Разширена хабилитационна справка за научните приноси на д-р Петко Денев, доцент в ЛБАВ – Пловдив, ИОХЦФ-БАН

След придобиване на академичната длъжност „доцент“ (2014г.) продължих научната си работа по тематики, по които ръководената от мен Лаборатория по Биологично Активни Вещества (ЛБАВ), Пловдив има изградени традиции. Приносите от научната ми работа имат фундаментален и приложен характер, и са насочени главно към изучаване на химичния състав на лечебни и икономически важни растения, и определяне на тяхната биологична активност. Искрено вярвам, че научната ми работа допринася за повишаване авторитета на ЛБАВ и утвърждаването ѝ като водещо научно звено в областта на функционалните храни, и търсен партньор от бизнеса и научната общност за съвместни научни и приложни разработки.

Разширената хабилитационна справка за научните приноси обхваща научни трудове №№ 1– 31 от приложения списък с научни публикации, патенти, полезни модели и глави от колективни монографии. Основните научни и научно-приложни приноси от тези трудове могат да се обобщят в следните направления:

1. Изследване на химичния състав и биологичната активност на лечебни и икономически важни растения:
   1.1. Изследване на химичния състав и биологичната активност на плодове и функционални храни от арония (*Aronia melanocarpa*);
   1.2. Изследване на химичния състав и биологичната активност на други лечебни и икономически важни растения;
2. Оползотворяване на отпадъците от етерично-маслената индустрия за получаване на нови продукти;
3. Изследване на химичния състав и биологичната активност на пектинови полизахариди.

Всички тези направления са приоритетни за редица национални стратегически документи като „Националната стратегия за развитие на научните изследвания в Република България 2017-2030 г.“, Иновационната стратегия за интелигентна специализация“ и др.

1. Изследване на химичния състав и биологичната активност на лечебни и икономически важни растения.

1.1. Изследване на химичния състав и биологичната активност на плодове и функционални храни от арония (*Aronia melanocarpa*).

Централно място в научно-изследователска дейност на ЛБАВ, през последните 15 години, заемат плодовете на аронията (*Aronia melanocarpa)*. Те са сред най-богатите източници на полифеноли и антоцианини в растителното царство и подходяща суровина за производство на функционални храни. Популярността на тези плодове се дължи не само на тяхната хранителна стойност, но и на непрекъснато появяващите се доказателства за техните здравословни ефекти. В периода 2014-2019г. задълбочихме изследванията върху плодовете на аронията, като през 2016г под мое ръководство бе финансиран проект от ФНИ № ДН09/20 на тема „Интегриран подход за подобряване качеството, органолептичните свойства и биологичната активност на функционални храни от арония (*Aronia melanocarpa*) чрез копигментация и синергизъм в антиоксидантната активност". В рамките на проекта направихме мащабно проучване на химичния състав на 23 проби плодове от арония от две последователни реколти – 2016г. и 2017г. Бе установено, че пробите от арония се различават значително както по съдържание, така и по състав на органични киселини, захари и фенолни съединения, като в някои случаи различията надвишиха 100%. Общото съдържание на полифеноли в плодовете вариране между 1022 mg/100g и 1795 mg/100g свежа маса, а ORAC антиоксидантна активност от 109 μmol TE/g до 191 μmol TE/g свежа маса. Разликите в химичния състав на плодовете доведоха до получаване на функционални храни, различаващи се значително по химичен състав и антиоксидантна активност. В допълнение показахме, че температурата на пресоване на сок и екстракция на нектар имя изявен ефект върху състава на полифенолните компоненти в тези продукти. Това е много важно, тъй като разликите в химичния състав на плодовете и тези в технологичните параметри на преработката, могат да доведат до функционални храни с различен химичен състав, което от своя страна е предпоставка за различна биологична активност (**Публикация №19**). В друга серия от експерименти, изследвахме антиоксидантната, антимикробната и неутрофил-модулиращата активност на различни полифенолни фракции от арония. Кверцетинът и епикатехинът бяха най-силните антиоксиданти сред полифенолите от арония, но високото количество проантоцианидини в свежите плодове ги прави основния фактор за проявената антиоксидантната активност. Проантоцианидините от арония се отличиха и като най-мощните антимикробни агенти в плода. Изследваните полифенолни фракции и компоненти не показаха ефект върху спонтанната хемилуминесценция (CL) на човешките неутрофили. По-значителен ефект бе наблюдаван при OZP-активирана CL, като ефекта бе най-значим при кверцетин и рутин. (**Публикация №24).** Плодовете от арония са особено богати на антоцианини,

които са нестабилни по време на технологична преработката и съхранение на продукти от арония. Ко-пигментацията е един от основните механизми за естествено стабилизиране на антоцианините и беше интересно да изследваме въздействието на различни фенолни ко-пигменти и билкови екстракти върху интензивността на цвета на антоцианини на аронията. Изследваните съединения провокираха различен ко-пигментационен ефект, проявен чрез хиперхромни и батохромни отмествания. Ко-пигментацията беше придружена от увеличение на интензивността на цвета и намаляване на цветовия оттенък, свързани с по-приятен за възприемане цвят. Хиперхромният ефект бе най-значителен при розмаринова киселина (51.02%), сирингова киселина (43.24%) и катехин (39,73%), но при най-високо съотношение пигмент/ко-пигмент (1:50), което не се среща естествено в растителната материя. Предвид потенциалното практическо приложение на това изследване, тествахме осем билкови екстракта за тяхната ко-пигментационна способност с антоцианини от арония. Използването на билкови екстракти доведе до значителен хиперхромен ефект при много по-ниски съотношения ко-пигмент/пигмент, в сравнение с чистите съединения. Използването на билкови екстракти като ко-пигменти отваря възможност за разработване на функционални храни от арония с подобрени сензорни свойства и биологични ефекти, благодарение на повишената стабилност на цвета и антоцианините в тях **(Публикация №21).** Бяха проведени и технологични опити за синергично повишаване на антиоксидантната активност на напитки от арония чрез добавка на екстракт, получен чрез хомогенизация на шипкови плодове. Резултатите с реално практическо приложение бяха защитени чрез полезен модел (**Полезен модел №28**).

Важен етап при производството на функционални храни е изследване на тяхната биологична активност *in vitro* и *in vivo.* В рамките на горе-споменатия проект, в сътрудничество с екипи от Медицински Университет-Пловдив, бяха проведени различни опити с функционални напитки от арония. В тези съвместни изследвания участвах с подготовката и анализа на функционалните напитки от арония, дизайна на самите изследвания и интерпретация на резултатите. Възрастово-обусловените заболявания са социален проблем от световно значение и тяхната превенция чрез природни продукти е изследователска област от особен интерес. Това подтикна нашия интерес към изследване на възможността за противодействане на рисковите фактори на атеросклероза, възникващи в процеса на стареене, чрез суплементация със сок от арония. Използвахме животински модел със здрави възрастни плъхове и изследвахме ефекта на сок от арония върху различни соматометрични, липидни и хистопатологични параметри при опитните

животни **(Публикация №4)**. Суплементацията със сок от арония понижи значително проатерогенната фракция на липопротеините с ниска плътност на изследваните животни и доведе до 16.5% намаление на общия им холестерол. Атерогенните индекси при животните, третирани с арония ясно показаха по-нисък атерогенен риск и кардиопротективни показатели на сърдечно-съдовата система. Освен това, сокът от арония забави възрастовите промени в стената на аортата и може да бъде препоръчан като профилактично средство за остаряване в добро здраве. Използвайки същия животински модел, наблюдавахме, че животните, суплементирани с арония се характеризират с намалени атеросклеротични увреждания и по-ниско ниво на преструктуриране на аортните стени, което потвърждава, че сокът от арония успешно забавя възрастово-обусловеното съдово стареене **(Публикация №6).** В скорошно проучване изследвахме ефекта на сок от арония върху способността за учене и паметта на възрастни плъхове, както и върху мозъчната им морфология. Тестът activity cage показа, че плъховете третирани с арония увеличават броя на вертикалните движения в сравнение с възрастните контроли. Суплементацията с арония не повлия върху средния брой на невроните в гирус дентатус, но значително увеличи тяхната плътност в перфорантния път на хипокампа. Сокът от арония повиши ацетилхолинестеразната активност в хипокампа, което е маркер за подобрена функционална активност на холинергичните неврони и показател за невропротективен ефект. Тези резултати показват, че сокът от арония подобрява способността на възрастни плъхове да учат задачи и подобрява техните локомоторни функции (**Публикация №27**).

1.2. Изследване на химичния състав и биологичната активност на други лечебни и икономически важни растения.

И в периода 2015г – 2019г продължихме изследвания върху фитохимичния състав и биологичната активност на български лечебни растения. В обзорна статия обобщих нашите резултати за ORAC антиоксидантната активност на близо 80 български плодове, зеленчуци и билки, добавяйки към списъка и непубликувани данни за 11 български гъби, 4 зеленчука и 2 билки (**Публикация №10**). В допълнение, систематизирахме наличната информация за здравословните ефекти на флавоноидите и тяхната роля в здравословното хранене, и представихме собствени резултати за флавоноидното съдържание (флаван-3-оли, флавоноли и флавони) на избрани плодове и зеленчуци, търсейки корелация с тяхната ORAC антиоксидантна активност. Този труд беше публикуван в престижното издание „Handbook of food bioengineering“ на издателство Elsevier (**Глава от колективна**

монография №30). На базата на големия натрупан обем от резултати за антиоксидантната активност на български растителни суровини, задълбочихме опитите по приложението на лечебни растения при разработване на нутрацевтици и функционалните храни. Листата от къпина (*Rubus fruticosus*), арония (*Aronia melanocarpa*), малина (*Rubus idaeu*s), глог (*Crataegus monogyna*), както и надземните части от цариче (*Alchemilla glabra*) и блатен тъжник (*Filipendula ulmaria*) се отличиха с много висока *in vitro* антиоксидантна активност, измерена чрез няколко метода (ORAC, TRAP, HORAC и инхибиране на липидна пероксидация). Всички изследвани екстракти блокираха почти напълно OZP-индуцирана продукция на реактивни форми на кислорода от човешки неутрофили, показвайки, че техните полифеноли (с изключение на тяхната антиоксидантна активност) регулират сигналните пътища за активиране на протеин киназа С. Блатния тъжник и листата от къпина показаха и много висок антимикробен ефект (**Публикация №1**). В последващо проучване, определихме антиоксидантната активност на екстракти от *Valeriana officinalis, Mellisa officinalis, Crataegus monogyna, Hypericum perforatum, Serratula coronata* и техните комбинации „Антистрес 1“ и „Антистрес 2“, налични в търговската мрежа като хранителни добавки против хронична умора, тревожност и стрес (**Публикация №11**). Най-силно изразена антиоксидантната активност показаха екстрактите от маточина и жълт кантарион, като те допринесоха в най-голяма степен за антиоксидантната активност на продуктите „Антистрес 1“ и „Антистрес 2“. Проведеното проучване за остра токсичност *in vivo,* показа нетоксичност, както на отделните екстракти, така и на техните комбинации. В друго изследване, за пръв път бе изследвана ORAC и HORAC антиоксидантна активност на различни флавоноидни гликозиди, изолирани от плодове на тревист бъз (*Sambucus ebulus*) (**Публикация №2**). Данните за антиоксидантна активност на български природни продукти бяха допълнени и с резултати за ORAC антиоксидантна активност на етерично масло от *Salvia tomentosa,* измерена чрез модификацията на метода за липофилна антиоксидантна активност (**Публикация №5**). Към този набор от изследвания бихме могли да добавим и скорошно проучване върху кинетичните параметри на ко-пигментацията между антоцианини от ягоди и кафеена киселини, което показва, че процесът на ко-пигментацията между тях е необратим (**Публикация №18**).

Chaenomeles maulei (японска дюля, планински лимон) е все още малко познато растение у нас и малцина са запознати с факта, че тази планинска култура е широко проучвана в Института по планинско земеделие в Троян, в опит да бъде интродуцирана в България. За първи път изследвахме химичния състав и антиоксидантната активност на

плодов сок от *Chaenomeles maulei* от плодове, култивирани в България. Резултатите показват, че сокът е изключително богат на полифенолни вещества. Киселият вкус на сока и неговото ниско pH се дължат на високото съдържание на органични киселини (ябълчна, лимонена киселина, аскорбинова и оксалова). Въглехидратите са представени от глюкоза, фруктоза, галактоза, ксилоза, рамноза и арабиноза. Антиоксидантната активност, измерена чрез ORAC и HORAC методите бе много висока и корелираше добре с високото съдържание на полифеноли. Въз основа на тези резултати може да се заключи, че плодовете на *C. maulei* могат да се използват в хранително-вкусовата промишленост като естествен подкисляващ агент. В същото време, чрез високото си съдържание на фенолни вещества с антиоксидантна активност, биха повишили функционалността на хранителните продукти (**Публикация №23**).

Пиперът (*Capsicum annuum*) е най-широко култивираната и икономически най-важна зеленчукова култура в света. Богатото агробиоразнообразие на пипер в Балканския регион е ценен източник на нови алели за подобряване на качеството и хранителната стойност на плодовете. В България липсва комплексна оценка на генетичното разнообразие на пипер по отношение на вещества с антиоксидантни свойства в плодовете. В скорошно проучване използвахме богатото биоразнообразие на пипер в Балканския регион и охарактеризирахме химичния състава и антиоксидантната активност на 63 генотипа, сортове, местни форми и F1 хибриди пипер, разделени условно в пет групи (люти; зелени/сладки; камби; капии; за мелене) (**Публикация 26**). Получените резултати свидетелстват за големи различия в химичния състав, както между отделните сортови групи, така и между отделните представители в групите. От захарите в изследваните проби, в най-големи количества е застъпена глюкозата (0.36-3.79%), следвана от фруктоза (0.16-2.98%). В измерими количества захарозата е намерена най-вече в групите "Люти" и "Зелени", които са събрани преди пълна зрелост. Представителите от група "За мелене" са най-богатият източник на уронови киселини - 0.77%, следвани от представителите от "Люти" - 0.64%. Подобно на съдържанието на захари, профилът на органичните киселини на различните групи се различава значително. В четири от петте групи, лимонената киселина е преобладаващият представител, докато само в групата "Зелени", ябълчната киселина е преобладаваща. Най-голямо количество аскорбинова киселина (витамин С) се открива в генотип (CAPS-7), който е част от групата „Люти". Съдържанието на полифеноли варира в широки граници от 42 mg/100 g свежа маса до повече от 6 пъти по-висока стойност (266 mg/100g свежа маса). Разликите във флавоноидното съдържание на отделните представители са

още по-значителни, достигайки 60-кратна разлика - от 1.0 mg/100g свежа маса до 64.3 mg/100g свежа маса. Представителите от групата "За мелене" са водещи по отношение на съдържание на общи полифеноли и флавоноиди, както и по отношение на тяхната антиоксидантна активност, измерена посредством ORAC и HORAC методи. Тези вариации в химичния състав на плодовете може да бъдат манипулирани чрез размножаване на растенията, за да се създадат нови сортове пипер с подобрена хранителна стойност. Това изследване бе проведено в рамките на проект ДН06/4 от 2016г., финансиран от Фонд „Научни изследвания“ и чиито координатор за ИОХЦФ-БАН съм аз. В друго проучване, изследвахме основните параметри, които влияят на процеса на екстракция на полифенолни съединения от домати. Бе установено, че най-подходящия екстрагент е смес ацетон-вода 80:20 (v:v), а оптималното време за екстракция, температурата и хидромодул бяха съответно 45 min, 60°C и 1:40. Използвайки тези екстракционни параметри, добивът на общи полифеноли от домати сорт „Десперадо“ беше 27.80 GAE/100g свежа маса. Изследвана бе и кинетиката на екстракционния процес и бе предложен теоретичен модел, описващ процеса на екстракция (**Публикация №2**).

Стевията (*Stevia rebaudiana*) е многогодишен храст, който расте естествено в Парагвай и Бразилия. Изсушените листа от стевия се използват индустриално като източник на стевиол-гликозиди, използвани в хранителната индустрия като подсладител. Бидейки 300 пъти по-сладки от захарозата, стевиол-гликозидите се считат за един от най-силните естествени подсладители. Селскостопанският институт в Шумен извършва полеви изпитания, насочени към селекцията на български сортове стевия, които при климатичните условия на България може да се отглеждат само като едногодишна култура. В съвместно изследване, определихме съдържанието на стевиол-гликозиди в 24 генотипа стевия, култивирани в България. HPLC анализът показа, че съдържанието на стевиозид в отделните групи достига 6.80 g/100 g суха маса, а това на ребаудиозид А - 8.27 g/100g сухо тегло. Това сравнително изследване е началната стъпка в селектирането на български сорт стевия с високо съдържание на стевиол-гликозиди. Получените резултати ни позволяват да направим извод, че чрез пътя на индивидуалната селекция и в климатичните условия на България, е възможно да се развият генотипове стевия с високо съдържание на стевиол-гликозиди (**Публикация №9**).

Киноата (*Chenopodium quinoa*) е растение, което от скоро се отглежда успешно в Египет, осигурявайки семена, богати на хранителни вещества и биоактивни съединения. В рамките на между-академично споразумение за научен обмен между Българската

Академия на Науките и Университета Бенха в Египет, изследвахме химичния състав, хранителната стойност, аминокиселинния и мастнокиселинния състав на избрани генотипове киноа (Shams17-2, Shams16 и Shams14), култивирани в (**Публикация №13**). От направеното изследване може да се заключи, че семената от киноа от новите Египетски генотипове са добър източник на основни хранителни вещества като минерали, есенциални аминокиселини и есенциални мастни киселини.

2. **Оползотворяване на отпадъците от етерично-маслената индустрия за получаване на нови продукти;**

Изследванията в това направление са направени основно в рамките на проект ДН 17/22 от 2017г. „Оползотворяване и приложение на отпадъчни материали от етерично-маслената индустрия за „зелен“ синтез на метални наночастици”, чиито координатор за ИОХЦФ-БАН съм аз. Приносът ми в тези изследвания се състои основно в охарактеризиране на екстрактите, получени от отпадъчна биомаса от етерично-маслената индустрия. Така, в серия от изследвания (**Публикации №№ 8, 12, 17, 22, 25**) бяха получени и охарактеризирани различни полифенолни и полизахаридни екстракти от отпадъци от маслодайна роза (*Rosa damascena*), невен *(Calendula officinallis*), лавандула (Lavandula angustifolia) и маточина (*Melissa officnialis*). Изследван бе ефекта на добавянето на отпадъците от лавандула и маточина върху качествените показатели и срока на годност на хляб (**Публикация №17**). Установено бе, че отпадъците от лавандула и маточина, са богати на полифеноли (особено на розаминова киселина) и ароматни съединения и проявяват висока антиоксидантна и антимикробна активност. Общото количество хранителни влакнини се увеличи три пъти, а полифенолите и флавоноидите се увеличиха повече от четири пъти в хляб с добавени 5% отпадъци от лавандула и маточина, в сравнение с контролната проба. Хлябът с 2.5% и 5% добавени отпадъци от лавандула се характеризираше с повишен срок на годност (до 96 часа), в сравнение с контролната проба. Особено интересно е изследването върху синтеза на наночастици чрез използване на екстракти от отпадъци на *Rosa damascena* и тяхното приложение за електрохимично отчитане на водороден пероксид и ванилин (**Публикация №25**). Наночастиците от сребро (AgNPs) бяха синтезирани чрез редукция на Ag+ с четири екстракта от маслодайна роза: отпадъчна постдистилационна вода (PW), воден екстракт (WE), 30% (30 EE) и 70% (70 EE) етанолни екстракти. Етанолните екстракти бяха богати на полифеноли и особено на катехин и епикатехин, а водните екстракти на редуциращи захари, протеини и пектинови вещества. Биосинтезираните

AgNPs бяха отложени върху графитен електрод и стабилизирани с помощта на хитозан, за изграждане на модифицирани електроди-катализатори. Разработените електроди показваха висока чувствителност и възпроизводим отговор за количествено определяне на H_2O_2 и ванилин.

3. Изследване на химичния състав и биологичната активност на пектинови полизахариди.

Като част от изследванията от това направление, за първи път бе охарактеризиран полизахаридният състав в 11 Европейски и в частност български лечебни растения (**Публикации №№14, 15, 16, 20, глава от монография 29**). Установено бе, че продължителната екстракция с гореща вода е надежден начин за получаване на богати на пектинови полизахариди комплекси с висока *in vitro* комплемент-фиксираща активност и висок *ex vivo* интестинален имуномодулиращ ефект. Изолиран бе за първи път от цветовете на липата уникален пектинов полизахарид с противовъзпалителен потенциал, представляващ необичайно ацетилирана при Rha и силно глюкуронидирана при GalA (почти 1:1) основна верига на рамногалактуронан тип I. Изучена бе за първи път структурата и имуномодулиращата активност на водно екстрахируемите пектинови полизахариди от лавандула, показващи ex vivo имуностимулиращо действие върху фагоцитарни левкоцити и интестинална имуномодулираща активност. Открито бе, че лавандуловите пектини активират вродения и придобития имунен отговор през кръвта и съдържащите се в нея пайерови плаки, неутрофили, макрофаги и имунокомпетентни клетки от чревните пайерови плаки. Също така, за първи път бе изучена структурата и имуномодулиращата активност на водно екстрахируемите пектинови полизахариди от листа на коприва. От проведеното мащабно изследване може да се каже, че киселите хетерополизахариди от пектинов тип в българските лечебни растения проявяват ясно изразена имуномодулираща активност с имуностимулиращ и противовъзпалителен потенциал. Получените резултати са с практическо приложение и могат да служат като основа за създаване на вторични продукти с добавена стойност от култивирани български билки. Тези изследвания затвърждават водещата роля на ЛБАВ в изследването на химичния състав и биологичната активност на пектинови полизахариди у нас – научно направление, което трябва да се съхрани и развива в лабораторията.

Извън изброените четири направления, бих добавил **глава от колективна монография №31**, в която по покана от издателство Elsevier, с широк кръг от специалисти, направихме обзор и анализ на съвременните и ново-възникващи

технологии за студена пастьоризация на хранителни продукти. В допълнение, в рамките на **публикация №7** посредством различни методи бе измерена антиоскидантната активност на екстракти от антарктически дрожди *Sporobolomyces salmonicolor* AL1.

Перспективи за научни изследвания през следващите 5 години

Предвиждам бъдещата ми работата да бъде насочена основно към изследване химичния състав и биологичната активност на лечебни и икономически важни растения, и отпадъците от тяхната преработка, за разработване на нутрацевтици и функционални храни. В близко-срочен план (през следващите 2 години) приоритет в работата ми ще бъде успешното завършване на ръководения от мен проект и останалите 3 проекта на лабораторията, финансирани от Фонд Научни Изследвания и по-конкретно:

1. Проект № ДН 09/20 „Интегриран подход за подобряване качеството, органолептичните свойства и биологичната активност на функционални храни от арония (*Aronia melanocarpa*) чрез копигментация и синергизъм в антиоксидантната активност".

2. Проект № ДН 06/4 Фенотипиране и генотипиране на образци пипер (*Capsicum annuum*) с произход Балканите за създаване на core колекция.

3. Проект ДН 17/22/12.12.2017 „Оползотворяване и приложение на отпадъчни материали от етерично-маслената индустрия за „зелен" синтез на метални наночастици".

4. Проект ДН 19/14 ФНИ „Комплексен подход за оценка на промените в биологично-активни вещества и антиоксидантния потенциал на облъчени растителни храни и билки. Нови протектори срещу гама-облъчване".

Междувременно ще търся възможности за проектно финансиране на една моя идея, свързана с разработване на функционални храни, естествено обогатени на гама-аминомаслена киселина (ГАМК) и изследване на влиянието на ГАМК и полифенолните компоненти в храните върху експресията на някои гени, свързани с процеса на стареене (съвместно с екипи от МУ – Пловдив и МУ-Варна).

Бих искал да задълбоча връзките с бизнеса и индустрията по решаване на реални практически проблеми, които биха имали и икономически ефект. Такава разработка предстои да бъде подписна официално през м. септември, 2019г.

Пловдив, 19.07.2019 Изготвил:

Доц. д-р Петко Денев