

UNIwersytet
ROLNICZY
W KRAKOWIE

Kraków, 25.11.2025 r.

Prof. dr hab. inż. Paweł Satora

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Adama Michała Staniszewskiego pt. „Izolacja, charakterystyka i potencjalne zastosowanie drożdży probiotycznych występujących w produktach roślinnych spontanicznie fermentowanych jako element żywności fortyfikowanej”, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Moniki Kordowskiej-Wiater, prof. UP w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Koncepcja probiotyków ma swoje początki w obserwacjach Eliego Miecznikowa z początku XX wieku, który powiązał spożycie sfermentowanych produktów mlecznych zawierających bakterie kwasu mlekowego ze zdrowiem i długowiecznością. Termin „probiotyk”, wywodzący się z greckiego słowa oznaczającego „dla życia”, został po raz pierwszy użyty w 1965 roku do opisanie substancji sprzyjających wzrostowi mikroorganizmów, ale jego współczesna definicja, jako żywych mikroorganizmów przynoszących korzyści zdrowotne gospodarzowi, została doprecyzowana w latach 70. i 80. XX wieku. Probiotyki ewoluowały od tradycyjnych szczepów, takich jak *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, izolowanych z fermentowanej żywności i ludzkiej mikrobioty, aż po probiotyki nowej generacji, opracowane w wyniku głębszych badań nad mikrobiomem, ukierunkowane na różnorodne problemy zdrowotne wykraczające poza zdrowie jelit. Rozwój probiotyków szedł w parze z postępem w mikrobiologii, konserwacji żywności i badaniach klinicznych, prowadząc do szerokiej gamy produktów probiotycznych i zastosowań terapeutycznych, choć nadal istnieją wyzwania w zakresie identyfikacji szczepów, zatwierdzenia regulacyjnego i skuteczności klinicznej. Najnowsze trendy koncentrują się na personalizowanym żywieniu, nowych szczepach probiotycznych i rozszerzonych zastosowaniach, w tym modulacji odporności, zdrowia metabolicznego i dobrego samopoczucia psychicznego, wspieranych przez rosnącą wiedzę naukową na temat interakcji gospodarz-mikrobiom. Ogólnie rzecz biorąc, probiotyki stanowią dynamiczną dziedzinę o bogatej historii i obiecującej przyszłości w zakresie promocji zdrowia i zapobiegania chorobom.

Wartość globalnego rynku probiotyków w 2024 roku szacowano na 69,28 mld USD. Przewiduje się, że rynek ten wzrośnie z 73,13 mld USD w 2025 roku do 115,13 mld USD do 2032 roku, osiągając średnioroczny wskaźnik wzrostu (CAGR) na poziomie 6,70% w okresie prognozowania. Region Azji i Pacyfiku zdominował rynek probiotyków, osiągając 48,05% udziału w rynku w 2024 roku. Produkcja na skalę przemysłową napotyka na wyzwania, takie jak znalezienie opłacalnych surowców, utrzymanie żywotności probiotyków podczas produkcji i przechowywania oraz zapewnienie stabilności szczepów. Globalny krajobraz badań naukowych pokazuje, że Stany Zjednoczone, Chiny, Indie i Brazylia są liderami badań związanych z probiotykami, co odzwierciedla ich znaczącą rolę w rozwoju i stosowaniu probiotyków. Postęp w technologiach produkcji obejmuje różne metody suszenia w celu zachowania żywotności probiotyków, a innowacje koncentrują się na substancjach ochronnych, optymalizacji procesów i adaptacji szczepów probiotycznych do stresu, aby poprawić stabilność i okres przydatności do spożycia. Podczas gdy produkty mleczne pozostają ich głównymi nośnikami, obserwuje się rosnące zainteresowanie żywnością probiotyczną niezawierającą mleka, taką jak soki, co jest napędzane obawami konsumentów o zdrowie i preferencjami żywieniowymi.

Drożdże probiotyczne, zwłaszcza *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* to żywe mikroorganizmy, które przynoszą korzyści zdrowotne, takie jak poprawa trawienia, działanie przeciwdrobnoustrojowe i terapeutyczne w zaburzeniach żołądkowo-jelitowych. Poza *S. boulardii*, inne rodzaje drożdży, w tym *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Meyerozyma* i *Torulaspora*, wykazują obiecujące właściwości probiotyczne, takie jak hamowanie patogenów, działanie antyoksydacyjne, asymilacja cholesterolu i immunomodulacja. Drożdże te wykazują ważne cechy, takie jak tolerancja na warunki żołądkowo-jelitowe (kwas, żółć, temperatura), adhezja do komórek jelitowych, autoagregacja i produkcja związków bioaktywnych, w tym lotnych związków organicznych, enzymów, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, witamin, β -glukanów i antymikrobiologicznych peptydów, które przyczyniają się do ich prozdrowotnego działania i potencjału jako naturalnych alternatyw dla antybiotyków, szczególnie w produkcji zwierzęcej. Drożdże probiotyczne mają również potencjalne zastosowanie w fermentacji żywności, poprawiając właściwości odżywcze i sensoryczne, a także w bioterapeutykach do leczenia zdrowia jelit i potencjalnie innych schorzeń, takich jak choroby zapalne. Różnice specyficzne dla szczepów są znaczące, a niektóre drożdże nie-*Saccharomyces* wykazują porównywalne lub lepsze cechy probiotyczne. od *S. boulardii*, co podkreśla znaczenie wyboru szczepu. Chociaż badania naukowe rozwijają się szybko, dowody kliniczne na istnienie wielu nowych drożdży probiotycznych pozostają ograniczone, a w celu potwierdzenia ich bezpieczeństwa i skuteczności konieczne są dalsze badania.

Tematyka związana z izolacją i badaniem kultur probiotycznych, w tym drożdży cieszy się szczególnie w ostatnich latach bardzo dużym zainteresowaniem. W bazie Web of Science Core Collection znajduje się obecnie 3009 artykułów naukowych w tym temacie, a od roku 2020, co roku pojawia się ponad 200 nowych publikacji. Badania związane są głównie z wpływem tych mikroorganizmów na choroby zapalne i infekcje jelit, ale również występowaniem i zastosowaniem ich jako dodatek w mleczarstwie i innych produktach pochodzenia zwierzęcego.

Prace opublikowane przez Pana mgr inż. Adama Staniszewskiego, wpisują się w ww. opisany trend i dostarczają nowych informacji, dotyczących izolacji potencjalnych drożdży probiotycznych z produktów pochodzenia roślinnego oraz określania ich charakterystyki. Przedstawione wyniki badań mają duże znaczenie aplikacyjne, ze względu na możliwość wykorzystania uzyskanych kultur do tworzenia nowych produktów fermentowanych, o innowacyjnych, prozdrowotnych właściwościach.

Jako swoje osiągnięcie naukowe do postępowania doktorskiego mgr inż. Adam Michał Staniszewski, przedstawił cykl składający się z 4 prac, opublikowanych w latach 2021-2025 w czasopismach, znajdujących się w bazie JCR, to jest w wydawanym przez MDPI AG – Foods (3 artykuły) oraz Applied Sciences-Basel. Sumaryczny Impact Factor prac stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora wynosi 17,861, a suma punktów według punktacji MNiSW, obliczonej według roku publikacji, wynosi 440 pkt, wg Web of Science liczba cytowań tych prac na dzień 25 listopada 2025 roku wynosi 113. Są to prace zespołowe, wykonane we współpracy z innymi pracownikami Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego we Lublinie, Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, a także Katedry Ekofizjologii Bezkręgowców i Biologii Eksperymentalnej, w których doktorant figuruje jako pierwszy z Autorów. W dokumentacji znajdują się oświadczenia współautorów potwierdzające udział w tworzeniu tych publikacji, we wszystkich procentowy udział mgr inż. Adama Staniszewskiego, wynosi odpowiednio 80, 85, 80 oraz 70%. Zgodnie z informacjami zawartymi w oświadczeniach, rola Doktoranta w przygotowaniu artykułu przeglądowego polegała na opracowaniu jego koncepcji, zebraniu literatury naukowej, przygotowaniu i napisaniu pierwszej wersji manuskryptu i jego współredagowaniu, a w przypadku prac badawczych – opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaprojektowaniu i przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń, analizie większości wyników, przygotowaniu pierwszych wersji manuskryptów oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 91 stron maszynopisu, następnie załączone zostały publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów. Spis literatury zawiera 167 pozycje, cytowane w poszczególnych artykułach, w przeważającej większości oryginalne i anglojęzyczne, z których znacząca część to prace opublikowane w czasopismach międzynarodowych z tzw. listy filadelfijskiej. Większość pozycji bibliograficznych pochodzi z ostatnich 10 lat – 118 pozycji, 71%.

Praca została podzielona na 8 zasadniczych rozdziałów, obejmuje także streszczenia w języku polskim i angielskim. Forma pracy jest przejrzysta, a umieszczony na początku opracowania spis treści ułatwia czytelnikowi orientację i szybkie dotarcie do zagadnień zawartych w poszczególnych rozdziałach. Proporcje poszczególnych rozdziałów są racjonalne.

Rozdział Wprowadzenie teoretyczne (zajmuje 11 stron) pełni rolę przeglądu aktualnej literatury na temat przedmiotu badań, uzasadnia również zasadność podjętych badań oraz dobór metod analitycznych. Autor sformułował 2 ogólne hipotezy badawcze, które podjął się zweryfikować w trzech celach badawczych. Metodyka badań została szczegółowo zaprezentowana na 11 stronach, a wyniki uzyskane w trakcie doświadczeń omówione zostały i przedyskutowane na 38 stronach. Główną część Pracy kończy rozdział Stwierdzenia i wnioski, w której Autor

podsumowuje uzyskane wyniki i formułuje 5 wniosków zestawiających najważniejsze osiągnięcia uzyskane w cyklu doświadczeń.

Rozprawa jest zredagowana starannie, napisana poprawnym językiem, wskazuje na dobrą orientację Doktoranta w obszarze poruszanych zagadnień.

Praca rozpoczyna się Wprowadzeniem teoretycznym przybliżającym wątki będące przedmiotem dysertacji. Obejmuje on przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat zagadnień opisanych w pracy, m.in. ogólne informacje dotyczące probiotyków, charakterystykę drożdży probiotycznych *Saccharomyces boulardii*, mechanizmy ich działania w przewodzie pokarmowym, roli w terapii schorzeń tego układu oraz wpływie na jakość żywności wzbogacanej w te kultury, a także właściwości innych gatunków drożdży o właściwościach probiotycznych. Praca w sposób przystępny prezentuje dotychczasową wiedzę w tym zakresie, opierając się na ponad 100 aktualnych publikacjach. Do tego rozdziału/artykułu nie mam większych uwag, poza drobnymi edytorskimi i uwagą ogólną dotyczącą wszystkich złożonych publikacji, a także ich opisu, że nazwy łacińskie każdego z wymienianych mikroorganizmów powinny być zapisywane kursywą.

Celem pracy było pozyskanie izolatów drożdży z żywności fermentowanej pochodzenia roślinnego i ich identyfikacja genetyczna, przetestowanie uzyskanych izolatów pod względem posiadania właściwości probiotycznych oraz przygotowanie produktu spożywczego z zastosowaniem wyselekcjonowanych kultur probiotycznych.

Rozdział „Metodyka i metody badawcze” zawiera dokładny opis przeprowadzonych doświadczeń i wykorzystanych metod analitycznych. Opisy zamieszczone w Pracy, a także publikacjach na nią się składających są przejrzyste i świadczą o znakomitym przygotowaniu analitycznym Doktoranta do prowadzenia tego typu badań. Do realizacji eksperymentów Doktorant zastosował szeroki wachlarz metod analitycznych, do których Autor musiał wykorzystać swoją wiedzę z zakresu zarówno mikrobiologii, jak i chemii. Zabiegi mikrobiologiczne obejmowały izolację kultur drożdżowych z różnych produktów/procesów, ich identyfikację poprzez sekwencjonowanie regionu ITS, analizy określające właściwości istotne dla szczepów probiotycznych oraz przygotowanie inokulatów do badań. Analizy chemiczne miały za zadanie określenie podstawowych parametrów fizykochemicznych otrzymywanego probiotycznego produktu spożywczego, a także wybranych komponentów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Z wykorzystaną w badaniach metodologią związanych jest kilka moich pytań.

- Dlaczego kwasowość miareczkową podpiwku wyrażano jako ekwiwalent kwasu octowego. Myślę, że powinno się tutaj stosować metody określania kwasowości takie jak w piwowarstwie i wyrażanie kwasowości w przeliczeniu na ilość wykorzystanej do miareczkowania zasady sodowej. Wyrażenie kwasowości jako kwas octowy sugeruje, że był to dominujący w próbach kwas organiczny, a biorąc pod uwagę profil kwasów w finalnym podpiwku, kwasowość powinna być raczej wyrażona w przeliczeniu na kwas jabłkowy, którego w procesie tworzyło się znacząco więcej (Publikacja 4, rysunek 11).

- Autor do kontroli kinetyki fermentacji, stosuje pojęcie wigoru fermentacyjnego. Nie jest jasne skąd zaczerpnął to pojęcie, ponieważ w cytowanej w metodyce publikacji używany jest termin – „fermentation rate”, czyli tempo fermentacji.
 - Jakie urządzenia stosowano do badania zmętnienia i koloru podpiwku (rozdziały 5.2.3.5 oraz 5.2.3.6)?
 - Metoda 5.2.3.7 – jaką ilość wody stosowano do rozcieńczania próbek, wykorzystywanych w analizie HPLC? Jakie standardy były użyte w powyższym badaniu?
- Uzupełnienie metodyki o powyższe informacje, znacząco ułatwiłoby innym naukowcom, powtórzenie/zastosowanie wykorzystanych przez Doktoranta metod badawczych.

Rozdział 6 prezentuje omówienie wyników uzyskanych w trakcie badań, opublikowanych w trzech artykułach badawczych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W pierwszych dwóch – „Probiotic yeasts and how to find them – Polish wines of spontaneous fermentation as source for potentially probiotic yeasts”. Foods 2023 T. 12, Nr 18, 3392 oraz „Probiotic Yeasts and How to Find Them-From Spoilage to Probiotic”. Applied Sciences-Basel. 2024. T. 14, Nr 24, 11698, wyizolowano z win spontanicznej fermentacji oraz psujących się produktów spożywczych w sumie 74 kultury drożdżowe, które następnie identyfikowano oraz charakteryzowano pod względem cech istotnych dla mikroorganizmów probiotycznych. Brak informacji w jaki sposób izolowano szczepy z win (czy izolowano z gotowych produktów, kolejnych etapów fermentacji spontanicznej), albo zacytowanej innej, wcześniejszej publikacji, która opisywałaby powyższe zagadnienia. Izolaty identyfikowane były poprzez sekwencjonowanie regionu ITS, z wykorzystaniem bazy BLAST. Aby wyselekcjonować kultury o właściwościach probiotycznych, szczepy poddawano analizom zdolności wzrostu w temperaturze 37°C, przeżywalności w warunkach symulowanego przewodu pokarmowego, hydrofobowości powierzchni, zdolności do agregacji, właściwości antyoksydacyjnych i przeciwdrobnoustrojowych, a także związanych z potencjalną wirulencją i bezpieczeństwem (aktywność hemolityczna, produkcja amin biogennych, aktywność enzymatyczna) oraz istotnych dla produkcji napojów fermentowanych (odporność na etanol, produkcja siarkowodoru). W przygotowanej dysertacji ciężko się doszukać, które szczepy wyizolowane odpowiednio z wina i powodujące zepsucia, według Doktoranta, odznaczały się najlepszymi cechami, które umożliwiłyby ich wybór do kolejnego etapu badań. Dopiero we Wnioskach publikacji numer 2 znajdujemy informacje, że „Polskie wina mogą być źródłem potencjalnie probiotycznych drożdży i na podstawie naszych wyników sugerujemy 15_Hans_uvarum, 16_Hans_uvarum i 37_Sacch_cerevisiae jako obiecujących kandydatów na drożdże probiotyczne, których potencjał badawczy obejmuje dalsze badania w takich dziedzinach jak nauka o żywności, opracowywanie formulacji probiotycznych itp.”. W publikacji numer 3, we Wnioskach znajdujemy z kolei zdanie – „Z procedury przesiewowej wybraliśmy dwa najbardziej obiecujące szczepy: 113_Metsch_pulcherrima i 101_Pich_kudriavzevii. Drożdże te wymagają jednak dalszych badań genetycznych i bezpieczeństwa, w tym testów *in vivo*, aby potwierdzić ich potencjał probiotyczny i ostatecznie udowodnić, że są bezpieczne dla ludzi, mimo, że są stosowane w procesach biotechnologicznych od lat”. Nie jest jasne na jakiej podstawie wybrano do produkcji podpiwku kulturę 110, której nie analizowano pod względem jej przeżywalności w warunkach przewodu pokarmowego (podobnie jak wybranego szczepu 101), izolat 110 wykazywał również niską zdolność do agregacji oraz odznaczał się

aktywnością trypsyny oraz β -glukuranidazy, z których pierwszy według Autora może być powiązany z patogennością, a drugi z transformacją prekarcynogenów w karcynogeny i stymulacją rozwoju raka jelita grubego!? Zaprezentowane w publikacjach doświadczenia i ich wyniki uważam za najciekawsze w cyklu publikacji, ponieważ dostarczają informacji jak powszechne są w produktach żywnościowych i ich produkcji, kultury o potencjalnie probiotycznych właściwościach. Ze względu na ilość analizowanych kultur oraz badanych cech, wymagały od Doktoranta poświęcenia największej ilości pracy i czasu.

Publikacja numer 4 – “Probiotic Yeast and How to Use Them - Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages. Foods 2025 T. 14, Nr 16, 2921, prezentuje aplikacyjne wykorzystanie sześciu kultur drożdży wytypowanych na podstawie badań przeprowadzonych w ramach dwóch wcześniejszych publikacji, do otrzymywania monokulturowego podpiwku. Jako kontrolę w doświadczeniach zastosowano komercyjny szczep *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. W przypadku tej publikacji mam najwięcej uwag/pytań. Do przygotowania podpiwku wykorzystano recepturę firmy Bakalland. Nie jestem przekonany, że było to najlepsze rozwiązanie. Obejmowała ona bowiem dodatek dużej ilości sacharozy – 50 g na litr wytworzonej „brzeczki”. W przypadku wykorzystania do fermentacji drożdży nie-*Saccharomyces*, które w większości nie wykazują aktywności izomerazy potrzebnej do utylizacji tego dwucukru, myślę, że korzystniejszy dla finalnych wyników byłby tutaj dodatek lepiej przyswajalnego dla nich cukru, np. glukozy. Brak informacji o składzie i podstawowych parametrach medium użytego do fermentacji (poza barwą oraz zmętnieniem), uniemożliwia stwierdzenie, czy było to środowisko w którym bez przeszkód mogły się rozwijać wszystkie badane drożdże. Nie jest również jasne jak prowadzono propagację szczepów, czy jednoetapowo, stacjonarnie, czy na wytrząsarce, i jaką ilością komórek szczepiono 1 ml przygotowanego medium (informacja o gęstości optycznej inokulatu jest niewystarczająca, ponieważ różne kultury drożdży mogą różnić się znacząco w wielkości komórek)? Po zakończonej fermentacji, która prowadzona była przez 14. dni w temperaturze pokojowej, próby w kolejnych dniach do 30. umieszczono w warunkach chłodniczych (w celu fermentacji cichej?). Podczas fermentacji podpiwka, analizowano, zarówno jakość biomasy drożdżowej prowadzącej proces, jak i wybrane parametry fizyko-chemiczne fermentowanego medium. Z wynikami związane jest moje kolejne pytanie – jakie cukry złożone były analizowane w otrzymanych podpiwkach? W podsumowaniu publikacji Autor stwierdził, że podpiwek może stanowić nośnik dla szczepów probiotycznych z uwagi na dobrą ich przeżywalność w ciągu okresu fermentacji i przechowywania w warunkach chłodniczych. Jednocześnie drożdże należące do różnych gatunków wytwarzały podpiwki o nieco odmiennych właściwościach, a wszystkie otrzymane napoje można zaklasyfikować do produktów niskoalkoholowych lub bezalkoholowych, co zgodne jest z definicją podpiwku.

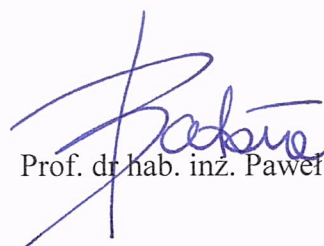
Na podstawie wyników zamieszczonych we wszystkich 3 publikacjach wysnuto 7 wniosków zaprezentowanych w rozdziale Stwierdzenia i wnioski. Według Doktoranta pozytywnie zweryfikowały one postawione hipotezy badawcze. W podsumowaniu zabrakło mi trochę przyszłych perspektyw przeprowadzonych badań, wraz z ich potencjalnym, aplikacyjnym zastosowaniem.

W związku z tym prosiłbym Doktoranta o odpowiedź na dwa pytania. Biorąc pod uwagę uzyskane w opublikowanych artykułach wyniki, jakie jeszcze inne właściwości izolatów byłyby cenne biorąc pod uwagę możliwości ich wykorzystania w produkcji żywności. Do otrzymywania jakich produktów, innych niż podpiwek, można by je zastosować?

Reasumując, Pracę przeczytałem z przyjemnością, ze względu na wieloletnie zainteresowanie zawodowe drożdżami, zwłaszcza nie-*Saccharomyces*, izolowanymi ze środowisk naturalnych. Doceniam ogrom pracy, nowatorstwo pomysłu, zróżnicowanie zastosowanych metod oraz opublikowanie wyników badań w dobrych czasopismach międzynarodowych. Na podstawie dysertacji wyrażam pogląd, że Doktorant jest osobą przygotowaną do prowadzenia badań, dysponuje wieloaspektową wiedzą w obszarze przedstawionego zagadnienia oraz umie w jasny sposób prezentować wyniki swoich obserwacji i formułować wnioski. Ponadto Autor wykazał się umiejętnością analitycznego podejścia w odniesieniu do prac innych autorów.

Podsumowując swoją ocenę stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr inż. Adama Michała Staniszewskiego pt. „Izolacja, charakterystyka i potencjalne zastosowanie drożdży probiotycznych występujących w produktach roślinnych spontanicznie fermentowanych jako element żywności fortyfikowanej”, łączy aspekty naukowe z praktycznymi stanowiąc istotny wkład w dziedzinę nauk o żywności i żywieniu. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.), stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora.

Z powyższych powodów zwracam się do Przewodniczącego oraz członków Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia, Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, o dopuszczenie Pana mgr inż. Adama Michała Staniszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Paweł Satora