



Prof. dr hab. Waldemar Rymowicz
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Jakuba Kiepsia nt. **„Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny jakości preparatów probiotycznych wytwarzanych za pomocą suszenia fluidalnego”**

wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem promotora dr hab. Radosława Dembczyńskiego, w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Niniejsza recenzja została wykonana na zlecenie Pani Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Prof. dr hab. Magdaleny Rudzińskiej zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia z dnia 18 lipca 2023 roku.

1. Podstawowe dane o kandydacie

Mgr inż. Jakuba Kieps ukończył studia inżynierskie na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, na kierunku Biotechnologia w roku 2018. Temat Jego pracy inżynierskiej to „Bioinformatyczna analiza wysp CpG w genomie świni”, która wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Szydłowskiego. W roku 2019 obronił pracę magisterską nt. „Dobór parametrów procesu fluidyzacyjnego suszenia mikroorganizmów” pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Jankowskiego. W roku 2019 rozpoczął studia doktoranckie w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, dyscyplina Technologia żywności i żywienia, które realizował w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem promotora dr hab. Radosława Dembczyńskiego. W czasie studiów był kierownikiem projektów w ramach konkursu „Młoda Kadra 2020 i 2021. Otrzymał stypendium POWER w ramach projektu „Zintegrowany Program Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu na rzecz Innowacyjnej Wielkopolski”. W roku 2023 odbył dwumiesięczny staż naukowy w Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford.

W roku 2023 przygotował pracę doktorską nt. „Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny jakości preparatów probiotycznych wytwarzanych za pomocą suszenia fluidalnego” pod kierunkiem dr hab. Radosława Dembczyńskiego.

2. Ocena zasadności wyboru tematyki rozprawy doktorskiej

Doktorant w swojej pracy przeglądowej Kieps J, Dembczyński R. Current Trends in the Production of Probiotic Formulations. *Foods*. 2022; 11(15):2330, w której wykorzystano 73 pozycje literaturowe, omówił najnowsze trendy w technologiach suszenia i produkcji probiotyków. Jest to wartościowe opracowanie, które wprowadza i omawia najważniejsze zagadnienia dotyczące otrzymywania i charakterystyki utrwalonych preparatów probiotycznych otrzymywanych metodami suszenia. Autor głównie skupił się na bakteriach probiotycznych kwasu mlekowego. W przeglądzie tym, który zdaniem recenzenta należy traktować jako wstęp do pracy doktorskiej, zostały poruszone różne zagadnienia dotyczące utrwalania i uzyskania aktywnych preparatów bakterii probiotycznych i ich



KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOSCI

niekonwencjonalnych aplikacji jak np. spraye do nosa, kremy lub balsamy lub inne zastosowania do produkcji żywności funkcjonalnej, probiotycznej i nutraceutyków. Dużą część wstępu dotyczy suszenia rozpyłowego, sublimacyjnego, próżniowego, czy też nowych metod jak immobilizacja bakterii probiotycznych w nanowłóknach, które są szeroko wykorzystywane w technologii otrzymywania utrwalonych produktów probiotycznych o długim czasie przechowywania i zachowania dobrej żywotności bakterii.

Bardzo szeroko zostały również przedstawione zagadnienia dotyczące czynników stresu, na które są narażone bakterie w czasie suszenia tj. stres odwodnienia, termiczny, mechaniczny, osmotyczny i oksydacyjny lub siły ścinające, deformacja, mechaniczne uszkodzenie struktury komórkowej przez kryształy lodu utworzone podczas procesu, które są uważane za główne przyczyny częściowej utraty żywotności bakterii probiotycznych podczas suszenia różnymi metodami. Doktorant wskazał, że badanie białek i ekspresji genów zaangażowanych w te procesy mogą pozwolić na lepsze zrozumienie reakcji na stres, co pozwoli na lepsze przetrwanie komórek i optymalizację procesów przemysłowych.

Doktorant omówił także bardzo szeroko zagadnienia związane z zapobieganiem czynnikom stresu w czasie suszenia mikroorganizmów probiotycznych, takich jak dodanie substancji ochronnych i przeciwutleniających, właściwy dobór parametrów procesu, czy dostosowanie się komórek bakterii do czynników stresowych przed wysychaniem. Są to ważne elementy wpływające na przetrwanie bakterii probiotycznych bezpośrednio podczas suszenia i podczas ich długoterminowego przechowywania. Zamieszczone w publikacji przeglądowej Tabele 1-3 pokazują te informacje bardzo szczegółowo dla utrwalania różnych bakterii i drożdży probiotycznych metodami suszenia rozpyłowego czy fluidalnego.

W pracy przeglądowej podkreślono i omówiono również wagę przygotowania preparatów probiotycznych, które są w stanie wytrzymać kwaśne środowisko i różne enzymy znajdujące się w przewodzie pokarmowym, zachowując jednocześnie swoje właściwości, żywotność i uwalniania w jelicie.

Bardzo ważnym zagadnieniem poruszonym przez Doktoranta jest zastosowanie klasycznych (np. analiza ilości żywych komórek poprzez wysiew na płytki) i nowoczesnych metod (cytometria przepływową), gdzie możliwa jest rozszerzona ocena ilości żywych, żywych niezdolnych do wzrostu (VBNC), martwych i uszkodzonych komórek bakterii po procesie suszenia.

Autor wskazuje, że w większości opracowań omawiane są procesy utrwalania preparatów probiotycznych metodami suszenia rozpyłowego czy liofilizacji. Wykorzystanie suszenia fluidalnego, które charakteryzuje się prowadzeniem procesu w znacznie niższych temperaturach, posiada bardzo dobre parametry przenoszenia masy i energii oraz niskie koszty inwestycyjne i operacyjne wpływa na coraz większe zainteresowanie tą metodą suszenia, zwłaszcza do utrwalania nowo pozyskanych gatunków bakterii probiotycznych. Połączenie metody suszenia fluidalnego z wykorzystaniem nowoczesnych metod analizy mikrobiologicznej do charakterystyki populacji bakterii jakim jest cytometria przepływową zdaniem Doktoranta umożliwi dokładniejsze scharakteryzowanie preparatu probiotycznego. Badania takie mogą także wzbogacić dyscyplinę technologii żywności i żywienia o nową wiedzę w tym zakresie jak również wskazać potencjał komercyjny takich badań.

Taką problematyką zajął się w swojej pracy doktorskiej mgr inż. Jakub Kieps i uważam, że jest to kierunek nowatorski, oryginalny i mało poznany.

3. Charakterystyka formalnej strony rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska składa się z dwóch części. Część pierwszą (37 stron), stanowi autoreferat, który obejmuje: wykaz dorobku naukowego Doktoranta stanowiący przedmiot rozprawy doktorskiej, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, hipoteza badawcza i



KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

cel badań, metodologia badań z opisem szczepów, materiałów i metod stosowanych podczas realizacji pracy, omówienie wyników i wnioski. a także wykaz literatury źródłowej.

Uważam, że ta część pracy w języku polskim jest bardzo skrócona, metodyka badań, wyniki badań zostały przedstawione w wersji skróconej w stosunku do wyników opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, brak jest dyskusji w tej części pracy. Dopiero wnikliwe przestudiowanie oryginalnych prac pozwala ocenić bardzo wysoko wykorzystanie przez Doktoranta nowoczesnych narzędzi analitycznych i szczegółowy opis stosowanych metod badawczych, opis wyników, merytoryczną dyskusję uzyskanych rezultatów badań i konkluzje podsumowujące zakres badań i uzyskanych wyników.

Część drugą rozprawy stanowi jednolity tematycznie zbiór 4 oryginalnych publikacji naukowych, w tym 1 to praca przeglądowa :

1. Kieps J, Dembczyński R. Current Trends in the Production of Probiotic Formulations. *Foods*. 2022; 11(15):2330. <https://doi.org/10.3390/foods11152330>
IF: 5.2 MEiN2023: 140
2. Kieps J, Juzwa W, Dembczyński R. Imaging Flow Cytometry Demonstrates Physiological and Morphological Diversity within Treated Probiotic Bacteria Groups. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(7):6841.
IF: 5.6 MEiN2023: 140
3. Kieps J, Juzwa W, Olejnik A, Sip A, Tomaszewska-Gras J, Dembczyński R. The Effects of Cellular Membrane Damage on the Long-Term Storage and Adhesion of Probiotic Bacteria in Caco-2 Cell Line. *Nutrients*. 2023; 15(15):3484. IF: 5.9 MEiN2023: 140
4. Kieps J, Olejnik A, Juzwa W, Dembczyński R. Economic analysis of the production process of probiotics based on the biological and physiological parameters of the cells. *Applied Sciences*, 2023, 13, 11541. IF: 2.7 MEiN2023: 140

Wymienione powyżej publikacje zostały opublikowane w renomowanych czasopiśmie znajdujących się w bazie JCR. Ich łączny współczynnik oddziaływania IF oraz liczba punktów MNISW wynoszą odpowiednio 16,7, 420, co świadczy o bardzo dobrym poziomie naukowym przeprowadzonych badań, ocenionych również przez niezależnych recenzentów reprezentujących odpowiednie czasopisma naukowe. Wszystkie publikacje są pracami zespołowymi, a liczba współautorów waha się od 2 do 6. Należy podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem i zgodnie z oświadczeniami pozostałych członków zespołu badawczego Jego udział w ich powstaniu był wiodący. W mojej ocenie udział Doktoranta w poszczególnych pracach jest znaczący i wystarczający do włączenia ich do cyklu publikacji stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Indywidualny wkład pracy Doktoranta w przypadku wszystkich publikacji obejmował: koncepcję pracy, opracowanie metodyki, realizację badań laboratoryjnych, analizę i opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu.

W mojej ocenie załączone publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, merytorycznie odzwierciedlają jej treść i w pełni odpowiadają tytułowi rozprawy doktorskiej.

4. Ocena merytoryczna rozprawy

Na podstawie pracy przeglądowej Doktorant w swoich badaniach sformułował 6 hipotez badawczych i dodatkowo realizował postawione szczegółowe cele badawcze.



KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

Dobrze została opisana metodyka przeprowadzonych badań, które wykorzystane były w publikacjach 2-4. Szczegółowe informacje metodyczne są opisane i dostępne w poszczególnych publikacjach, które są przedmiotem pracy doktorskiej.

W swoich badaniach Doktorant wykorzystał 3 szczepy bakterii fermentacji mlekowej o potencjale probiotycznym i silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych tj.: *Enterococcus faecium* 73KBiMŻ, *Leuconostoc mesenteroides* 5tKBiMŻ i *Carnobacterium divergens* 3cdKBiMŻ.

W pierwszej części badań (publikacja 2) Doktorant ocenił i porównał jakość preparatów probiotycznych, wykorzystując tradycyjną metodę płytkową Kocha i cytometrię przepływową z obrazowaniem. Badał wpływ warunków stresowych oraz warianty suszenia na trzy różne szczepy probiotyczne. Próbkę analizowaną przez cytometrię przepływową zostały następnie dalej posortowane na różne zidentyfikowane grupy: aktywne, martwe, średnio-aktywne I i średnio-aktywne II, określone jako prawdopodobnie żywe, niezdolne do wzrostu o różnym poziomie uszkodzenia błony komórkowej i zróżnicowanej aktywności metabolicznej. Wybrane grupy zostały dodatkowo przeanalizowane przez Doktoranta w celu porównania ich żywotności, aktywności i potencjału probiotycznego oraz porównania ich występowania z metodą liczenia na płytkach metoda Kocha. Bardziej precyzyjne okazały się metody analityczne z wykorzystaniem cytometrii przepływowej z wykorzystaniem RedoxSensor™ Green i jodku propidyny, które mogą rozpoznać zarówno uszkodzenia komórkowe, jak i aktywność metaboliczną komórek. Zastosowanie jednoczesnego zabarwienia wspomnianymi barwnikami ze złożonymi próbkami przedstawiono na Rys.1, gdzie pokazano rozkład wskazujący na cztery fizjologicznie różne subpopulacje. Charakterystykę subpopulacji poszczególnych badanych szczepów probiotycznych w różnych warunkach stresu termicznego, pH, niekontrolowanego pH, preparatów suszonych przedstawiono czytelnie na rys. 3-8. Autor wykazał, że czynniki stresowe odpowiadają za różny stopień uszkodzenia błon komórkowych badanych szczepów bakterii tj. (30 min w 50°C) inny niż w szoku pH (pH 2,5 przez 30 min) w obrębie poszczególnych badanych gatunków bakterii mlekowych. Bakterie *L. mesenteroides* okazały się mniej odporne na stres cieplny, a martwe komórki były najliczniejszą subpopulacją dla tego szczepu. Większość komórek martwych obserwowano przy wstrząsie pH, a aktywne komórki stanowiły nie więcej niż 10% całkowitej liczby komórek. Przeprowadzona analiza subpopulacji bakterii w preparatach probiotycznych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej pozwoliło Doktorantowi na obserwację komórek VBNC i dostarczyło dokładniejszych informacji, na poziomie pojedynczej komórki, znacznie szybciej niż klasyczne metody mikrobiologiczne, które wymagają długiego czasu inkubacji.

W kolejnej publikacji (nr 3) Autor dysertacji przeprowadził badania dotyczące adhezji komórek probiotycznych do ludzkiego nabłonka jelitowego Caco-2 (HTB-37™), jak również przeprowadził analizy trwałości preparatów probiotycznych suszonych w złożu fluidalnym i przechowywanych przez 12 miesięcy w różnych warunkach (modyfikowana atmosfera, trzy warianty temperatury). Dodatkowo analizował za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej i termograwimetrii z różnicową analizą termiczną właściwości termiczne (temperaturę przemiany szklistej - T_g) substancji stosowanych w powlekanii w złożu fluidalnym. Wyznaczał także zakres temperatury denaturacji komórek bakterii probiotycznych. Doktorant wykazał, że tylko komórki aktywne wykazywały zdolność przylegania do całości dostępnej powierzchni linii komórek nabłonkowych Caco-2, co potwierdził za pomocą cytometrii przepływowej z obrazowaniem. Przeprowadzone badania pokazały, że każde, nawet minimalne uszkodzenie błony komórkowej badanych bakterii negatywnie wpływało na zdolność komórki do przylegania do nabłonka, pomimo to mogą wywierać korzystne skutki zdrowotne, pomimo ograniczonej zdolności do adhezji. Proces adhezji jest jednym z głównych czynników odpowiedzialnych



KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

za właściwości probiotyczne bakterii w ludzkim jelicie i ma kluczowe znaczenie dla kolonizacji i utrzymywania się bakterii probiotycznych w przewodzie pokarmowym. Pragnę także podkreślić, że te zagadnienia były także bardzo merytorycznie i wnikliwie dyskutowane przez Doktoranta z uwzględnieniem najnowszych badań z tego zakresu.

Autor dysertacji pokazał, że proces technologiczny suszenia fluidalnego preparatów bakterii probiotycznych i warunki przechowywania wpływają na trwałość preparatu w trakcie długotrwałego przechowywania. Wysuszone preparaty charakteryzowały się zróżnicowaną ilością aktywnych bakterii w czasie przechowywania. Autor pokazał, że preparaty probiotyczne przechowywane przez 12 miesięcy w temperaturze -20°C i w modyfikowanej atmosferze były najlepsze, miały ponad 10^6 jtk./g. Jednak w opinii Doktoranta warunki przechowywania: temperatura 4°C zawierały minimalną liczbę mikroorganizmów na poziomie 10^6 komórek przez 6–9 miesięcy, były łatwiejsze w przechowywaniu, co czyni je potencjalnie lepszym wyborem do celów komercyjnych.

W kolejnych swoich badaniach Doktorant wykazał, że denaturacja białka u bakterii rozpoczynała się w temperaturze od 65 do 70°C , do tego celu zastosował nowoczesną metodę tj. różnicową kalorymetrię skaningową.

W kolejnych badaniach wyznaczył temperaturę przejścia szklanego (T_g) dla próbek pokrytych gumą arabską, HPMC i szelakiem za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej i termogravimetri z różnicową analizą termiczną. Obie analizy termofizyczne wykazały, że substancją powlekaną o najwyższej T_g była HPMC (hydroksypropylometylocelulza), odpowiednio $152,6$ i $156,1^{\circ}\text{C}$. Powyżej tej temperatury krytycznej, opisanej jako temperatura przejścia szklanego materiał suszony znacznie zmienia swoją strukturę ze szklanego stanu stałego na gumową formę, a to może mieć wpływ na właściwości fizykochemiczne produktu i wpływać na rentowność suszonych probiotyków.

Ostatnim etapem pracy Doktoranta (publikacja 4) było zaprojektowanie najkorzystniejszego procesu suszenia fluidalnego na skalę przemysłową i ocenę czynników ekonomicznych z wykorzystaniem oprogramowania SuperPro Designer v13. W schemacie przebiegu procesu suszenia przedstawiono niezbędne etapy i procedury w różnych wariantach suszenia w złożu fluidalnym. Ostateczną liczbę komórek w produkcie ustalono na 10^8 jtk/g, zgodnie z zaleceniami standardów branżowych. Założono jednostkową cenę produktu probiotycznego na poziomie $2,75$ \$/kg. Przygotowano 6 wariantów projektu – dla suszenia bez stresu, z szokiem pH i z szokiem cieplnym oraz analogicznie dla preparatu powlekanego bez stresu, z szokiem pH i szokiem cieplnym.

Przeprowadzono obliczenia ekonomiczne, biorąc pod uwagę koszt surowców, utylizację odpadów, zużycie energii i nośników ciepła, koszt wyposażenia, bezpośredni kapitał trwały oraz opłaty dla wykonawców i koszty awaryjne. Ocena ekonomiczna zawierająca wszystkie wymienione koszty została podsumowana w tabeli 2 publikacji.

Przeprowadzono analizę ekonomiczną w celu zidentyfikowania kluczowych czynników wpływających na koszty produkcji. Czynniki te obejmują koszt podłoża, czas suszenia i koszt trehalozy (substancji ochronnej) i HPMC (substancji powłokowej). Biorąc pod uwagę liczbę bakterii biologicznie aktywnych, subpopulacji – aktywnej I i średnioaktywnej II, proces powlekania oraz obróbkę szokiem cieplnym i stresem pH według Doktoranta okazały się najlepszymi wariantami i były 10 razy tańsze w produkcji niż samo suszenie. Podkreślono również znaczenie obecności w preparacie probiotycznym subpopulacji komórek o pośredniej aktywności metabolicznej (VBNC), które zwiększają ilość korzystnych komórek w takim preparacie.

Tematyka i zakres badań w tej części dysertacji uważam za bardzo ciekawy, atrakcyjny i cenny w przypadku prac o dużym prawdopodobieństwie komercjalizacji badań.



KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

Wykonane prace i uzyskane w nich wyniki badań potwierdziły 6 hipotez, które postawił sobie Doktorant w przedstawionej do oceny dysertacji. Zrealizował również cele swojej pracy. Na końcu Autor przedstawił wnioski, które należy uznać za uzasadnione.

5. Pytania do doktoranta

Do publikacji 2

1. Dlaczego szok termiczny i szok pH przeprowadzono w różnych fazach wzrostu bakterii, stacjonarna i logarytmiczna? Poproszę o komentarz.
2. Na jakiej podstawie podano, że suszenie fluidalne pozwala na uzyskanie preparatu zawierającego rekomendowaną minimalną ilość komórek 10^6 /g preparatu. W publikacji nie ma takiej informacji. Dopiero w publikacji 3 jest taka informacja.

Do publikacji 4

1. Autor pisze, że koszty inwestycyjne i operacyjne suszenia w złożu fluidalnym są niższe niż w przypadku suszenia sublimacyjnego lub rozpyłowego. W takim razie jaką przewagę, zaletę ma suszenie rozpyłowe, które jest głównie wykorzystywane w suszeniu preparatów probiotycznych w skali przemysłowej.
2. Jakie są obecnie średnie ceny preparatów probiotycznych bakterii mlekowych ?
3. Czym się kierowano wybierając bulion MRS jako pożywkę do namnażania biomasy bakterii kwasu mlekowego. Takie podłoże wykorzystuje się głównie w laboratorium mikrobiologicznym. W dużej skali dla każdego mikroorganizmu ustala się bardziej złożone pożywki dające na końcu do 10^{10} j.t.k./g. Proszę o komentarz.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę celowość podjętych wielowątkowych badań, sposób i zakres ich realizacji, nowatorski i aplikacyjny charakter przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. **Jakuba Kiepsia**, stwierdzam, że oceniana praca pt.: „**Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny jakości preparatów probiotycznych wytwarzanych za pomocą suszenia fluidalnego**” w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2003, poz. 1668 ze zm.). Zastosowano w niej szereg nowoczesnych metod badawczych, umiejętnie je dostosowując do potrzeb realizowanych eksperymentów. Badania zostały starannie zaplanowane i przeprowadzone. Zebrane wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty, z wykorzystaniem odpowiednich tabel i rysunków. Dokonano ich właściwego omówienia i interpretacji. Badanie takie wpisują się w światowy trend zwiększania badań w zakresie otrzymywania atrakcyjnych preparatów probiotycznych i wnoszą nową wiedzę w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie mgr inż. **Jakuba Kiepsia** do dalszych



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOSCI

etapów przewidzianych postępowaniem o ubiegania się o stopień doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia

[Handwritten signature]