

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. Пенка Ангелова Мончева, д-р, Софийски университет „Св. Кл. Охридски”,
Биологически факултет

на дисертационен труд, представен за защита пред научно жури, сформирано със заповед
No РД-19-419/04.07.2011 на Ректора на Софийски университет „Св. Кл. Охридски” за
получаване на образователната и научна степен „доктор”

Автор на дисертационния труд: Сашо Спасе Стояновски

Тема на дисертационния труд: „Изследване върху млечнокиселата микрофлора на
сурово-сушени традиционни български колбаси – тип „луканка”

1. Актуалност и значимост на дисертационната тема

Производството на редица характерни за Балканския регион колбаси се базира на традиционни технологии, много от които са основани на протичането на спонтанни ферментации, предизвикани от естествената микрофлора. При използването на този начин за получаването им обаче, качествата на продукта могат да варират в значителна степен, което може да се отрази негативно на продажбата му. Познаването на естествената микрофлора, както и на процесите, които тя извършва са важно условие за изолирането на микроорганизмите и използването им за получаване на закваски. Това би довело до получаване на продукт, от една страна получен на базата на естествени изолати, а от друга страна до постигане на стандартизиране на качествата на продукта. Проблемите, свързани със стандартизирането при производството на колбаси придобиха голяма актуалност през последните няколко години, което показва значението и актуалността на дисертационната тема.

2. Оценка на структура на дисертационния труд

Дисертационният труд е построен по изискванията за такъв род трудове, като е съставен от 9 раздела: Увод (1 стр.), Литературен обзор (38 стр.), Цел и задачи (1 стр.), Материали и методи (11 стр.), Резултати и обсъждане (38 стр.), Обобщение (4 стр.), Изводи (2 стр.), Приноси, Списък на използваната литература (съдържа 208 източника) и Приложение (12 стр.). Общият обем на труда, без приложението е 108 стандартни А4 формат страници.

2.1. Литературен обзор

Обемът на литературния обзор е приблизително 1/3 от общия обем на дисертацията. Чрез него се разкриват както общо-микробиологичните познания на докторанта, така и неговата добра теоретична подготовка по конкретната тема на дисертационния труд. Обзорът е фокусиран върху няколко проблема – разглежда се микрофлората на месото, прави се преглед на сурово-сушените колбаси като са разгледани онези, чието производство се базира на ферментации от естествената микрофлора, както и на такива, получени чрез използването на стартерни култури. Специално място е отделено на българските колбаси-тип „луканка”, чието микрофлора е предмет на изучаване от докторанта. Направен е подробен преглед на млечнокиселите бактерии, които стоят в основата на ферментациите, при получаването на тези колбаси и които докторантът изследва, както и методите за характеризирание и идентификацията им – класически и молекулно-генетични. Считам, че литературният обзор е построен много добре, изчерпателен и последователен е и съответства напълно на темата на дисертационния труд, като насочва читателя към целта на изследването. За неговото написване са използвани солидни литературни източници. Докторантът се е позовал на 208 източника, информацията от които е подложил на анализиране и обобщение. Стилът е много добър, граматически издържан. Цитирани са както заглавия от последните десетина години, така и по-стари, което показва задълбочено познаване на проблема. Считам, че този раздел от дисертацията представя докторанта в много добра светлина, показва придобитите в хода на докторантурата умения за работа с научна литература и много добра теоретична подготовка, необходима за планиране и успешно провеждане на експерименталната част.

2.2. Цел и задачи

Целта на дисертацията е поставена ясно и конкретно. Нейното постигане докторантът е предвидил чрез изпълнението на също така ясно дефинирани пет задачи, добре обвързани с целта и нейното реализиране.

2.3. Материали и методи

Разделът съдържа прецизно описани използваните в работата материали, както и приложенияте за изпълнението на задачите методи. Подбран е набор от класически и съвременни микробиологични, аналитични и молекулярно-биологични методи. Според мен те са подходящо избрани и съчетани и дават възможност за изпълнение на задачите. От методична гледна точка докторантът е много добре подготвен.

2.4. Резултати и обсъждане

В този раздел са изложени и обсъдени получените от докторанта резултати по реда на поставените задачи, което улеснява читателя и показва неговото умение да оформя и представя резултатите логично и последователно. Те са илюстрирани богато чрез 14 таблици и 34 фигури. Докторантът работи с 39 щамове млечнокисели бактерии, изолирани от различни етапи на ферментацията на панагюрска луканка и чиято родова принадлежност към род *Lactobacillus* потвърждава чрез родово-специфичен PCR. След морфологична характеристика и определяне на типа на ферментацията, провеждана от тях щамовете са идентифицирани до вид чрез секвениране на гените за 16S рНК. Установено е, че те принадлежат към 3 вида – *L. plantarum*, *L. sakei* и *L. brevis*. Щамовете са характеризирани физиолого-биохимично по 7 характеристики, които имат и важно технологично значение за стартерните култури. За това анализиране са приложени разнообразни методи – класически морфологични и култивационни микробиологични методи, съвременни миниатюризирани системи като системата API ZYM за изследване на ензимния профил на щамовете, електрофоретични и др. Изследвано е разнообразието както между видовете, така и в рамките на всеки вид, което е направено по фенотипни и генотипни признаци. Фенотипното разнообразие е изучено чрез изследване на електрофоретичния профил на тотални клетъчни белтъци, а генотипното чрез сравняването на профилите получени чрез няколко PCR техники – PCR-RAPD анализ, Rep-PCR и Egis-PCR. Докторантът обобщава, че най-подходяща техника за разкриване на разнообразие сред изследваните изолати е Egis-PCR, както и че на базата на проведените от него изследвания и получените от тях резултати някои от щамовете, поради добрите технологични качества и антимикробна активност, биха могли да се предложат като стратерни култури за производство на сухи колбаси тип «луканка»

2.5. Изводи и приноси

Въз основа на огромната експериментална работа дисертантът прави 8 извода, които произтичат логично от получените резултати

Дисертационният труд има както приложни, така и теоретични приноси:

За първи път чрез молекулно-генетични методи се характеризира и идентифицира сигурно млечнокиселата микрофлора от род *Lactobacillus* от българска луканка.

На базата на немалкия брой изследвани щамове, преди всичко от вида *L. brevis*, дисертантът установява, че техниката Egis-PCR е много подходяща при изучаването на вътревидовото разнообразие, което би могло да бъде използвано и от други автори.

На базата на изследваните технологични и физиолого-биохимични качества на щамовете, този дисертационен труд предлага щамове с бъдещо приложение като стартерни култури за производство на колбаса „луканка“.

3. Участие на докторанта в изработването на дисертацията

Като член на катедрата, в която Сашо Стояновски разработи своя дисертационен труд съм свидетел на неговото усърдие и трудолюбие при извеждане на експерименталната работа. Това му позволи да извърши значителна по обем работа. Бих могла със сигурност да кажа, че през този период той се изгради като изследовател-микробиолог, имайки предвид неговото базисно образование. Проведените експерименти са негово дело, като част от изследванията са извършени с колектив от лабораторията, в която той работеше, а също така и с колега от катедра Генетика. Това му даде възможност да придобие умения за работа в изследователски колектив.

4. Препоръки, забележки и въпроси

Към раздел Материали и методи

- В точката Микроорганизми би било добре да бъде отбелязано, че в молекулно-генетичните изследвания са използвани няколко щамове на вида *Enterococcus faecium* в качеството на контроли, макар че това е казано в раздел „Резултати и обсъждане“.

Към раздел Резултати и обсъждане

- На фиг. 9, отразяваща морфологията на клетките на представителни изолати би било добре да се отбележи увеличението, при което са направени фотографиите.
- При провеждането на родово-специфичния PCR е препоръчително включването на референтни култури.
- Не би било излишно в текста при обсъждането на резултатите от секвенирането да се обясни смисълът на величината „max score“, на базата на която е направено заключението за видовата принадлежност на изолатите.
- На Фиг. 12, отразяваща растежа на изследваните щамове в среда с различна изходна киселинност, както и на фигурите, отразяващи хидролизата на белтъците на млякото е необходимо означения по осите на координатната система.

- Бих препоръчала в бъдещи изследвания с подобен характер, растежът на бактериалните щамове да бъде представян като брой клетки в единица обем (или логаритъм от този брой) вместо чрез оптична плътност.
- Обсъждането на някои от резултатите за ензимния профил на изследваните щамове би могло да бъде разрешено, за да може да се разбере по-добре смисълът от това изследване.
- При електрофоретичния анализ на ферментираното мляко, би било добре, като контрола да се включи не само неферментирано мляко, но и някакъв маркер от белтъци с молекулно тегло в порядъка на белтъците на млякото.
- При всички молекулни анализи би било добре включването на ДНК маркер, което би позволило по-разширен коментар на наблюдаваните различия в получените профили на щамове.

Към докторанта имам следните въпроси:

1. На базата на получените от вас резултати кои щамове и по какви критерии бихте предложили като стартерни култури и необходими ли са допълнителни изследвания за тяхното прилагане?
2. Имате ли някакви сведения за взаимоотношенията, които съществуват между установените от вас три вида?
3. Каква би могла да бъде природата на антимикробните високомолекулни вещества с небелтъчна природа за седем от изследваните от вас щамове?

5. Публикации във връзка с дисертационния труд

Докторантът е представил списък на научните публикации и участия в научни форуми, свързани с темата на дисертационния труд.

Сашо Стояновски има три излезли от печат научни публикации, на 2 от които е първи автор, което показва водещата му роля в изработването на експерименталната част. И трите публикации са в международния журнал “Biotechnology and Biotechnological Equipment”, който има импакт фактор – 0.291 за 2009 г (една от публикациите) и 0.508 за 2010 г за другите две публикации. Г-н Стояновски има 6 участия в научни форуми, четири от които са международни.

Въпреки, че такава информация не е представена, Сашо Стояновски има участия в научни проекти, както такива финансирани от Фонда за научни изследвания на СУ „Св. Кл. Охридски”, така и в инфраструктурен проект, финансиран от Националния фонд за научни изследвания към МОНМ.

6. Автореферат

Авторефератът е изготвен, съобразно изискванията и вярно отразява резултатите от дисертацията като в съкратен вид са представени най-важните неща от всички раздели (без литературния обзор).

7. Придобита компетентност и съответствие с изискванията на образователната и научна степен „доктор”

В хода на изпълнението на експерименталната работа и оформянето на дисертационния труд докторантът Сашо Стояновски е придобил компетенции и умения, които могат да бъдат групирани по следния начин:

- разширил е теоретичната си компетентност в областта на микробиологията, получена в магистърската степен и по-специално в областта на култивирането, характеризирането и идентификацията на млечнокисели бактерии.

- изградил е умения за работа с научна литература, анализирайки и обобщавайки научната информация.

- надградил е методичните си умения, особено в частта на прилагането на молекулни методи за видова идентификация на бактерии.

- придобил е умения самостоятелно да оформя и дискутира резултатите, получени в хода на разработването на дисертацията, както и да прави изводи на базата на тях.

Всичко това ми дава основание да смятам, че той е придобил компетенциите и уменията, които се изискват за придобиване на образователната и научна степен „доктор”.

8. Заключение

Извършването на експерименталната работа, оформянето на дисертационния труд, включващо представянето и дискутирането на резултатите, доброто илюстриране на резултатите ми дават основание да смятам, че в процеса на докторантурата Сашо Стояновски е усвоил теоретични знания и методични умения, напълно съответстващи на тези за третата степен на обучение в Софийски университет „Св. Кл. Охридски” и се е изградил като млад изследовател-микробиолог. Извършено е обширно изследване, в което умело са съчетани подходящи класически и съвременни молекулни методи, което е станало възможно на базата на много добрата му теоретична подготовка. Както посочих по-горе, анализите са дело на докторанта. Дисертационният труд има приносен характер, както в приложен, така и в теоретичен аспект. Направените от мен забележки имат повече технически характер и по-малко се отнасят към същината на работата. Те биха могли да бъдат полезни за бъдещата работа на докторанта.

Въз основа на гореизложеното, както и предвид Правилника за приложение на закона за развитие на академични състав в Република България и този на СУ „Св. Кл. Охридски” считам, че настоящият труд отговаря на изискванията за докторска дисертация и го оценявам положително като препоръчвам на Научното жури да присъди образователната и научна степен „доктор” по научната специалност Микробиология шифър 06.01.12. на г-н Сашо Спасе Стояновски.

15.09.2011 г.

София

Подпис:

(доц. д-р П. Мончева)