

Warszawa, 27.11.2024r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Archackiej zatytułowanej  
**„Optymalizacja warunków wzrostu i utrwalania bakterii probiotycznych na  
przykładzie *Lactobacillus plantarum*”**

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, promotorem pracy jest Pan dr hab. Wojciech Białas, prof. UPP.

Rozprzestrzenianie się bakterii wielolekoopornych stanowi istotny problem zdrowia publicznego na świecie, który spowodowany jest w dużym stopniu nieuzasadnionym nadużywaniem antybiotyków, a także ich szerokim stosowaniem w rolnictwie. UE w 2003r. przyjęła rozporządzenie 1831/2003 o dodatkach paszowych, które miało ostatecznie rozwiązać kwestię stosowania antybiotyków jako stymulatorów wzrostu, a wycofywanie antybiotyków używanych jako dodatki paszowe miało nastąpić do dnia 1 stycznia 2006r. Z tego względu rozpoczęto poszukiwania alternatywy dla antybiotyków, a więc innych dodatków paszowych mogących wpływać na zwiększanie przyrostów masy przez zwierzęta, takich jak prebiotyki, probiotyki, enzymy, oligosacharydy, kwasy organiczne.

Działania takie powinny być podejmowane również ze względu na ochroną środowiska naturalnego. Istotne jest kompleksowe podejście do stosowania substancji przeciwbakteryjnych zarówno w terapii ludzi, jak zwierząt, ograniczenie ich używania i poszukiwanie nowych rozwiązań mających za zadanie ich zastąpienie, a tym samym ograniczenie możliwości rozwoju

mikroorganizmów lekoopornych oraz ochronę przyrody.

Dlatego pogłębianie wiedzy i prowadzenie badań dotyczących optymalizacji warunków wzrostu i utrwalania bakterii probiotycznych to zagadnienia aktualnie bardzo potrzebne przede wszystkim w aspekcie praktycznym. W przedłożonej pracy Doktorantka podjęła temat biosyntezy, optymalizacji warunków wzrostu *Lactiplantibacillus plantarum* jako przedstawiciela bakterii probiotycznych, a także ich utrwalanie podczas suszenia. Ponadto, celem pracy jest określenie metod produkcji synbiotyku przy jak najniższych nakładach ekonomicznych z uwzględnieniem analiz techniczno-ekonomicznych zaprojektowanych modeli procesów, optymalizacji składu mieszaniny ochronnej zwiększającej przeżywalność bakterii *L. plantarum* ŁOCK 0860 podczas suszenia rozpyłowego oraz innych czynników.

W związku z tym uważam, że temat badań jest w pełni uzasadniony i uzupełnia zapotrzebowanie na nowe rozwiązania powstałe po zmianie przepisów i wzroście świadomości społecznej.

Realizowana rozprawa doktorska była finansowana w ramach projektu NCBiR nr PBS3/A8/32/2015 „Preparat synbiotyczny do profilaktyki zdrowotnej zwierząt monogastrycznych i zapobiegania wystąpienia chorób bakteryjnych i zatruc pokarmowych wywołanych toksynami oraz poprawiającego bezpieczeństwo żywienia i wydajność chowu zwierząt”, a dokładnie jego dwóch zadań (5, 6).

Oceniana praca doktorska napisana jest na 139 stronach, zawiera 11 tabel, 19 rycin oraz suplement: załączniki w postaci uzupełniających tabel, wykresów i raportów, spis publikacji zawierający 149 pozycji piśmiennictwa oraz dorobek naukowy: listę publikacji oryginalnych, monografii i doniesień konferencyjnych. Wykaz skrótów poprzedza streszczenie, abstrakt w j. angielskim, wstęp, hipotezy i cel pracy, następne rozdziały to materiały i metody, wyniki, kolejno dyskusja, podsumowanie i wnioski, bibliografia oraz spis tabel, wykresów, rycin, fotografii. Proporcje pracy są prawidłowe.

Część teoretyczna: Wstęp jest uporządkowany tematycznie począwszy od ogólnych informacji o

stosowaniu probiotyków, czy synbiotyków jako alternatywy dla antybiotyków używanych jako stymulatory wzrostu zwierząt. Następnie opisane są problemy metodologiczne i ekonomiczne związane z produkcją preparatów probiotycznych i synbiotycznych. Kolejno Doktorantka przedstawia przegląd statystycznych metod doboru składu podłoży hodowlanych i substancji ochronnych oraz kolejno narzędzia stosowane do projektowania i analizy ekonomicznej procesów produkcji preparatów probiotycznych i synbiotycznych. Zamieszczone opisy trafnie przedstawiają zagadnienia, które są badane w pracy i powstały na podstawie przeglądu aktualnych publikacji, które ukazały się w ostatnich kilku latach. Jakość części teoretycznej pracy potwierdza, że Doktorantka gruntownie zna wszystkie zagadnienia.

Rozdział drugi to Hipotezy i cele badań - opisany pierwszy cel: Określenie cech fenotypowych oraz odporności termicznej szczepu *L. plantarum* LOCK 0860 jest raczej etapem pośrednim realizacji badań niż wyodrębnionym celem. Natomiast cel trzeci, jakby dodatkowy uzupełnia zasadniczy temat pracy doktorskiej i bardzo ją wzbogaca.

Rozdział trzeci: Materiały i metody zawiera prawidłowe i jasno opisane stosowane metody badawcze eksperymentalne, takiej jak: utylizację źródeł węgla przez szczep *L. plantarum* LOCK 0860 przy użyciu technologii Phenotype MicroArrays. Jednak nie znaleziono informacji o długości fali przy której dokonano pomiarów absorbancji. Następnie opisane są wgłębne hodowle płynne probówkowe oraz w bioreaktorze (także półstałe), warunki oddzielania biomasy bakteryjnej i supernatantu. W tej części Doktorantka użyła sformułowania „oddzielenia biomasy od podłoża pohodowlanego MRS...” raczej jest to oddzielenie biomasy od supernatantu hodowli. Ponadto, należy zwrócić uwagę, że Doktoranta w całej pracy posługiwała się nieaktualną nazwą drobnoustroju: zamiast *Lactiplantibacillus plantarum* stosowała starą nazwę *Lactobacillus plantarum* (oprócz streszczenia). W nowych opracowaniach należy tego unikać. Kolejno opisana jest zastosowana w pracy nowoczesna metoda obliczeniowa: statystycznego planowania eksperymentu, tj. plan sympleksowo-centroidowy z podaniem w tab. 4 składu poszczególnych mieszanin protektantów. Następnie opisano sposób przygotowania roztworów protektantów i ich

mieszanin z podłożem pohodowlanym (uwaga Recenzenta -jw) oraz szereg zastosowanych w niniejszej pracy metod eksperymentalnych, tj. chromatografia cieczowa wysokociśnieniowa, elektronowa mikroskopia skaningowa. Kolejno opisano stosowane analizy statystyczne (program Design Expert 8.0) do określenia zależności między poszczególnymi zmiennymi w doświadczeniu z różnymi mieszaninami protektantów, analizę wariancji i inne. Symulację procesów produkcyjnych przeprowadzono przy użyciu narzędzia informatycznego - programu SuperPro Designer v10 (Intelligen, USA) wykorzystując jako dane wejściowe do modelowania procesu produkcji preparatu synbiotycznego na skalę przemysłową, wyniki badań laboratoryjnych, z uwzględnieniem niezbędnych zmian wynikających ze zmiany skali. Przeprowadzono również analizę wrażliwości korzystając z programu SuperPro Designer (funkcja Component Object Module).

Doktoranta podczas realizacji pracy zastosowała zarówno proste metody eksperymentalne jak i zaawansowane metody statystyczne i informatyczne. Świadczy to o dobrej znajomości metodologii, nabytym doświadczeniu badawczym jak i kompleksowym podejściu do analizowanych zagadnień.

Prezentacja wyników stanowi najobszerniejszy rozdział pracy. Jest on podzielony na sześć części w których przedstawiono opisy badań w kolejności ich realizacji. Wykazano, że szczep *L. plantarum* ŁOCK 0860 charakteryzuje się zdolnościami do utylizacji wielu mono- i oligosacharydów oraz substratów niewęglowodanowych jako potencjalnych źródeł węgla w podłożach wzrostowych. Wyniki badań inaktywacji termicznej szczepu w temp. 55°C, 60°C, 65°C wskazują na wysoka odporność termiczną szczepu, co jest pożądaną cechą w technologii produkcji utrwalanych termicznie preparatów probiotycznych i synbiotycznych. Zastosowane różne modele predykcyjne wyłoniły jeden najlepiej dopasowany- zmodyfikowany model Weibulla sigmoidalny II. W tym miejscu Doktoranta szczegółowo wyjaśnia efekty ogona i ramienia. Kolejno opisano wyniki badań optymalizacyjnych doboru składu mieszanin ochronnych pozwalających na uzyskanie jak najwyższej przeżywalności bakterii podczas suszenia rozpyłowego w skali laboratoryjnej. Nowo zoptymalizowana mieszanina substancji ochronnych (2,57% glutaminianu

monosodowego, 2,43% trehalozy) ponad 4-krotnie zwiększyła przeżywalność bakterii podczas procesu utrwalania, gdy stosowano podłoże na bazie mąki kukurydzianej. Przeprowadzona wizualizacja cząstek stałych zawartych w próbkach wysuszonych rozpyłowo proszków, przy zastosowaniu mikroskopii skaningowej dokumentuje niemal kulisty kształt cząstek wskazując na odpowiednią twardość użytych substancji wypełniających i ochronnych. Skorzystanie z mikroskopii skaningowej również świadczy o dużej dbałości o szczegóły i wnikliwe potwierdzanie wyników eksperymentów.

Następnie Doktoranta, wykorzystując dane eksperymentalne przedstawia symulację procesu w skali przemysłowej, gdzie zoptymalizowany skład preparatu probiotycznego uzupełniono inuliną, zastosowaną jako prebiotyk i środek standaryzujący liczbę żywych komórek bakterii probiotycznym na gram produktu. Zaproponowaną technologię porównano ze standardowym procesem produkcji, bazującym na wykorzystaniu do wzrostu bakterii probiotycznych podłoża płynnego (MRS). Analiza techniczno-ekonomiczna zaprojektowanych modeli procesu wskazała na wysoką wartość wskaźnika NPV w przypadku technologii opartej na zastosowaniu podłoża z mąką kukurydzianą oraz nieopłacalności inwestycji z zastosowaniem podłoża płynnego (MRS). W przeprowadzonej analizie wrażliwości Doktorantka oszacowała wrażliwość jednostkowego kosztu produkcji i liczby wytworzonych partii rocznie na czynniki krytyczne, którymi są: koszt zakupu inuliny oraz czas fermentacji w bioreaktorze produkcyjnym (model procesu CF). Na podkreślenie zasługuje fakt ukierunkowania na zastosowanie wyników przedstawionej do recenzji pracy w praktyce. Stanowi to bardzo istotny i od kilku lat promowany aspekt badań naukowych. Ponadto, część opisanych wyników badań została już oceniona przez niezależnych ekspertów, gdyż zostały opublikowane w anglojęzycznym artykule z IF, stawiających autorom wysokie wymagania. Fakt ten potwierdza duże znaczenie naukowe dysertacji, co znacznie ułatwia zadanie recenzentowi.

Piąta część rozprawy: Dyskusja jest opisana trafnie i dojrzałe. Doktorantka omawia uzyskane wyniki odnosząc się wnikliwie do dostępnych danych i informacji zawartych w publikacjach naukowych innych badaczy. Ponadto, cenne jest umieszczenie naukowych podstaw i uzasadnień merytorycznych otrzymanych rezultatów. Świadczy to o dobrym przygotowaniu teoretycznym

Doktorantki i swobodnym poruszaniu się w zakresie tematu rozprawy oraz umiejętności interpretacji wyników.

Rozdział szósty rozprawy: Podsumowanie i wnioski odpowiadają założeniom i postawionym celom. Jedynie, pewien niedosyt budzi brak końcowego wniosku, który zeebrały całość uzyskanych informacji, wyników badań i wskazał propozycję działań na przyszłość.

Kolejną część rozprawy zatytułowaną: Literatura proponowałabym zastąpić określeniem: Spis publikacji, lub Bibliografia.

Przedłożona rozprawa doktorska jest napisana przejrzystie i poprawną polszczyzną. Zawiera obszerny i ciekawy materiał doświadczalny, została zaplanowana prawidłowo i właściwie przeprowadzona pod względem metodycznym, dotyczy wysoce aktualnych zagadnień i badań szczególnie pod względem aplikacyjnymi i wdrożeniowym praktycznym wnosi elementy nowości w zakresie omawianej tematyki. Doktorantka zrealizowała postawione cele. Zastosowała zaawansowane, nowoczesne metody statystyczne i komputerowe oraz wykazała się dojrzałością naukową. Otrzymane wyniki jako element większej całości mają potencjał aplikacyjny, a ich docelowe zastosowanie może przyczynić się do obniżenia kosztów procesu produkcji synbiotyku. Dlatego chciałam zapytać, czy podjęto dalsze działania, np. wdrożeniowe, aby wykorzystać przeprowadzone analizy i symulacje? Czy uczelnia podejmuje rozmowy z przedsiębiorcami?

Tematyka pracy wpisuje się w nowoczesne trendy w nauce uwzględniające aspekt ekologiczny, prozdrowotne zamienniki antybiotyków takie jak probiotyki, synbiotyki. Rozprawa zawiera oryginalne rozwiązanie w zakresie potencjalnego zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej.

Doktorantka w swoim dorobku naukowym ma 3 publikacje oryginalne w czasopiśmie z wykazu ministra z IF o łącznym IF=13,980 oraz 440 pkt MNiSW. W dwóch z nich jest pierwszym autorem, ponadto jest współautorem monografii oraz 7 doniesień na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marty Archackiej „Optymalizacja warunków wzrostu i utrwalania bakterii probiotycznych na przykładzie *Lactobacillus plantarum*” spełnia warunki określone przepisami art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawa o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2022r. poz. 574 ze zm.). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia UP w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Archackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n med. Jolanta Solecka, prof. NIZP PZH-PIB



