

## РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд на тема: *"Разработване на имуноанализи на базата на магнитни наночастици за определяне концентрацията на фосфороорганични пестициди в мляко"* с автор инж. МАРИНА ЯНЕВА ЯНЕВА, представена за придобиване на образователна и научна степен "Доктор" по научна специалност „Технология на биологично активните вещества /вкл. ензими, хормони, белтъци/“, шифър 02.11.11. професионално направление 5.11. Биотехнологии, област от висшето образование 5. Технически науки.

**ИЗГОТВИЛ РЕЦЕНЗИЯ:** проф. д-р Катя Иванова Вълкова-Йоргова – Ръководител на катедрата по Технология на месото и рибата към УХТ- гр. Пловдив

Съгласно заповед № УД-305 от 24.11.2017 г. на Ректора на Университет „Проф. д-р Асен Златаров“ – гр. Бургас съм назначена за външен рецензент във връзка с предстоящата защита на посочения преди това дисертационен труд. Във връзка с това ми бяха предоставени материалите (дисертационната работа, автореферат, автобиография и 3 научни публикации) представени от Марина Янева Янева.

### **1. Актуалност на разработвания в дисертационния труд проблем в научно и научно-приложно отношение**

Тенденцията за производство на здравословни храни навлиза все по-масово и по-широко в изследователската дейност свързана с разработването и внедряването на нови методи за качествен контрол, както по отношение на суровините, така и по отношение на готовите продукти. Един от най-важните приоритети в хранителната промишленост е разработването на иновационни методи за идентифициране и количествено определяне наличието на химични вещества, които могат да доведат до риск за здравето на потребителите.

Пестицидите са химични контаминанти с висок риск за човешкото здраве, което налага осъществяването на строг контрол и мониторинг върху тяхното количество в храните. Проучването на нови алтернативни методи за определяне концентрацията на различните по химичен състав пестициди е от изключителна важност, както за теорията, така и за практиката.

В дисертационния труд е разработен хетерогенен имунофлуоресцентен анализ като са използвани магнитни наночастици за индивидуално

и едновременно определяне на пестицидите дихлорвос и параоксон в мляко.

*В този контекст темата на настоящата дисертация е актуална, значима за науката и практиката и е дисертабилна.*

## **2. Степен на познаване на състоянието на проблема и на литературния материал**

В структурно отношение дисертационния труд е разработен съобразно изискванията, на които съответства като обем и самостоятелно обособени раздели. Общия обем обхваща 168 страници и съдържа разделите: въведение, литературен обзор, цел и задачи, експериментална част, резултати и обсъждане, изводи, литература и списък с научните публикации. В дисертацията има ясно и добре оформени 12 таблици и 41 фигури, които правилно и точно отразяват експерименталните данни.

От направения литературен преглед може да се направи заключението, че инж. Янева показва задълбочено и всестранно познаване на проблема. В литературния обзор са разгледани различните методи за откриване на пестициди като високоефективна течна хроматография, газова хроматография, имуноензимни и имунофлуоресцентни методи. Поставен е акцент върху имуноензимните и имунофлуоресцентните методи за анализ на остатъци от пестициди и се подчертава, че хетерогенния флуоресцентен имуноанализ осигурява по-стабилни тестове, благодарение на имобилизираното антитяло върху твърд носител. В тази връзка се обосновава целесъобразността от използването на наночастици като носител за имобилизация на антитела, както и прилагането на широко специфично антитяло за разработване на мулти-имуноанализи.

Въз основа на представените литературни данни като логично следствие е оформено заключение, че данните относно имунофлуоресцентните анализи, базирани на магнитни наночастици за индивидуално и едновременно определяне на пестициди, са твърде малко и не са прилагани за мляко и млечни продукти. Изхождайки от изведените от литературния обзор констатации, дисертантката ясно и коректно е формулирала целта и задачите на работата.

## **3. Съответствие на избраната методика на изследване с поставената цел и задачи на дисертационния труд**

Избраната методика на изследване е в съответствие с поставената цел и задачи на дисертационния труд. Това е видно от целесъобразния подход в раздел III "Експериментална част", който се отличава с прилагането на комбинация от съвременни инструментални методи като спектрофотометрични, афинитетнохроматографски, имуноензимни и

имунофлуоресцентни и др. Проведени са опити за получаване и пречистване на конюгати дихлорвос-сBSA и параоксон-BSA, DDVP-сOVA и параоксон-OVA. Експерименталните опити с животни за получаване на поликлонални антители срещу DDVP и параоксон са проведени с ДПЖ – овце и са осъществени в съответствие с Директива на ЕС 2010/63.

Въз основа на проведените широкомащабни изследвания авторката оценява чувствителността на разработените имунофлуоресцентен и имуноензимен анализи и установява оптималните условия за определяне количеството на параоксон и дихлорвос в мляко.

#### **4. Характеристика на естеството и оценка на достоверността на материала**

В раздел “Резултати и обсъждане” изследванията са проведени в три основни направления. Първото направление е свързано с получаване и охарактеризиране на поликлонални антители срещу дихлорвос и параоксон. Изучени са условията, при които се получават поликлоналните антители срещу DDVP и параоксон. С помощта на инфрачервена спектроскопия и спектрофотометрични изследвания е доказано образуването на конюгатите дихлорвос-сBSA и параоксон-BSA. Получените резултати убедително потвърждават формирането на конюгата дихлорвос-катионизиран албумин, тъй като са констатирани характерните ивици за катионизирания албумин при  $1235-1139\text{ cm}^{-1}$  и на дихлорвос при  $1062 - 946\text{ cm}^{-1}$ , дължащи се на връзки  $\text{P}=\text{O}$  и  $\text{P}-\text{O}-\text{C}$ . За конюгата параоксон-BSA е констатирано, че инфрачервения спектър показва леко изместване на  $(\text{PO}-\text{C}_2\text{H}_5)$  ивиците при  $1073-900\text{ cm}^{-1}$ , което вероятно се дължи на взаимодействието между параоксона и BSA.

По второто направление е направено детайлно проучване на необходимите условия за индиректна конкурентна ELISA за определяне концентрацията на дихлорвос и параоксон в краве мляко на основата на получените поликлонални антители. Експериментално са установени аналитичните характеристики: граница на откриване  $0.008\text{ ng/L}$  за параоксон и  $0.006\text{ ng/L}$  за дихлорвос и линеен интервал от  $0.01$  до  $5\text{ ng/L}$  за двата пестицида. В динамика е проследено влиянието на химичния състав и физико-химичните характеристики на изследваните проби мляко върху имуноанализа. Изяснено е, че влияние върху имунологичния анализ оказва по-високото съдържание на мазнини в млякото (над  $4,5\%$ ). Получените експериментални данни потвърждават потенциала на имуноанализа за количествено определяне на остатъци от пестицидите дихлорвос и параоксон в голям брой проби от мляко.

В този раздел добре е изяснен и охарактеризиран конкретния механизъм на нов имунофлуоресцентен метод за откриване на остатъци от

пестициди в мляко, на базата на магнитни наночастици. Представени са необходимия брой експериментални резултати, които дават възможност за реално обсъждане и коментар на оптималните условия за провеждане на разработения анализ и да се направят съответните заключения. Установено е, че вида и химичния състав на изследваните проби мляко в най-голяма степен оказват влияние върху характеристиките на получените имунофлуоресцентни анализи, като границата на откриване е 2 пъти по-висока при пробите от овче мляко.

## **5. Приноси на дисертационния труд**

Считам, че с получените резултати и със своите изводи докторантката прави съществени оригинални приноси с твърде важно значение, както за теорията, така и за практиката. Проведените изследвания от инж. М. Янева обогатяват научните знания за приложението на нови имуноанализи за определяне концентрацията на пестициди в мляко. Разкрити и научно-обосновани са възможностите за приложение на нови поликлонални антитела срещу фосфоорганичните пестициди параоксон и дихлорвос.

Вторият важен аргумент, по който настоящата дисертация представлява значим принос в науката е факта, че приложението на разработения мулти-имунофлуоресцентен метод представлява полезен и удобен инструмент за подобряване на контрола и мониторинга на остатъците от пестициди в млечни храни, което би допринесло за производството на по-безопасни млечни продукти.

Предложени са оптималните параметри и условия за провеждане на нов хетерогенен имунофлуоресцентен анализ базиран на магнитни наночастици за индивидуално и едновременно определяне на дихлорвос и параоксон в мляко.

## **6. Преценка на публикациите по дисертационния труд**

Резултатите от проведените детайлни и задълбочени изследвания са публикувани в 2 статии в реномирани международни списания с общ импакт фактор 2,542 и една е изпратена за публикуване. Инж. М. Янева е водещ автор и на трите публикации, което показва активното ѝ лично участие при разработване на дисертационния труд. Представени са и два доклада от участие в научни конференции с международно участие.

## **7. Използване на резултатите от дисертационния труд в научната и социална практика**

Характерът на дисертационната разработка и приносите от нея могат да се считат за приложно-теоретични. Разработените имунофлуоресцентен

и имуноензимен анализ за количествено определяне на фосфороорганични пестициди в мляко, представляват незаменим инструмент в развитието на широкомащабни профилиращи методи за изследване наличието и източниците на химични контаминанти и подобряване качеството на хранителните продукти. Това би спомогнало съдържанието на тези вещества в храните да се ограничи и минимизира до определени норми, безопасни за здравето на хората.

Създадените нови имуноензимен и хетерогенен имуофлуоресцентен анализ, базиран на магнитни наночастици за индивидуално и едновременно определяне на дихлорвос и параоксон в мляко може да служат като база за установяване и на други токсични вещества, както и да бъдат адаптирани за приложение и в други храни.

## **8. Образователна дейност на докторанта**

Докторантката притежава професионални умения в следните области: Дейност на контролните лаборатории, Управление на качеството на храни и напитки, Технология на храните, Безопасност на храните, Генно модифицирани храни, Анализ и съхранение на храни, Химичен анализ и контрол на храните, Микробиологичен анализ и контрол на храни, Добавки в храните, Броматология.

## **9. Оценка на автореферата**

Представеният автореферат коректно и обективно е оформен само въз основа на материалите и експерименталните данни изложени в дисертационния труд и можем да го считаме като реално копие на същия в съкратен вид. Представени са основните цели и задачи, методи и изводи, показващи приносите на инж. М. Янева в проведеното изследване.

## **10. Мнения, препоръки и бележки**

Дисертацията представена от инж. М. Янева напълно отговаря по обем и качество на критериите за придобиване на ОНС „доктор“ от ЗРАСРБ и правилника за неговото прилагане.

Имам следната препоръка:

- Да се проучат възможностите за адаптиране и модифициране на разработените имуноанализи за изследване на съдържанието на пестициди и в други храни.

## **11. Заключение с ясна положителна или отрицателна оценка на дисертационния труд.**

Като цяло дисертацията е посветена на значими и актуални научно-приложни въпроси. Експерименталната работа е добре организирана и осъществена чрез подходящ научен подход, като са използвани

съвременни методи на изследване с умение аналитично да се разглеждат, обсъждат и обобщават получените данни. На тази база са получени резултати с оригинален и приносен характер. Представената дисертация отговаря на всички изисквания на ЗРАСРБ, Правилника за прилагането му и Правилника на УХТ за прилагане на ЗРАСРБ.

Въз основа на направения анализ давам положителна оценка на разработения дисертационен труд и считам за основателно да предложа инж. Марина Янева Янева да придобие образователната и научна степен “Доктор” по научна специалност „Технология на биологично активните вещества /вкл. ензими, хормони, белтъци/“, шифър 02.11.11. професионално направление 5.11. Биотехнологии, област от висшето образование 5. Технически науки.

Дата: 22.01.2018 г.

Рецензент.

/проф. д-р К. Вълкова-Йоргова/