



# Politechnika Łódzka

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Łódź, dn. 05-11-2023r.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Klewicka  
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Jakuba Kiepsia**

**z tytułu**

**„Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny jakości preparatów  
probiotycznych wytwarzanych za pomocą suszenia fluidalnego”,**

**wykonanej pod kierunkiem dr hab. Radosława Dembczyńskiego  
na Wydziale Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytetu Przyrodniczego  
w Poznaniu.**

## Dane o Kandydacie

Pan mgr inż. Jakub Kieps tytuł zawodowy inżyniera uzyskał w 2018 roku na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Kształcenie swoje kontynuował na tej samej Uczelni, na kierunku Biotechnologia. Obrona pracy magisterskiej zatytułowanej „Dobór parametrów procesu fluidyzacyjnego suszenia mikroorganizmów” miała miejsce w 2019 roku. W tym samym roku Pan mgr inż. Jakub Kieps rozpoczął studia w Szkole Doktorskiej na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Podczas prowadzenia projektu doktorskiego Kandydat zrealizował dwa projekty w ramach konkursu „Młoda Kadra”. W ramach projektu „Zintegrowany Program Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu na rzecz innowacyjnej Wielkopolski”. Pan Jakub Kieps odbył miesięczny staż naukowy w Oksfordzie w Sir William Dunn School of Pathology w University of Oxford gdzie rozwijał swoją wiedzę i umiejętności w zakresie badań z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

W dołączonym wykazie osiągnięć naukowych Doktorant wykazuje 3 publikacje (faktycznie są 4 – jedna publikacja ukazała się już po złożeniu dokumentów do procedowania) – wszystkie z listy JCR, 1 rozdział w monografii i 4 wystąpienia na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych.

**Z przekazanych dokumentów wynika, że Kandydat wcześniej nie ubiegał się o stopień doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia ani w innej dyscyplinie.**

### **Ocena formalna pracy**

Przedstawiona do oceny praca składa się z 4 publikacji anglojęzycznych opublikowanych w latach 2022-2023. W złożonym cyku publikacji 1 publikacja jest opracowaniem teoretycznym natomiast 3 pozostałe publikacje są opracowaniami oryginalnymi. Prace opublikowano w czasopiśmie recenzowanym o współczynniku oddziaływania *Impact Factor* od 2,7 do 5,9 i ministerialnej aktualnej punktacji: 100 punktów 1 publikacja i 140 punktów – 3 publikacje, natomiast biorąc pod uwagę punkty ministerialne za rok opublikowania to przedział punktowy jest następujący 70, 100, 140, 140. Dodatkowo publikacje opatrzone są tzw. komentarzem zawartym na 37 stronach przygotowanym w języku polskim. Komentarz składa się z typowych dla opracowań naukowych elementów: wprowadzenia teoretycznego, hipotez badawczych, metodologii, omówienia wyników, wniosków, literatury.

Do dokumentacji dołączono oświadczenia autorów publikacji, z których wyłania się wiodący udział Doktoranta w takich elementach składowych jak: współautorstwo koncepcji, dobór metodyki, przeprowadzenie badań, analiza wyników, zarządzanie danymi, przygotowanie manuskryptu, pozyskiwanie finansowania.

Dobór literatury zacytowany w prezentowanych publikacjach jest właściwy i odzwierciedla najnowsze osiągnięcia wiedzy w prezentowanej tematyce.

**Prezentacja osiągnięcia doktorskiego w takim układzie jest typowa dla cyklu publikacji i spełnia wymagania ustawowe dotyczące osiągnięcia w przewodzie doktorskim.**

### **Dobór i znaczenie tematyki**

Ważnym elementem podczas otrzymywania preparatów probiotycznych zawierających żywe mikroorganizmy (bakterie, drożdże) jest ich formułacja. Podczas otrzymywania i opracowywania formułacji preparatów probiotycznych jednym

z krytycznych etapów technologicznych jest sposób utrwalania tak aby zachować jak najwyższą żywotność i liczebność mikroorganizmów. Ponieważ żywotność mikroorganizmów w takich preparatach nie zawsze pokrywa się z ich liczebnością co wynika z przechodzenia mikroorganizmów w stan tzw. żywy ale nie hodowlany. Ważnym aspektem jest ocena możliwości aktywnego oddziaływania probiotycznego tych komórek na organizm gospodarza. Najczęściej do tego typu preparatów stosuje się liofilizację, natomiast jest to metoda stosunkowo droga i mało wydajna. Inną metodą jest suszenie rozpyłowe, niemniej temperatura stosowana w tego typu procesach 60-70°C jest temperaturą zbyt wysoką aby utrzymać wysoką przeżywalność żywych czynników biologicznych. W ocenianej rozprawie zaproponowano zastosowanie suszenia fluidalnego. Suszenie fluidalne zapewnia intensywne mieszanie produktu z gazem, które gwarantuje wysoką wymianę ciepła i optymalną prędkość procesów fizycznych, ponadto odbywa się w znacznie niższej temperaturze (około 40°C) niż suszenie rozpyłowe. Dodatkowo suszenie fluidalne daje możliwość powlekania substancjami ochronnymi i stabilizującymi żywotność suszonych mikroorganizmów przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Przedstawione w pracy rozwiązanie technologiczne zawiera elementy nowatorskie polegające na projekcie technologicznym uwzględniając aspekt naukowy - fizjologiczne aspekty suszonych czynników biologicznych. **Zatem, tematyka dysertacji jest jak najbardziej aktualna i wpisuje się w nurt badań prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia. Ponadto wnosi do wiedzy z zakresu tej dyscypliny nowe informacje dotyczące przedmiotu badań ale również proponuje rozwiązanie aplikacyjne dla przedsiębiorców sektora farmaceutycznego, spożywczego czy paszowego.**

### **Ocena merytoryczna pracy**

Przystępując do badań Doktorant dokonuje przeglądu literatury dotyczącego suszenia, i oceny ich właściwości probiotycznych ze szczególnym uwzględnieniem warunków przetwarzania tych mikroorganizmów i środków ochronnych wpływających na ich żywotność. Omawia również czynniki, które mogą mieć wpływ na ich stabilność – procesy termiczne, osmotyczne, oksydacyjne czy działanie niskiego pH środowiska. Przeglądu literatury dokonano w oparciu o literaturę z lat 2005-2023 z czego 28% publikacji stanowią prace z ostatnich 3 lat, a 63% to prace z ostatnich 10 lat. Udział prac starszych niż 10 lat to zaledwie 14%. Można zatem stwierdzić, że Doktorant dokonał rzetelnego przeglądu piśmiennictwa w omawianym temacie. Znajomość literatury

i problemów badawczych rozwiązywanych przez innych autorów pozwoliła Doktorantowi wytyczyć cel pracy i sformułować 6 hipotez badawczych:

**„H.1:** Cytometria przepływowa z obrazowaniem pozwala na podział komórek na subpopulacje o zróżnicowanym stanie fizjologicznym (aktywność metaboliczna) i morfologii (stopień uszkodzeń błony komórkowej).

**H.2:** Suszenie fluidalne pozwala na uzyskanie preparatu zawierającego rekomendowaną dawkę komórek probiotycznych – na minimalnym poziomie  $10^6$  komórek na gram preparatu.

**H.3:** Stopień uszkodzeń błony komórkowej istotnie wpływa na zdolność adhezji bakterii probiotycznych do komórek nabłonka jelitowego.

**H.4:** Zastosowanie warunków stresowych w trakcie hodowli bakterii pozwala na zwiększenie przeżywalności komórek w preparacie probiotycznym w trakcie jego utrwalania i przechowywania.

**H.5:** Proces technologiczny i warunki przechowywania wpływają na trwałość preparatu w trakcie długotrwałego przechowywania.

**H.6:** Realne oszacowanie kosztu wytworzenia preparatu probiotycznego wymaga uwzględnienia trawienia”.

Do realizacji badań wybrano 3 szczepy środowiskowe: *Enterococcus faecium*73 KBiMŻ, *Leuconostoc mesenteroides* 5tKBiMŻ *Carnobacterium divergens* 3cdKBiMŻ zdeponowane w kolekcji Czystych Kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Pierwsze dwa wymienione szczepy zostały wyizolowane z żywności, odpowiednio z gołki owczej otrzymanej metodami tradycyjnymi natomiast szczep *C. divergens* 3cdKBiMŻ pozyskano z treści jelitowej prosiąt. Doktorant w komentarzu do publikacji deklaruje, że wszystkie szczepy zostały scharakteryzowane pod względem probiotycznym. Natomiast nie podaje gdzie te dane znajdziemy.

➤ Czy dane te zostały wcześniej opublikowane?

Wybrane szczepy zdecydowanie są szczepami probiotycznymi stosowanymi w preparatach dla zwierząt hodowlanych. Zatem odbiorcą opracowanej finalnie technologii będzie zdecydowanie sektor paszowy.

Jako czynniki stresu podczas hodowli zastosowano „stres kwasowy” (brak regulacji wartości pH podczas hodowli), natomiast drugim stresem było zastosowanie podwyższonej temperatury (stres temperaturowy) hodowli do 50°C przez 30 minut.

W obliczu podwyższonej termooporności szczepów z rodzaju *Enterococcus* (przeżywają ogrzewanie 30 minutowe w 60°C) ciekawi mnie:

- jakie były kryteria doboru tego czynnika stresującego dla badanych bakterii?

Zarówno metoda płytkowa Kocha oznaczania liczebności mikroorganizmów jak i cytometria przepływowa mają swoje ograniczenia. W metodzie płytkowej z pewnością ograniczeniem jest jej pracochłonność i założenie że z 1 komórki wyrasta jedna kolonia. Ponadto tak jak Doktorant podaje należy tak przygotować rozcieńczenia do wysiewów aby uzyskać od 30 do 300 kolonii na płycie.

- Jakie kryteria i parametry komórek będą decydowały, o tym że z jednej komórki wyrośnie jedna kolonia?

Doktorant podaje, że kluczowa jest autoagregacja komórek poddanych stresowi środowiskowemu.

- A jeżeli o tym wiemy to co możemy zrobić aby uprawdopodobnić założenie 1 komórka=1 kolonii?

Cytometria przepływowa też nie jest wolna od ograniczeń. Z pewnością jest to metoda gdzie bardzo szybko otrzymujemy wynik nie tylko liczebny ale również o stanie fizjologicznym komórki.

- Ale czy tylko agregacja komórek i zanieczyszczenia pochodzące z rozpadu komórek są utrudnieniami cytometrii przepływowej?

W publikacji II (Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 6841, Imaging Flow Cytometry Demonstrates Physiological and Morphological Diversity within Treated Probiotic Bacteria Groups) w tabeli 1 (strona 11/20) przedstawiono wyniki oznaczania bakterii dwoma wyżej omówionymi metodami. Ponieważ w metodyce Doktorant deklaruje, że wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone w 3 powtórzeniach zastanawia mnie dlaczego przy wynikach nie pokazano odchyłeń standardowych. Odchylenie standardowe pokazałoby jaki jest rozrzut wyników o obrębie prób. Może prosta statystyka pokazałaby, że jednak gdzieś są różnice statystycznie istotne albo przekonałaby nas o braku takich różnic. Myślę, że łatwiej byłoby interpretować wyniki zawarte w tabeli 1 gdyby przedstawiono je w formie logarytmu dziesiętnego w tzw. jednostkach logarytmicznych.

Ważnym elementem pracy jest połączenie klasycznej cytometrii przepływowej z Obrazową cytometrią przepływową (IFC), która pozwala na zwiększenie dokładności powszechnie stosowanej cytometrii przepływowej, łącząc jej charakter statystyczny z obrazowaniem mikroskopowym w jednym układzie. Ponadto zastosowanie IFC połączone z metodą barwienia z wykorzystaniem RedoxSensor™ Green i jodku

propidyny, który okazał się alternatywą dla dotychczas powszechnie wykorzystywanego barwienia LIVE/DEAD. Wprowadzenie barwienia RedoxSensor™ Green i jodku propidyny pozwoliło to na identyfikację komórek o zmienionej (obniżonej) aktywności metabolicznej (VBNC) jako osobnych subpopulacji nazwanych jako mid-active I i mid-active II. Podejście takie pozwoliło to na oznaczenie większej ilości subpopulacji niż tylko żywych i martwych komórek. Dodatkowo stwierdzono, że subpopulacje mid-active I i mid-active II charakteryzują się różnym stopniem uszkodzenia zewnętrznych błon komórkowych oraz zróżnicowaną aktywnością metaboliczną. **Kluczowym spostrzeżeniem jest stwierdzenie, że komórki mid-active I i mid-active II charakteryzowały się zdolnością do wzrostu w pożywce płynnej natomiast komórki mid-active II również na pożywkach stałych. Spostrzeżenia te rzucają nowe światło na zagadnienia komórek dotychczas oznaczanych jako VBNC.** Ponadto ocena uszkodzeń i aktywności metabolicznej komórek może definiować cechy probiotyczne szczepów związanych ze ścianą i błoną komórkową. Jedną z bardzo ważnych cech probiotycznych szczepów mikroorganizmów związanych z zewnętrznymi strukturami komórkowymi jest zdolność adhezji do komórek jelita człowieka i zwierząt. Jako model badawczy w prezentowanej pracy zastosowano linię komórek gruczołaka jelita grubego Caco-2. Jest to standardowa linia stosowana do tego typu badań. W badaniach komórki bakterii probiotycznych podzielono na 4 subpopulacje: komórki aktywne, komórki mid-active I i mid-active II oraz komórki martwe. **Stwierdzono, że do adhezji zdolne są tylko komórki aktywne. Komórki nawet z bardzo niewielkimi uszkodzeniami tracą tę cechę.** Jest to bardzo istotna informacja z uwagi na fakt kolonizacji nabłonka jelitowego człowieka i przez bakterie probiotyczne. Ponieważ w przypadku adhezji w środowisku jelitowym ważną rolę odgrywa mucyna (na co zwraca uwagę Doktorant w dyskusji uzyskanych wyników) proszę o informację:

- Czy bakterie probiotyczne powinny charakteryzować się zdolnością do hydrolizy mucyny czy nie?

W kolejnych etapach pracy podczas suszenia fluidalnego wprowadzono czynniki opłaszczające suszone bakterie: gumę arabską, szelak (odmiana żywicy naturalnej, pozyskiwanej z wydzieliny owadów zwanych czerwcami), hydroksy-propylo-metylo-celulozę (mikrocelulozę krystaliczną). Dla każdej z nich wyznaczono temperaturę przemiany szklistej. Najwyższą temperaturą przemiany szklistej charakteryzowała się hydroksy-propylo-metylo-celuloza. Dodatkowo wyznaczono tolerancję na temperaturę

badanych mikroorganizmów. Stwierdzono, że przy temperaturze od 65 do 70°C rozpoczynają się procesy denaturacji białek komórkowych tych bakterii.

W analizie mikroskopowej SEM pokazano powierzchnie suszonych preparatów bakterii wraz z matrycami (Jakich bakterii? W tytule Rysunku 3, publikacja Nutrients 2023, 15, 3484 – nie ma tej informacji). Jedynie w przypadku mikrocelulozy krystalicznej widoczne są na powierzchni komórki bakterii.

- Proszę o komentarz czy to dobrze czy źle?
- Jak umiejscowienie komórek bakterii w matrycy może wpływać na adhezję i inne cechy probiotyczne?

W opisie tabeli 2 (publikacja Nutrients 2023, 15, 3484), w wynikach badań mikrobiologicznych z oznaczania liczebności bakterii przed i po adhezji do komórek Caco-2 nie podano czynnika powlekającego bakterie. Dodatkowo w pierwszym wierszu pojawia się oznaczenie SD co wg mojej opinii sugeruje zamiar podania odchylenia standardowego. Ponadto pomiędzy próbami opłaszczanymi a suszonymi bez dodatkowych matryc widoczne są wyraźne różnice w liczebności.

- Dlaczego nie wykonano analizy statystycznej w tym badaniu?

W wyniku przeprowadzenia badań przechowalniczych w bardzo różnorodnych warunkach przechowywania dotyczącego atmosfery jak i temperatury stwierdzono, że najlepszym sposobem przechowywania jest zastosowanie matrycy o najwyższej temperaturze przemiany szklistej – mikrocelulozy krystalicznej, oraz przechowywania prób w temperaturze -20°C w atmosferze modyfikowanej (N<sub>2</sub>). W takich warunkach preparaty zawierające bakterie probiotyczne zachowują żywotność bakterii na poziomie wymaganym przez WHO przez 12 miesięcy. Nie jest to optymalne rozwiązanie dla producentów takich preparatów. I tutaj Doktorant proponuje temperaturę przechowywania -4°C, a czas 6-9 miesięcy, co jest alternatywą obniżającą koszty przechowalnicze takich produktów.

Dodatkowo, w pracy zwrócono uwagę na żywotność preparatu podczas pasażu jelitowego i zdolność bakterii po takim procesie. W pracy proces trawienia podzielono na dwa etapy: trawienie w warunkach płynu żołądkowego (S1) oraz trawienie w warunkach płynu jelitowego (S2). Stwierdzono, że po trawieniu w warunkach *in vitro* obniżyła się subpopulacja komórek aktywnych a wzrósł udział komórek średnio-aktywnych, przy znacznym wzroście komórek martwych. Wykazano, że zarówno w próbach wysuszonych, jak i powlekanych oraz po przechowywaniu pierwszy etap trawienia (S1), reprezentujący warunki żołądkowe, doprowadził do obniżenia liczebności w aktywnych

komórek we wszystkich próbach. Natomiast drugi etap trawienia nie determinował już tak dużych zmian w obrębie żywotności komórek w grupie komórek aktywnych i średnio-aktywnych.

W oparciu o uzyskane wyniki Kandydat zaproponował proces technologiczny otrzymywania preparatów probiotycznych, powlekanych i jego aspekty ekonomiczne. Głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za ekonomikę procesu jest koszt pożywki hodowlanej bakterii, czas suszenia, koszt trehalozy jako czynnika ochronnego podczas procesu suszenia oraz koszty powlekania bakterii.

Zazwyczaj w tego typu procesach najwyższym kosztem są składniki podłoża i ewentualnie utylizacja płynów pochodzących. Jest to związane z wysokimi wymaganymi odżywczymi bakterii probiotycznych.

- Czy istnieje możliwość obniżenia tych kosztów stosując do procesu produkty odpadowe przemysłu spożywczego jako pożywkę lub jej składnik?
- Na ile takie podejście obniży koszty wytwarzania preparatów probiotycznych w opracowanej przez Kandydata technologii?

### **Podsumowanie**

Przedstawiona przez mgra inż. Jakuba Kiepsia rozprawa doktorska „Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny jakości preparatów probiotycznych wytwarzanych za pomocą suszenia fluidalnego” jest opracowaniem oryginalnym. Oceniana praca jest opracowaniem interdyscyplinarnym z zakresu inżynierii chemicznej, biologii komórki, procesów fizykochemicznych ciał stałych oraz mikrobiologii. I pomimo moich licznych pytań głównie w kwestiach mikrobiologicznych uważam pracę za wyróżniającą się. Pytania służą wywołaniu dyskusji a nie wskazywaniu słabszych stron pracy. Szczególne wartościowe są badania ukazujące jak liczna jest populacja komórek niehodowlanych podczas przygotowywania preparatów probiotycznych i jakie czynniki mogą wpływać na udział tych subpopulacji zarówno podczas przygotowywania preparatu, przechowywania jak i w warunkach użytkowania czyli spożywania.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawiony cykl 4 publikacji opatrzony wspólnym tytułem „Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny jakości preparatów probiotycznych wytwarzanych za pomocą suszenia fluidalnego” spełnia wymagania określone w art.



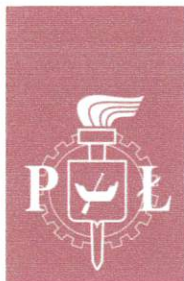
187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668). Postawione hipotezy badawcze zostały pozytywnie zweryfikowane. Przedstawione w pracy wyniki wpisują się nurt zagadnień badawczych prowadzonych w dyscyplinie technologia żywności i żywienia.

W oparciu o powyższe przesłanki wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu **o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Jakuba Kiepsia i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania.**



**PODPIS ZAUFANY**

ELŻBIETA  
KLEWICKA  
05.11.2023 18:02:37 GMT+1  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym



Politechnika Łódzka

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii



Łódź, dn. 5-11-2023r.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Klewicka  
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka

### Wniosek o wyróżnienie

Zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej zatytułowanej **„Zastosowanie cytometrii przepływowej do oceny jakości preparatów probiotycznych wytwarzanych za pomocą suszenia fluidalnego”** złożonej w przewodzie doktorskim przez mgra inż. Jakuba Kiepsia.

Powyższa praca jest opracowaniem przedstawionym w 4 publikacjach o zasięgu międzynarodowym, jest pracą interdyscyplinarną co wymagało od Kandydata opanowania procedur z zakresu inżynierii chemicznej, mikrobiologii, biologii komórki. W mojej ocenie poziom prowadzonych badań i opracowanie uzyskanych wyników, zaproponowane rozwiązanie technologiczne istotnie przekraczają średni poziom prac doktorskich. Doktorant w swoim dorobku posiada 4 publikacje z tematyki doktoratu opublikowanych w czasopismach z listy JCR (we wszystkich jest pierwszym autorem). Przedstawiona do oceny praca oprócz elementu naukowego, który wnosi nowe istotne informacje do dyscypliny technologia żywności i żywienia jest ofertą technologiczną dla sektora paszowego a po modyfikacjach również dla farmaceutycznego i spożywczego co w całości zasługuje na wyróżnienie pracy.