувано с ръководителите на катедрите е преместена на длъжност „биолог“ в катедра „Биохимия и микробиология“. От 01.03.2016 г. е редовен докторант в катедра „Биохимия и микробиология“, докторска програма „Биохимия“.

2. Актуалност на тематиката

Нормалната човешка микробиота (микрофлора) в т.ч. гастроинтестинална фокусира вниманието на науката през последните години, заради значението ѝ за здравословното състояние на човек. Нормалната микробиота стимулира развитието на имунната система, предотвратява колонизирането на кожата и лигавиците с патогенни бактерии, участва в разграждането на въглехидрати, участва в обезвреждането на токсини, синтезира витамини от група В и витамин К, но също така може да повлияе редица заболявания.

Микробната колонизация на стомашно-чревния тракт на новороденото започва по време на раждането с майчината микробиота. Какви микроорганизми ще колонизират детския организъм зависи от редица фактори – начин на раждане; начин на хранене (кърмене или „изкуствено“ хранене); контакт с микроорганизми (от страна на майката, семейството, домашни любимци, болничен престой и др.); употреба на антибиотици; заболяемост и др. Съставът на чревната микробиота има ключово значение за постнаталното развитие на имунната система.

Майчината кърма предоставя всички необходими хранителни вещества за нормалния растеж и развитие и се смята за най-подходящата храна за новороденото. Естествено хранените кърмачета са с намалена честота на алергични или атопични заболявания, както и на инфекции в сравнение с

„изкуствено“ хранените бебета. Олигозахаридите са част от биологично-активните компоненти в майчината кърма и имат редица полезни ефекти върху здравословното състояние на новороденото. Способността на видовете *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* от нормалната микробиота да разграждат олигозахаридите в майчината кърма и ги използват като въглероден и енергиен източник зависи от ензимния им профил.

В този аспект, тематиката на дисертационния труд е актуална с конкретно научно-приложно значение.

3. Познание на проблема

Литературният обзор, написан на 34 страници, показва много добра теоретична осведоменост по темата на дисертацията. Систематизирана е информация за нормалната микробиота на гастроинтестиналния тракт при човека, и по-детайлно при новороденото, на колонизирането на тракта, което е силно зависимо от начина на раждане, храненето и условията на живот, както и на източниците на микроорганизми за колонизирането му. Обърнато е внимание на свойствата на олигозахаридите в човешката кърма. Във връзка с темата на дисертацията, обзорът съдържа и информация за гликозидазните ензими, продуцирани в гастроинтестиналния тракт на човек и за ролята на микроорганизмите за разграждането на гликани.

За оформянето на обзора са използвани 288 съвременни литературни източници на латиница; над 74% от литературните източници са публикувани след 2000 г.

4. Методика на изследването

При разработване на дисертационния труд, докторантката е усвоила и приложила голям брой съвременни биохимични, микробиологични и молекулярно-биологични методи, като изолиране и анализ на геномна ДНК, PCR амплификация на гени, секвениране на получените PCR продукти, определяне на ензимни активности, HPLC анализ на олигозахариди, биоинформатичен анализ и др.. Методите са описани коректно и изчерпателно, което дава възможност да бъдат възпроизведени. Адекватно използваните методи показват, че докторантката Даниела Моллова е придобила необходимия методичен опит за провеждане на научен експеримент.

5. Характеристика и оценка на дисертационния труд и приносите

Дисертационният труд е написан на 154 страници. Съдържанието е правилно структурирано в раздели, между които са спазени оптимални съотношения:

Въведение – 2 стр., Литературен обзор - 34 стр., Цел и задачи – 1 стр., Материали и методи – 14 стр., Резултати и обсъждане – 69 стр., Обобщение – 5 стр., Изводи – 1 стр., Приноси – 1 стр., Литература – 18 стр..

Целта и задачите са правилно формулирани. За реализацията им докторантката е извършила сериозна експериментална работа, отразена в получените резултати, илюстрирани с 24 таблици и 72 фигури. Резултати са аргументирано дискутирани.

Представените 7 обобщени изводи правилно отразяват получените резултати.

Дисертационният труд съчетава иновативно изследване върху микробиотата на кърмачета с тематиката, касаеща бактериалните гликозидхидролази, по която в секция Биохимия се работи в продължение на години и има значими резултати.

Резултатите от дисертационния труд, които могат да бъдат систематизирани в няколко основни раздела имат научно и научно-приложно значение.

Първият раздел включва работата по изолиране на млечнокисели бактерии от слюнка на новородени и майчина кърма и определяне на способността им да усвояват различни въглехидрати. Направена е молекулярно-биологична идентификация на щамовете, която е подкрепена и от биохимична характеристика (API 20 CHL анализ) за 8 от изолатите.

Във втория раздел е определена метаболитната активност на част от щамовете (извадка от всички изолати). Проследен е растежа на среда с лактоза и глюкоза, както и динамиката на α - и β -галактозидазната активности. Проведени са опити за доказване на пробиотичния потенциал на 8 от изолатите. Определена е толерантността към ниски и високи стойности на рН и устойчивостта на изолатите към жлъчни соли. Щамовете са анализирани за растеж на среди обогатени с галактоолигозахариди, лактулоза и олигозахариди от кърма и са изследвани ензимите от въглехидратния обмен.

В третия раздел работата е фокусирана върху два от новоизолираните щамове *L. fermentum*, при които докторантката идентифицира гена *afc*, кодиращ фукозидаза. При тези щамове е определена активността на ензимите α -фукозидаза и β -галактозидаза на различни среди. Ензимът β -галактозидаза е частично пречистен чрез преципитация с амониев сулфат и лиофилизация. Проведени са опити за определяне на антибактериалната активност на изолатите спрямо *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S. aureus*, както и способността им за адхезия към две клетъчни линии.

В раздела „Обобщение“ са обсъдени получените резултати в светлината на световните достижения в науката по работената тематика.

Изводите са логично следствие от поставените задачи и отразяват вярно получените резултати. Приемам формулираните приноси.

Към докторантката имам следните въпроси и забележки:

- Какви са съображенията Ви за да формулирате задача № 7 и да включите в изследването и щамове с доказан пробиотичен ефект, като *L.plantarum* 30?
- Правихте ли опити за идентифициране на гена, кодиращ β -галактозидаза при изолираните щамове?
- Считам, че би следвало средите да бъдат описани по един и същ стандартизиран начин; в някои среди част от компонентите са представени в g/l, а друга част в %;
- Таблицы 8 и 9 в раздел „Резултати и обсъждане“ биха могли да се представят в графичен вид и да се систематизират резултатите;
- Част от резултатите, представени във фигурите (напр. фиг. 34 и фиг. 35) биха могли да се обединят и да бъдат по-информативни;
- Считам, че би следвало да се използва термина „микроорганизми“, а не „микроби“;

Държа да отбележа, че допуснатите технически грешки и неточности не омаловажават постигнатите резултати.

6. Преценка на публикациите и личния принос на докторанта

Докторантката е представила 2 статии във връзка с дисертацията. Статиите са на английски език; едната е публикувана в списание с импакт фактор – *Engeneering in Life Science*, а втората статия – в *Journal of BioScience and Biotechnology*. В една от публикациите Даниела Моллова е първи автор.

Лично познавам докторантката – Даниела Моллова, като много работоспособен, прецизен, изпълнителен млад изследовател и колега и убедено мога да заявя, че дисертационният труд е резултат от работата ѝ, под вещото ръководство на научните ръководители.

7. Автореферат

Авторефератът е направен според изискванията и вярно отразява основните резултати на дисертационния труд.

8. Препоръки за бъдещо използване на дисертационните приноси и резултати

Препоръчвам да продължи работата по определяне на микробиотата на новородени, с включване на по-голям брой индивиди на различна възраст и охарактеризиране на пробиотичните свойства на щамовете.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Дисертационният труд показва, че **Даниела Моллова-Дошкова притежава теоретични знания и професионални умения по научна специалност Биохимия**. В процеса на обучение докторантката е усвоила широк набор от умения и методи, способности самостоятелно да провежда експерименти, правилно да представя и интерпретира получените резултати.

Поради гореизложеното, убедено давам своята **положителна оценка** за проведеното изследване, представено в 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 **Биохимия**.

16.09.2019 г.

Изготвил становището:

Доц.д-р Соня Костадинова