

РЕЦЕНЗИЯ

от

проф. д-р Румяна Петрова Статева
Институт по инженерна химия - БАН

На: Дисертационен труд на тема: „Значението на транс-резвератрола при технологията на розови вина от мавруд“, представен от маг. инж. Диян Владимиров Точев за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ по научна специалност 5.10. Химични технологии (Процеси и апарати в химичната и биохимичната технология).

Съгласно Заповед No НД-20-44/06.04.2016 г. на Ректора на ХТМУ бях определена за член на научно жури, а в последствие избрана и за рецензент на дисертационния труд на маг. инж. Точев. След направения от мен преглед на представените от дисертанта документи, установих, че съответстват напълно на изискванията, изложени в Правилник за развитие на академичния състав на ХТМУ, при спазване на общите условия и ред, уредени със Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ) и Правилника за прилагане (ПП) на ЗРАСРБ.

Кратки биографични данни

Инж. магистър Диян Точев е роден през 1981 г. в гр. Хасково. През 2004 г. получава образователно-квалификационната степен бакалавър, а през 2007 г. - магистър, специалност Биотехнология от ХТМУ. В периода 2004-2008 гг. е работил като технолог, началник смяна в „Алмагест“, през 2008 г. е бил представител на „Чайкафарма“, а от 2013-2015 гг. е редовен докторант при Катедра Инженерна химия, ХТМУ. Отчислен е с право на защита. Междувременно през 2012 и 2013 гг. е бил консултант по енологична и лозарска дейност в „Лозев Вино“ ООД, Свиленград, България и в „Domaine de Glandeves“ Entrevaux, Франция, и за няколко месеца през 2014 г. е работил като технолог в „Centre de Recherche et d'Expérimentation sur le Vin Rosé“, Vidauban - Франция. В периода 2012 – 2014 гг., по време на редовната си докторантура, е стажувал неколккратно в различни научни и изследователски центъра във Франция.

Изследователските интереси на инж. Точев са основно в областта на екологичното лозарство и производство на вино, биотехнологията, органичната химия и физикохимични и прочие методи за анализ.

Преглед на дисертационния труд

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е написан на 111 страници и е структуриран както следва – въведение, пет глави, заключение, изводи и приноси както и списък на използваната литература, включващ 215 литературни източници. Има пълно съответствие между дисертационния труд и автореферата на докторанта.

Като основна цел на дисертационния труд маг. Точев е посочил провеждане на експериментални изследвания свързани: „с определяне на количеството на транс-резвератрол в български и други вина и с методи за повишаване на концентрацията му във вината“, както и „определяне на значението във връзка запазването на транс-резвератрола във вината и гроздовата мъст и влиянието на транс-резвератрола върху окислението на вината и гроздовата мъст“ (стр. 68).

Реализацията на така поставената цел насочва изследванията към използване на инструментариума на инженерната химия, биотехнологията и физико-химията, което налага едно изключително добро запознаване със специализираната литература и без съмнение изисква придобиване на нови познания и уменията от дисертанта. Това е позволило на маг. Точев да формулира много точно (за разлика от известни смислови неточности при формулиране на Целта, вж. по-горе) задачите на дисертационния труд, като заслужава да бъде отбелязано, че последователността във времето за тяхното изпълнение е обмислена много добре. Последното е особено важно като се има предвид огромния обем експериментална работа, предвидена да се извърши с цел решаване на поставените задачи.

Литературният преглед – **Глава 1** (наречен не особено коректно, според мен, „**Състояние на проблема**“) е наистина обширен (стр. 6-46). Последователно е разгледано съдържанието на най-важните фенолни съединения (антоциани, катехини и проантоцианидини) в червени и розови вина и е дадено кратко описание на химичната им структура, разпространение в природата, биологична активност, физиологично действие. Специално внимание е отделено на резвератрола, което е напълно обяснимо и обосновано пред вид темата на дисертационния труд като последователно са представени номенклатура, физико-химични свойства на чистия компонент, биосинтез на резвератрол в природата. Посочени са причините за произвеждане на резвератрол в гроздето, изложени са подробно ползите за здравето на човека, и ролята на резвератрола при профилактика на сърдечно съдови, карциномни, дегенеративни и прочие заболявания. Внимание е отделено и на Piceid, глюкозид на резвератрола, което е обусловено от факта, че той има по-високо съдържание в храната от резвератрола.

В подраздел 1.2.3.2 Структурно - активни отношения на резвератрола са разгледани „количествената структурна-активност (QSAR) на резвератрола“. Тук трябва да бъде отбелязано, че „Структурно - активни отношения“ са некоректен превод на Quantitative structure–activity relationship (approach). QSAR подходът е създаден с цел разработване на количествени зависимости „структура-активност“, под формата на регресионни модели, които свързват химичната структура с биологичната активност (вкл. токсичност) на дадено вещество. Моделите QSAR имат изключително широко приложение в медицината, биологията, фармацията, особено при синтез на нови лекарствени препарати с предварително зададени свойства, химията и пр.

В следващите подраздели 1.2.3.3 – 1.2.3.6 на Глава 1 подробно са разгледани антиоксидантна активност, фармацевтично въздействие и метаболизъм на транс-резвератрола, и е направен преглед на изследванията, посветени на бионаличност на резвератрола при хората.

В тези части от литературния преглед е използвана твърде специализирана терминология, която е твърде далеч от моите компетенции, за да мога да се произнесе по нейната точност, и най-вече коректност при превода, особено в изречения като това на стр. 19: „При наличието на най-съвременна техника, за предварителната реакция, първоначално беше докладвано от Murry и др. през 1986 г., при кратковременна исхемия, последвана от кратък интервал от реперфузионна за няколко цикъла, причинени от кардиопротекция срещу нараняване при исхемична болест на сърцето (Das et al., 2005)“ и пр.

Предполагам, все пак, че дисертантът се е запознал подробно със специализираната литература по въпроса, което, без всякакво съмнение, допълнително е обогатило неговите знания, а за що не и може би е дало/подказало нови насоки на бъдещите му изследвания.

В раздел 1.3 „Съдържание на фенолните съединения в червени и розови вина“ е направен обстоен анализ на съдържанието на катехини и проантоцианидини в различни части (семки, чепки, люспи, пулпа) на различни сортове грозде, последван от наистина много детайлен преглед на налични данни за тридесет и четири от най-важните сортове турски вина от четири географски региона в Турция и 200 червени

вина от района на Калифорния. Показани са данни и за съдържанието на транс-резвератрол в български червени вина от сорт Мавруд, Пино Ноар и Мерло, от различни реколти и различни производители и е предложен анализ на причините за ниското/високо съдържание на транс-резвератрол в някои от изследваните видове вина (напр. различни трансформации на цис- и транс- формите на резвератрола във връзка с обработката на вината с различни бистрители, антиоксиданти и филтриране преди бутилирането им, и пр.)

От текста на стр. 34: „Получените резултати показват, че при българските червени вина транс-резвератрола” оставя впечатление у читателя за известна неяснота от кого/кога са получени тези данни. В последствие, се изяснява, че резултатите, отразени в Табл. 1.3 - 1.7 и Фиг.1.5 - 1.8 са дело на дисертанта, което несъмнено предполага извършването на една наистина огромна, както по обем така и по продължителност във времето, експериментална работа. За съжаление, заради такива неточности не може да изпъкне и да се оцени напълно и по достойнство извършеното от маг. Точев.

На стр. 37 дисертантът е отбелязал не особено значителния интерес в България към производството на розови вина и е посочил, че при тях, поради по-бедният им фенолен състав, концентрацията на транс-резвератрол е много по-ниска от тази в червените вина. Отново не е отбелязано, че резултатите за съдържание на транс-резвератрол в изследваните седем розови вина от различен производител, регион и вид грозде, представени в Табл. 1.8 са дело на дисертанта. Едва в първия параграф на раздел 1.4. „Статистически изследвания за....” е посочено експлицитно, че са използвани „резултати от нашите изследвания за съдържанието на транс-резвератрол проведени през 2011 и 2012 година с червени вина от различни сортове и региони от реколта 2011, 2010, 2009, 2008, 2007, 2006, 1992, 1991 и 1990 година”, които са сравнени с резултатите на други „изследователи определили количеството на транс-резвератрола в различни страни по света” (вж Табл. 1.9 - 1.11 и Фиг. 1.8 - 1.13). При внимателен прочит на останалия текст на дисертационния труд възниква въпросът защо тази така важна част от изследванията на дисертанта (както по обем извършена работа, така и по значимост на получените резултати) е оставена в литературния преглед, а не в същинската част на дисертацията?

В **Глава 2** (стр. 47-53) дисертантът разглежда различните процеси при винопроизводството от гледна точка на това как те могат да бъдат използвани, видоизменяни, евентуално оптимизирани пр. с цел получаване на вино, което да отговаря на конкретни изисквания на потребителя. Важно заключение на маг. Точев е, че съвременната наука за виното е толкова развита, че предлага възможности за контролиране на отделните етапи на технологичния процес и превръщането на „някои недостатъци на суровината в плюсове“.

Това, без съмнение, определя най-важните насочености на работата на дисертанта, а именно: усъвършенстване на механизмите за запазване на анти-оксидантите във виното с времето; набелязване, тестване и верифициране на възможностите на различни технологични практики при производство на розови и червени вина с цел увеличаване на количеството транс-резвератрол на всеки етап - от обработване на гроздето до получаване на самото вино.

Във връзка с това са анализирани последователно процесите:

- *мацерация*, като е посочено, че при този процес се провеждат няколко кондензационни реакции, включващи антоцианини, катехини, процианидини и стилбени, които влияят върху крайния състав на полифенолните съединения във виното;
- *пресоване* – един от най-важните етапи за производството на розови вина, при който се екстрахират феноли, различни по количество и състав, и на които се дължат цветът, ароматът, структурата и антиоксидантната активност на виното;
- *бистрене* на гроздовата мъст за получаване на розово вино. Разгледани са различни възможни методи като по-подробно е описан процеса на бистрене чрез

флотация. За мен отново остава без отговор въпросът дали описанието на системата „за налягане, използвана при *нашите* флокулатори ...” (стр. 50-51, курсивът е мой) се отнася за системи използвани обикновено в практиката или пък за системи, разработени/усъвършенствани/видоизменени и тествани от дисертанта с цел реализиране на по-ефективна флокулация. Това е важно, тъй като, както е показал дисертантът, използването на различни техники и методи на бистрене влияе и определя до голяма степен количеството на резвератрол във вината;

- *алкохолна ферментация* - много важен етап от образуване на виното, при който, в резултат на протичане на сложни биохимични, химични и физико-химични реакции, под действието на дрожди, захарите се метаболизират до етилов алкохол, въглероден диоксид и се отделя топлина; Подробно са изредени факторите, които влияят върху дейността на дрождите и е отделно специално внимание на β -глюкозидазната им активност, тъй като при производството на червени вина β -глюкозидазата е една от потенциалните причини за влиянието на дрождите върху цвета на виното, а при производството на бели вина от ароматни сортове грозде β -глюкозидаза има ключова роля като „аромат-освобождаващ” ензим.

Глава 3 (стр. 54-66) е посветена на изключително важното въздействие на кислорода върху различните етапи на производство на вино – като се започне от гроздобера (когато и ако има нарушаване на целостта на гроздовите зърна), и се премине през ронкане, смачкване, алкохолна ферментация, съзряване и стареене на виното. Последователно са разгледани:

- процесът на разтваряне на кислород във виното, като е посочено, че той зависи от редица фактори – природа и състав на флуидите, температура, скорост на подаване на кислород, вид на дифузьор, наличие на вещества, консумиращи кислород (серен диоксид, етанол, полифеноли и наличие на утайки), вид на резервоар и пр;
- технологичните операции, които влияят на разтворения във виното кислород, като прехвърляне на виното от резервоар в резервоар, егализиране, зареждане с бистреши и стабилизиращи средства, филтриране, и пр;
- химичният процес на свързване на кислорода със съставките на виното и факторите, които влияят върху скоростта на съответните химични реакции;
- механизъмът на окисление на виното; посочено е, че и в четвъртия стадий от развитие на виното, а именно стареене, протичат същите процеси, както и при съзряването на виното, но при нисък окислително-редукционен потенциал;
- разпределението на кислорода във виното: Коментирано е, че то е неравномерно, като, особено при класическите технологии, количеството на погълнатия от виното кислород се движи в широки граници и контролируемостта на процеса не е много добра, докато посредством микро-оксигенацията се знае точно с колко кислород е обогатено виното.

Без съмнение, Глава 3 е много важна част на дисертационния труд, за написването на която очевидно е направен задълбочен, обстоен и критичен анализ на много голям брой литературни източници. Дисертантът правилно се е ориентирал и към онагледяване на разгледаните процеси чрез атрактивни схеми (вж Фиг. 3.1. до 3.5). За съжаление, известна небрежност, неподреденост, липса на номерация на уравненията, неточност на изказа, повторения и пр. затрудняват четенето.

Само два примера: На стр. 57 е дадена линейната зависимост на разтворимост на кислорода в мът и вино от температурата и е посочено, че „b и a са коефициенти, които зависят от алкохолното и екстрактното съдържание на виното”. Фиг. 3.3 Разтворимост на кислорода (стр. 60) показва „влиянието на дебита на газа върху „a”, като липсва всякаква препратка към линейното уравнение от стр. 57. На Фиг. 3.5 Внасяне на кислород във виното се използва аббревиатура ЯМКФ, но едва на стр. 71 става ясно, че последната се отнася за ябълчно- млечно кисела ферментация.

След твърде пространния, според мен, литературен преглед са направени Изводи, и, едва на стр. 68, се формулират за първи път целта на дисертационния труд и задачите/направленията на изследванията. При така избраната структура и

организация на дисертационния труд, на основните изследвания, резултати и заключения са посветени 2 глави - в обща сложност около 30 страници (стр. 69 – 98).

В **Глава 4** (стр. 69-86), според мен изключителна важна част от дисертационния труд, са описани изследванията на дисертанта, проведени с цел изпълнение на поставените амбициозни задачи за анализ на различните етапи от производството, и влиянието на различни фактори върху запазването на транс-резвератрола в набор експериментални вина от различни реколти. Реализирането на тези изследвания, които са комбинация от прецизна експериментална работа и използване на съвременни методи за анализ и методи за обработка на получените резултати, изисква отлична организация и детайлно планиране на всеки отделен етап.

Кратко обобщение на извършеното от докторанта:

- Изследвани са български бели, розови и червени вина от различни сортове и региони и от различни реколти от сортовете Пино Ноар, Мавруд, Мерло, Каберне Совиньон, Мелник, Гъмза, Шардоне, Совиньон Блан и Мускат Отонел от реколтите 2011, 2010, 2009, 2008, 2007, 2006, 1992, 1991 и 1990 година. Наистина една огромна по обем и значимост експериментална работа, която е извършена, резултатите анализирани, систематизирани и представени за първи път в България;
- Изследвани са етапите на производство на розови и червени вина от биологично грозде от сорта Мавруд и други сортове чрез микровинификация. Представени са много добре описани технологични протоколи, систематизирани и подредени в Таблицы 4.1. и 4.2;
- Разработени са оригинална схема и бърз и надежден метод за определяне на консумацията на кислород на гроздова мъст за розови вина от Мавруд и други сортове при различни обработки с резвератрол и други антиоксидантни вещества;
- Определени са факторите с най-голямо значение за аромата и вкуса на вина с различна степен на окисление;
- Използвани са набор от стандартни методи за анализ на физико-химични показатели, антиоксидантна активност, концентрация на киселини, спектрални характеристики и пр. на проби от грозде, екологични вина и лозови листа от различни етапи от производствения процес;
- Предложени са модификация и по-стабилен във времето стандарт на метод за анализ на транс-резвератрол и флавоноли чрез HPLC;
- Разработени са статистически модели за: 1) определяне на консумацията на кислород на гроздовата мъст за розови вина от различни сортове без/с различни обработки с резвератрол и други антиоксиданти; 2) дегустация на вината в зависимост от вида проби; 3) влиянието на различните стадии на производство върху количеството резвератрол в розови и червени вина.

В **Глава 5** (стр. 87-95) дисертантът е представил резултатите от изследванията си за влиянието на транс-резвератрола във висококачествени розови и червени вина върху отделните етапи на производство и е посочил как може да бъде използвана получената информация с цел получаване на вина с определени желани качества.

Така например е показано, че времето за консумация на разтворения кислород в мъстта е различно, като най-висока е скоростта на окисление за сорта Памид, а най-ниска - при Мерло и Сира, което дисертантът обяснява със сортова особеност, дължаща се на различното количество на ензима полифенол оксидаза. В следствие, на различни модели гроздова мъст, е изследвано влиянието на набор от антиоксидантни вещества като аскорбинова киселина, полизахариди с проантоцианидини, транс-резвератрол и негова комбинация с други вещества, върху консумацията на кислород и е показано, че най-добрата противоокислителна комбинация от всички изследвани, и, което е особено важно, действаща еднакво за мъсти от различни сортове, е резвератрол + проантоцианидини.

Изследвана е и консумацията на кислород от различни модели розови вина със същите като при червените вина добавки, като резвератрол + проантоцианидини е отново най-удачна. Показано е и, че се наблюдават най-високи стойности на

разтворения кислород, като разликите са особено впечатляващи след 1 година (Табл. 5.1).

Проведена е дегустация на модели розови вина с добавени вещества и са изследвани аромат и вкус, като най-висока оценка са получили моделните розови вина с добавен транс-резвератрол.

В раздел 5.4 са описани резултатите от изключително важните изследвания, проведени от дисертанта върху изменението на концентрацията на транс-резвератрола в моделни експериментални розови и червени вина от различни реколти и различни сортове (Мавруд, Сира, Гренаш) в зависимост от различни варианти на провеждане на отделните технологични етапи.

Изследвано е влиянието на:

- времето на мацерация,
- инерционната среда при ронкане, пресоване, по време на мацерация и флотация при бистрене на мъстта с N_2 под формата на газ и/или CO_2 под формата на пелети „сух лед”,
- ферментационните процеси с различни дрожди - енологични дрожди със слабо изразени ферментационни аромати и дрожди със силно изразена β – глюкозидазна активност;
- обработката на вината с бентонит, студ, филтриране и бутилиране.

За розовите вина е показано, че, въпреки видими разлики в количеството транс-резвератрол през различните години, най – високи стойности се наблюдават при моделните вина получени с комбинация от инерционна среда, гроздов танин и дрожди с β – глюкозидазна активност, като, обаче, измененията в количеството транс-резвератрол в отделните проби не влияе значително върху физико-химичните показатели на моделните вина.

Очаквано, при червените вина от Мавруд количеството на транс-резвератрола е в пъти по-високо по сравнение с това в розовите вина. Посочено е, че причината за по-ниските количества на транс-резвератрол в розовите вина е възприетата технология - по-кратък престой на джибрите с мъстта по време на настойване и ферментация.

Показано е, че удължен период на мацерация влияя положително на количеството на транс-резвератрол в готовото вино, докато различен престой на виното след алкохолна ферментация няма особен ефект. Видими разлики се наблюдават при използване на процеси като флотация с азот и създаване на инертна среда от газове N_2 и CO_2 , които увеличават количеството на резвератрол и се посочва влиянието на дрождите, като при комбинация от инерционна среда, подходящи дрожди и по-дълъг процес на мацерация количеството на резвератрол в червените вина се увеличава значително - аналогично на наблюдаваното при моделите розови вина.

Направен е важният извод, че използваните техники влияят еднакво както при розови така и при червени вина.

Приноси на дисертационния труд

Много сериозната и високо професионална експериментална работа извършена от дисертанта е позволила да бъде натрупана, анализирана и обобщена огромна по количество ценна информация, на базата на която **за първи път** са направени важни изводи относно влиянието на транс-резвератрол във висококачествени розови и червени вина, произведени по методите на биологичното земеделие.

Приносите най-общо могат да бъдат систематизирани в три групи:

- Развитие на механизмите за запазване на анти-оксидантите във виното с времето;
- Разработване на модели за производство на вино с увеличено количество транс-резвератрол;

- Изследване и анализ на възможностите на различни технологични практики на производство на розови и червени вина за увеличаване на количеството транс-резвератрол на всеки етап от винопроизводството.

Дисертантът е формулирал Научни и Научно-приложни приноси, като от първата група с особена тежест за мен се отличават приноси 2, 3 и 4, а от научно-приложните – приноси 1, 2, 3 и 6. Решението на дисертанта да включи принос 7 към научно-приложните е спорен; той, според мен, би трябвало да бъде отнесен към научните приноси.

Изразявам абсолютната си убеденост, че в дисертационния труд са получени **нови** и интересни резултати; че изследванията на маг. Точев са значими, много полезни и имат определена научна и научно-приложна стойност, и които, в една значителна степен, са намерили вече конкретни приложения и реализация в практиката на винопроизводството в България.

Публикации на дисертанта по темата на дисертационния труд

В списъка на публикации дисертантът е посочил шест заглавия. Внимателният преглед показва, че от тях:

- публикации с No 1, 2 и 3 са статии публикувани в български списания, без импакт фактор, като тази с No 2 вероятно е публикувана в материалите на Федерация на НТС в България, съдейки по ISSN: 1314-893;
- публикации с No 5 е отбелязана „под печат“, но на сайт на списанието тази публикация не фигурира като “Accepted”, а дисертантът не е представил и документ, потвърждаващ приемането ѝ;
- публикации с No 6 е публикувана в списание с Импакт фактор, но включването ѝ към научни статии с отношение към дисертационния труд е най-малкото спорно;
- под No 4 е посочена книга, на която един от авторите е маг. Точев.

Не се споменава дали са забелязани цитати. Последното съм склонна да си обясня с факта, че работите са публикувани сравнително скоро.

Съгласно изискванията, отразения в чл. 11, ал. 4 на Правилник за развитие на академичния състав на ХТМУ, дисертационният труд трябва да се основава „най-малко на една научна публикация в списание с импакт-фактор или на две научни публикации в специализирани научни издания без импакт-фактор, ...”

Така, дисертантът не само е удовлетворил напълно, но и значително е надхвърлил тези изисквания.

Някои критични бележки и препоръки

В дисертационния труд има редица неточности и пропуски на изложението като на някои от тях вече се спрях. За съжаление, в резултат на това възникват въпроси, които иначе биха били лесно изчистени. Най-вече, обаче, написването на текста, многобройните повторения, и пр. оставят впечатление за известна прибързаност, което пречи дори на най-добронамерения читател да разкрие и оцени в пълна степен огромния труд на дисертанта и значимостта на получените от него резултати.

Освен това, дисертационният труд изобилства с правописни грешки, наблюдава се известна еkleктичност при изписване на литературните източници и при начина на тяхното цитиране в текста на дисертацията - дори собствените публикации на дисертанта не са цитирани коректно – като липсват номера на страници и томовете, и пр.

Ако дисертантът има интерес да продължи своите изследвания с цел получаване на нови статистически модели бих му препоръчала използването на методологията на Response Surface, която определено дава значително по-големи възможности, включително и за онагледяване на получените регресионни модели от колкото тези, представени на Фигури 4.5 - 4.10.

Лични впечатления за дисертанта

Впечатленията ми от маг. инж. Точев са отлични – за мен той е задълбочен млад изследовател с отлична теоретична и експериментална подготовка, с много ясно очертана собствена тематика; амбициозен, систематичен и изключително отдаден на работата си. Убедена съм, че неговите бъдещи изследвания и практически дейности в толкова важната и актуална област за България като вино производството ще бъдат увенчани с успех.

Във връзка с това и като

Заклучение: С увереност мога да кажа, че дисертационният труд и неговите приноси са лично дело на дисертанта, че дисертацията удовлетворява напълно всички условия и изисквания за придобиване на **образователната и научна степен „доктор“**, както по обем, така и по качество, което ми позволява да предложа на почитаемото Научно Жури да подкрепи с **положителна оценка** дисертационния труд и присъждането на инж. маг. Диян Владимиров Точев образователната и научна степен „доктор“.

11.06.2016 г.

гр. София

Рецензент:



(проф. д-р инж. Румяна П. Статова)