



Lublin, dn. 05.11.2024 r.

Prof. dr hab. Adrian Wiater
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Marty Archackiej

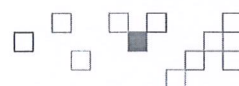
pt. „Optymalizacja warunków wzrostu i utrwalania bakterii probiotycznych na przykładzie *Lactobacillus plantarum*” wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem Prof. UPP dr hab. Wojciecha Białasa

Podstawa formalna opracowania recenzji

Formalną podstawą opracowania recenzji jest pismo Pana Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Profesora dr hab. Pawła Cyplika, z dnia 2 października 2024 r. wraz z umową. Promotorem rozprawy doktorskiej jest Pan Prof. UPP dr hab. Wojciech Białas. Rozprawa mieści się w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Ocena istotności i celowości podjętego tematu

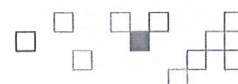
Antybiotykoterapia stosowana u ludzi i zwierząt, poza swoimi pozytywnymi aspektami, niesie również liczne zagrożenia w postaci nabywania przez bakterie antybiotykooporności czy groźby „powstania” superbakterii. Dlatego, liczne kraje prowadzą prace legislacyjne związane z zakazem stosowania antybiotyków jako ASW (Antybiotykowych Stymulatorów Wzrostu). Poza pracami ustawodawczymi, prowadzone są również badania nad poszukiwaniem alternatywnych zamienników antybiotyków. Do takich preparatów należą mikroorganizmy, wykazujące



właściwości probiotyczne lub po połączeniu z selektywnym prebiotykiem, preparaty synbiotyczne. Produkcja preparatów pro- lub synbiotycznych na dużą skalę, związana jest z licznymi problemami natury technologicznej, typu: wybór tanich i bezpiecznych podłoży hodowlanych, dobór sposobów suszenia mikroorganizmów czy zastosowanie odpowiednich protektantów. W tym kontekście tematyka badań, którą podjęła Doktorantka wydaje się niezmiernie ciekawa i istotna. Stanowi ona uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat prezentowanych zagadnień, a dodatkowo wpisuje się w promowaną obecnie zasadę „zero waste”, poprzez możliwe wykorzystanie preparatów odpadowych z przemysłu młynarskiego do przygotowywania podłoży hodowlanych. Należy podkreślić, że założone cele badawcze recenzowanej pracy były złożone i prowadzone wielopłaszczyznowo. Realizowano je w oparciu o różne techniki mikrobiologiczne, narzędzia statystyczne oraz analizy techniczno-ekonomiczne. Proponowane przez Doktorantkę rozwiązania, mogą okazać się bardzo przydatne z punktu widzenia technologicznego produkcji preparatów, opartych o mikroorganizmy stosowane w żywieniu zwierząt. Z powyższych powodów uważam, że temat badań wybrany przez Panią mgr inż. Martę Archacką jest jak najbardziej zasadny i wpisuje się w obecne trendy naukowe.

Ocena strony formalnej pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i posiada format charakterystyczny dla tego typu prac, czyli monografii. Recenzowana rozprawa napisana jest poprawnym językiem, układ i struktura pracy jest prawidłowa. Praca jest również dobrze przygotowana od strony edycyjnej. Niemniej jednak Doktorantce zdarzają się błędy edytorskie oraz językowe, m. in. gramatyczne, interpunkcyjne czy stylistyczne. Dysertacja obejmuje 139 stron i składa się z wykazu stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, 6 rozdziałów, literatury, wykazu tabel, wykazu rycin, załączników i dorobku naukowego Doktorantki. Tytuł recenzowanej rozprawy doktorskiej dobrze odzwierciedla zasadniczy cel pracy, jakim było otrzymanie aktywnego i relatywnie taniego preparatu synbiotycznego. W monografii zamieszczono 11 tabel, 19 rycin oraz 7 załączników, na które składają się wykresy, zdjęcia oraz wizualizacje stanowiące opracowania własne, dokumentujące wykonane badania. W pracy zacytowano 149 pozycji literaturowych, z których 33 (22,1%) zostały opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat, natomiast 78 (52,3%) w ciągu ostatnich 10 lat, co świadczy o

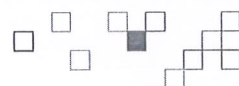


wykorzystaniu najnowszych doniesień z omawianej tematyki. Wstęp pracy jest przejrzysty, syntetyczny i bezpośrednio powiązany z tematem oraz celem badań. Omówienie wyników badań i dyskusja stanowią dwa oddzielne rozdziały, które świadczą o dużej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki. Niemniej jednak, Doktorantce zdarzają się drobne błędy edytorskie oraz językowe (m. in. stylistyczne i interpunkcyjne), co w żaden sposób nie umniejsza merytorycznej wartości ocenianej pracy. Podsumowując, recenzowana rozprawa spełnia wymagania formalne stawiane pracom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska autorstwa mgr inż. Marty Archackiej, dotyczy doboru optymalnych warunków otrzymywania preparatu synbiotycznego, dedykowanego dla zwierząt monogastrycznych, na przykładzie bakterii *Lactiplantibacillus plantarum* ŁOCK 0860. Przeprowadzone badania były realizowane w oparciu o projekt badawczy Programu Badań Stosowanych (PBS3/A8/32/2015, pt. „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”), finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBR), w którym Doktorantka była wykonawcą.

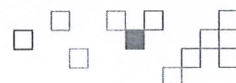
Zaprezentowany na początku Rozprawy doktorskiej Wstęp, liczy 13 stron i bardzo dobrze wprowadza w tematykę pracy. Lektura tego rozdziału, pozwala na szybkie zorientowanie się w zakresie opracowania oraz celowości podjętych badań. Autorka podzieliła ten rozdział na cztery podrozdziały, które przygotowała w oparciu o liczne pozycje literatury, w większości opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Doktorantka porusza we Wstępie wiele tematów, które bezpośrednio dotyczą Jej pracy, tj. odniosła się do probiotyków w aspekcie ich wykorzystania jako aktywny substytut antybiotyków stosowanych w żywieniu zwierząt, ponadto opisała najczęstsze problemy związane z produkcją preparatów prebiotycznych oraz synbiotycznych, jednocześnie podając alternatywne sposoby ich rozwiązywania, m. in. dobór odpowiednich metod suszenia mikroorganizmów, wybór substancji ochronnych czy sposoby obniżenia kosztów produkcji. W kontekście aspektu technologicznego



otrzymywania preparatów probiotycznych i synbiotycznych, bardzo wartościowe informacje Autorka przedstawia w drugiej części rozdziału, gdzie opisuje statystyczne metody stosowane do opracowywania składu podłoży hodowlanych i doboru substancji ochronnych, a także narzędzia wykorzystywane do projektowania i analizy ekonomicznej procesów produkcji. Podsumowując tę część pracy uważam, że treść przeglądu literaturowego wskazuje na rozległą wiedzę Pani Marty Archackiej z przedmiotowego tematu oraz doskonałe przygotowanie merytoryczne do realizacji zamierzonych badań. Nieliczne błędy językowe i edytorskie nie umniejszają wartości merytorycznej tej części rozprawy. Jedyne uwagi jakie mam do Autorki, to zbyt skrótowe opracowanie tego rozdziału, moim zdaniem brakuje również podrozdziału dotyczącego dokładniejszej definicji prebiotyków, probiotyków, synbiotyków i postbiotyków oraz elementów graficznych, które znacznie wzbogaciłyby zaprezentowany przegląd literatury.

Hipotezy i cele badań przedstawione przez Autorkę zostały sformułowane poprawnie i odzwierciedlają przeprowadzone badania, jednak wymagają pewnego przereklamowania, np. kolejność poszczególnych hipotez powinna odpowiadać chronologii wykonywanych doświadczeń, a ponadto pierwsza z hipotez wymaga gruntownej rewizji, gdyż nie jest w pełni zrozumiała dla czytelnika.

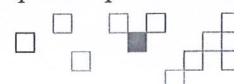
Rozdział „Materiały i metody” został napisany syntetycznie z uwzględnieniem wszystkich szczegółów pozwalających na zrozumienie i powtórzenie prowadzonych eksperymentów. Autorka precyzyjnie opisała poszczególne metody stosowane na kolejnych etapach realizacji swojej pracy doktorskiej. W pierwszej części odnosząc się do charakterystyki materiału biologicznego, składu użytych podłoży oraz sposobów prowadzenia hodowli mikroorganizmów, a następnie procesu suszenia rozpyłowego i jego optymalizacji. Ostatnie dwa podrozdziały „Materiałów i metod” to opis przeprowadzonych symulacji produkcji proszku synbiotycznego zawierającego *L. plantarum* ŁOCK 0860, które dostarczyły szczegółowych informacji na temat przebiegu procesu, szacunkowych kosztów kapitałowych i operacyjnych oraz analizy rentowności, a także szczegółowych analiz wrażliwości. W mojej opinii dobór metod oraz sposób ich wykorzystania jest prawidłowy. Należy podkreślić, że Doktorantka wykorzystywała w trakcie realizacji zadań badawczych cały wachlarz narzędzi, począwszy od podstawowych technik mikrobiologicznych po zaawansowane metody symulacji komputerowych, co świadczy o jej dojrzałości badawczej oraz wszechstronności, która daje



możliwość spojrzenia na dany problem z różnych perspektyw. Ponadto, dużym plusem jest fakt, że Doktoranka uwiarygadnia probiotyczne właściwości użytego szczepu, wskazując publikację, która to dokumentuje. Po lekturze tego rozdziału mam jednak kilka pytań i uwag:

- Autorka tylko raz, w Streszczeniu, użyła właściwej nazwy wykorzystywanego mikroorganizmu, tj. *Lactiplantibacillus plantarum*, później używa starej nazwy *Lactobacillus plantarum*. Moim zdaniem należy używać tylko nowej nomenklatury.
- Doktoranka pisze: „...przygotowano stocki glicerolowe...”, nie określając stężenia glicerolu.
- W tytule podrozdziału 3.2., Autorka pisze „Określenie możliwości utylizacji różnych źródeł węgla przez szczep”, powinna być tu podana nazwa konkretnego mikroorganizmu. Ponadto, w tym samym podrozdziale jest stwierdzenie: „...zmierzono intensywność barwy...”, trzeba podać długość fali, przy której dokonano pomiaru.
- W podrozdziale 3.3., opisano hodowle probówkowe *L. plantarum* ŁOCK 0860. Ten szczep wymaga beztlenowych warunków hodowli, których tu nie zastosowano. Proszę to wyjaśnić. Ponadto, w tym samym podrozdziale Autorka używa stwierdzenia: „W tym celu 1 ml szczepu...”, rozumiem że jest to slang laboratoryjny, jednak w pracy naukowej jaką jest rozprawa doktorska nie należy używać takich sformułowań. Powinno być, np. „zawiesiny komórek”.
- Podobnie w podrozdziale 3.4., Doktoranka używa stwierdzenia: „...100 µl komórek...”, powinno być „...100 µl zawiesiny komórek...”.
- Autorka powinna ujednolicić w całym rozdziale zapis czasu, tzn. godzina lub h.
- Podrozdział 3.5. Proszę wyjaśnić różnice w ilości użytego innokulum bakterii do zaszczepienia podłoża CF i MRS.
- Podrozdział 3.6. Proszę wyjaśnić tak długi czas wirowania biomasy komórkowej (czyli 45 min) oraz w czym ponownie zawieszono odwirowaną biomasę?
- Podrozdział 3.7. Jest: „Całkowita zawartość substancji w mieszaninie stanowiła zatem 15% (w/w).” Powinno być: „Całkowita zawartość protektantów w mieszaninie stanowiła zatem 15% (w/w).”
- Tytuł podrozdziału 3.8. brzmi: „Przygotowanie roztworów protektantów i ich mieszanin z podłożem pohodowlanym lub przemytą biomasą bakteryjną”, powinno być z płynem lub cieczą pohodowlaną.
- Podrozdział 3.11. Autorka pisze: „W tym celu 1 g preparatu przeniesiono do sterylnego naczynia zawierającego 99 ml roztworu soli fizjologicznej (0,85% NaCl) i umieszczono w łaźni wodnej z wytrząsaniem na 45 min (35°C), uzyskując 100-krotne rozcieńczenie.”, zgodzę się z tym stwierdzeniem jeżeli 1 g odpowiada objętości 1 ml. Proszę to wyjaśnić.
- Podrozdział 3.13. Proszę wyjaśnić w jaki celu oznaczano zawartość kwasu mlekowego w odwirowanej i przemytej biomacie bakteryjnej, a nie w płynie pohodowlanym?

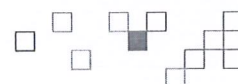
Przeprowadzone badania i ich odniesienie do obecnego stanu wiedzy zostały przedstawione w dwóch oddzielnych rozdziałach, „Wyniki” oraz „Dyskusja”. Rozdział „Wyniki”, Doktoranka podzieliła na sześć podrozdziałów, zgodnie z chronologią wykonywanych badań. W pierwszym, „Określenie cech fenotypowych szczepu *L. plantarum*



ŁOCK 0860 – profil wykorzystania różnych źródeł węgla”, który był punktem wyjścia zaplanowanych badań, Autorka oceniła utylizację substratów stanowiących potencjalne źródło węgla dla bakterii *L. plantarum* ŁOCK 0860. Przeprowadzone testy PM (Phenotype MicroArrays) wykazały, że badany szczep posiada zdolność do wykorzystania wielu z użytych mono- i oligosacharydów oraz substratów niewęglowodanowych jako źródeł węgla, co jak wskazuje Doktorantka może być przydatne w trakcie optymalizacji składu podłoży wzrostowych i produkcyjnych. I tutaj mam pytanie do Autorki, jaki poza aspektem poznawczym, był cel tego badania, ponieważ nie znalazłem żadnego odniesienia otrzymanych wyników w dalszej części pracy.

Kolejnym etapem pracy było „*Badanie odporności termicznej szczepu oraz dopasowanie danych eksperymentalnych do modelowej krzywej inaktywacji*”, w którym wykorzystano wybrane nielogarytmiczne modele matematyczne do oceny trafności opisu eksperymentalnej inaktywacji badanych bakterii w każdym z testowanych wariantów temperatury. Autorka na podstawie uzyskanych danych wybrała zmodyfikowany model Weibulla – model sigmoidalny II, który charakteryzował się najlepszym poziomem dopasowania. Poza tym, co jest godne podkreślenia, Doktorantka wyjaśnia obecność charakterystycznych odchyłeń w tym modelu, tj. efektu „ramienia” i „ogona”, które są często obserwowanym zjawiskiem w opisie krzywych inaktywacji drobnoustrojów.

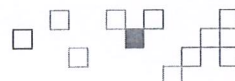
W podrozdziale „*Optymalizacja składu mieszaniny protektantów oraz przeżywalność bakterii L. plantarum ŁOCK 0860 po procesie suszenia rozpyłowego*”, przeprowadzono ocenę wpływu poszczególnych komponentów na właściwości ochronne badanych mieszanin protektantów. W tym celu przeprowadzono analizę regresji wielokrotnej, która wykazała, że wszystkie składniki mieszanin ochronnych (tj. trehaloza, odtłuszczone mleko w proszku i glutaminian monosodowy), istotnie wpłynęły na żywotność komórek. W zależności od składu mieszaniny zawierającej substancje ochronne, przeżywalność bakterii *L. plantarum* ŁOCK 0860, po procesie suszenia rozpyłowego wyniosła odpowiednio od 2,1 do 8,9% i od 9,6 do 70,0%, w przypadku strategii bazującej na wykorzystaniu podłoża hodowlanego CF i MRS. Przedstawione badania dotyczą suszenia rozpyłowego. Czy Doktorantka prowadziła jakieś badania porównawcze z użyciem innych metod suszenia preparatów probiotycznych na bazie *L. plantarum* ŁOCK 0860, np. liofilizacji czy suszenia fluidalnego?



Podrozdział „*Morfologia i wielkość cząstek w otrzymanych proszkach*”, zawiera analizę zdjęć ze skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), które prezentowały cząstki stałe zawarte w wybranych próbkach wysuszonych rozpyłowo proszków. Autorka wykazała tu, że proszki wytworzone wg strategii CF cechowały się szerokim rozkładem wielkości, a poza tym proszki wysuszone z dodatkiem zoptymalizowanej mieszaniny ochronnej charakteryzowały się niemal kulistym kształtem cząstek, bez złamań i pęknięć na ich powierzchni, co wskazuje na odpowiednią twardość zastosowanych substancji wypełniających i ochronnych.

Dwa ostatnie podrozdziały to najbardziej wartościowa i unikatowa część pracy. W podrozdziale „*Symulacja procesu w skali przemysłowej*”, Autorka przedstawia symulację całego procesu technologicznego produkcji preparatu synbiotycznego z wykorzystaniem probiotycznych bakterii *L. plantarum* LOCK 0860 i prebiotyku w postaci inuliny w dwóch wariantach, tj. hodowli w podłożu CF oraz MRS. Doktorantka zaczyna swój opis od bakterii zabezpieczonych w formie fiolek CRYOBANK®, a kończy na symulacji możliwości produkcyjnych zakładu w przypadku hodowli bakterii w różnych podłożach. Dodatkowo, Autorka przedstawia roczne koszty operacyjne w przypadku modelu procesu CF i MRS oraz analizę ekonomiczną tych procesów. W ostatnim podrozdziale „*Analiza wrażliwości – niepewność danych szacunkowych*”, Autorka przeprowadził analizę wrażliwości, która umożliwia ocenę opłacalności inwestycji w przypadku odchyłeń różnych parametrów uwzględnionych w projekcie. Warto zaznaczyć, że problem został zbadany dogłębnie ponieważ przedstawiono wszystkie możliwe scenariusze, tj. optymistyczny, bazowy i pesymistyczny. Na podstawie założonej niepewności danych szacunkowych wyliczono wrażliwość jednostkowego kosztu wytwarzania produktu - UPC (*unit production cost*) oraz liczby cykli produkcyjnych w roku - NBY (*number of batches per year*). Dwa ostatnie podrozdziały wskazują na duży potencjał badawczy Doktorantki i Jej umiejętność zastosowania swojej wiedzy laboratoryjnej w praktyce przemysłowej. Odnośnie dwóch ostatnich podrozdziałów mam kilka pytań:

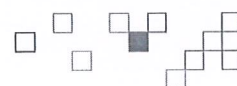
- Czy sprawdzano założenia teoretyczne określone w Pani pracy dla któregoś z podłoży w warunkach rzeczywistych?
- Jako substancję prebiotyczną w nowym synbiotyku proponuje Pani inulinę. Czy były prowadzone jakieś prace, które potwierdziłyby że *L. plantarum* LOCK 0860 jest aktywny w obecności tego prebiotyku oraz czy były brane pod uwagę inne prebiotyki?



Po opisanie badań wykonanych w trakcie realizacji recenzowanej pracy, Autorka w rozdziale „Dyskusja” interpretuje uzyskane wyniki w świetle dostępnych danych literaturowych. Dyskusja jest prowadzona dojrzałe i rzeczowo i została napisana w sposób wskazujący na dużą wiedzę merytoryczną Doktorantki. Autorka nawiązuje w niej, zarówno do wyników podobnych prac, prowadzonych przez innych badaczy, jak i krytycznie odnosi się do własnych doświadczeń, przedstawiając również własne hipotezy i rozwiązania, co pozwala czytelnikowi na właściwą i obiektywną ocenę uzyskanych rezultatów. Analiza tego rozdziału pozwala stwierdzić, że dysertacja zawiera wiele wyników o wysokiej wartości naukowej i na bardzo dobrym poziomie merytorycznym.

Ostatnim rozdziałem rozprawy jest „Podsumowanie i wnioski”, który stanowi kompleksowe i syntetyczne podsumowanie uzyskanych wyników. Doktorantka przedstawiła krótkie podsumowanie i 9 szczegółowych wniosków uwypuklających najważniejsze wyniki uzyskane w pracy. Przedstawione wnioski są zgodne z celami szczegółowymi opisanymi w rozdziale „Hipotezy i cele badań”. Jednak mam pewną uwagę do Doktorantki, która dotyczy podsumowania, ponieważ uważam że jest to jeden ze słabszych punktów recenzowanej pracy. Otóż, podsumowanie to „esencja” całej pracy i powinno stanowić krótki, syntetyczny opis najważniejszych wyników otrzymanych w pracy, a nie informacji teoretycznych z badanego tematu.

Podsumowując, stwierdzam, że treść recenzowanej pracy odpowiada tytułowi a sposób jej zredagowania oceniam dobrze. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę stanowią nowoczesny i oryginalny wkład w rozwój szeroko pojętych nauk z zakresu technologii żywności i żywienia. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną oraz posiadaniem umiejętności samodzielnego prowadzenia eksperymentów naukowych i prawidłowego interpretowania wyników. Wobec szerokiego zakresu prezentowanych badań i bardzo wartościowych wyników, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, przedstawione powyżej krytyczne uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Archackiej.



Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marty Archackiej stanowi istotny wkład w rozwój nauk związanych z technologią żywności i żywienia. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną oraz posiadaniem umiejętności samodzielnego prowadzenia eksperymentów naukowych i prawidłowego interpretowania wyników. Należy również podkreślić wiodący udział Doktorantki w opublikowanych pozycjach naukowych, wskazanych w *Wykazie osiągnięć naukowych* oraz jej wkład w prace zespołu realizującego projekt badawczy NCBiR, co wskazuje na duży potencjał naukowy Pani mgr inż. Marty Archackiej. Na szczególne wyróżnienie zasługuje również fakt, że badania przeprowadzone w trakcie realizacji pracy doktorskiej, doprowadziły do opracowania technologii produkcji nowego preparatu synbiotycznego.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska Pani mgr inż. Marty Archackiej, pt. „Optymalizacja warunków wzrostu i utrwalania bakterii probiotycznych na przykładzie *Lactobacillus plantarum*”, spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Archackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Adrian Wiater

Wiater Adrian

