Jabłonna, dn. 15 marca 2024 r.

Dr hab. Barbara Kowalik
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego
Polskiej Akademii Nauk

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz pt. „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny", wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Cezarego Purwina i promotora pomocniczego dr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego w Katedrze Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła, Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie.

Ocena formalna rozprawy

Ocena rozprawy doktorskiej została wykonana na podstawie pisma (WBZ-DZ.6350.2.1.2022) Pani prof. dr hab. Doroty Witkowskiej, Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie, z dnia 16.01.2024 r.

Problem naukowy i znaczenie badań

Zmiany klimatyczne, zachodzące w ostatnich latach na Świecie, charakteryzujące się okresowymi suszami, a także duże wahania cen pasz białkowych, głównie soi, zmusiły hodowców bydła wysokoprodukcyjnego do opracowania dawek pokarmowych z możliwie tanich pasz. Bez wątpienia należy do nich kiszonka z lucerny, która jest bogata w białko, łatwa w przechowywaniu i chętnie pobierana przez krowy. Wysoka zawartość białka oraz dobry skład aminokwasowy lucerny, szczególnie w fazie pąkowania, czynią tę roślinę bardzo dobrym komponentem uzupełniającym kiszonkę z kukurydzy, która jak widomo w uprawie, ma m.in. duże zapotrzebowanie na wodę, ze względu na wysoką produkcję suchej masy. Lucernę możemy również wprowadzać do dawek pokarmowych dla bydła jako zastąpienie całkowite lub częściowe śrut poekstrakcyjnych. Dzięki głębokiemu systemowi korzeniowemu, odporna jest na okresowe susze oraz dobrze dostosowuje się do różnych środowisk glebowych. Jest to gatunek wolny od genetycznie modyfikowanych organizmów, na co zwraca uwagę coraz większa rzesza świadomych konsumentów, którzy chcą spożywać bezpieczne produkty pochodzenia zwierzęcego (mleko, mięso) o wysokiej jakości.

Właściwie zakiszana lucerna jest chętnie zjadana przez krowy i zapewnia dobrą stymulację żwacza. Jednakże ma swoje wady, jest rośliną trudną do zakiszania, co wynika ze stosunkowo niskiej ilości cukrów rozpuszczalnych w wodzie, dużej pojemności buforowej oraz wysokiej zawartości białka, które podczas procesu zakiszania ulega proteolizie. Skutkuje to wysoką rozkładalnością w żwaczu i dużymi stratami azotu w tym przedżołądku, a w konsekwencji zwiększonym wydalaniem w moczu i dalszą emisją do środowiska. W celu zmniejszenia proteolizy podczas zakiszania lucerny, ale także innych roślin bobowatych drobnonasiennych, stosuje się różnego rodzaju dodatki biologiczne,

chemiczne, enzymatyczne, lub naturalne. Niemniej jednak, stosowanie ich nie zawsze przynosi oczekiwany skutek.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marty B. Borsuk-Stanulewicz pt. „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny", dobrze wpisuje się w najnowsze trendy badań nad poszukiwaniem dodatków ograniczających dynamikę proteolizy podczas procesu zakiszania lucerny. Wybór problemu badawczego przez Doktorantkę wydaje się w pełni zasadny, zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym. Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej, doskonale wpisują się w poszukiwanie skutecznego sposobu na poprawę wartości pokarmowej kiszonki lucerny, która jest doskonałą paszą białkową, szczególnie dla krów wysokowydajnych. Znalezienie skutecznego sposobu poprawy warunków zakiszania tej rośliny, pozwoli na właściwe wykorzystanie składników pokarmowych przez krowy, obniżenie kosztów ich żywienia, a w konsekwencji otrzymanie wysokiej jakości produktu końcowego.

Opis i ocena pracy

Układ przedstawionej do oceny dysertacji doktorskiej jest typowy dla prac o charakterze doświadczalnym z obszernym opracowaniem w postaci maszynopisu, liczącego 238 stron. Rozprawa składa się z 12 rozdziałów wraz z wykazem skrótów, streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem schematów (5), tabel (27), wykresów (15).

Tytuł pracy w mojej opinii jest poprawny i w pełni odzwierciedla treści zawarte w dysertacji, jasno nawiązuje do ciągle aktualnej tematyki, a także ważnej problematyki poszukiwania dodatków ograniczających proces rozkładu białka podczas zakiszania lucerny.

W ***wykazie skrótów***, pominięto skrót współczynnika fermentacji (FC).

Rozdział ***Wstęp*** stanowi wprowadzenie w zakres badań, czytelnik zapoznaje się z głównymi problemami badawczymi podejmowanymi w ramach pracy. Do tego rozdziału mam jedną uwagę. Na stronie 9 Doktorantka wspomina, że obniżenie wartości pokarmowej białka podczas zakiszania jest obecne w innych roślinach paszowych, ale jest mniej intensywne. Uważam, że trzeba w tym miejscu podać przykłady tych roślin.

Przegląd piśmiennictwa stanowi obszerny i wnikliwy opis istniejącej wiedzy nt. znaczenia gospodarczego lucerny, obejmujący warunki uprawy tej rośliny, jej szerokie zastosowanie w gospodarce oraz skład chemiczny. Następnie Doktorantka, dokonuje „omówienia" charakterystyki związków azotowych i ich przemian podczas procesu zakiszania, od momentu ścięcia (zbioru) po wszystkie fazy zakiszania roślin paszowych wraz z opisem wskaźników przemian proteolitycznych w zakiszanym materiale. W dalszej części znajduje się ważny opis istniejących metod/ kombinacji metod ograniczających proteolizę białka lucerny. Na tym etapie opisu przeglądu literatury mam dwa pytania:

czy zastosowanie formaldehydu do zakiszania roślin, w tym lucerny, nie pociąga za sobą negatywnych skutków na funkcjonowanie żwacza? Czy formaldehyd jest często stosowany w praktyce i czy ta forma dodatku jest obecnie stosowana (cytacja z 2013 roku)? Na stronie 28 Doktorantka nie podała nazw łacińskich, niektórych rodzajów roślin, będących źródłem tanin np. dąb, kasztanowiec czy migdałecznik. Ostatni podrozdział przeglądu piśmiennictwa Kandydatka poświęciła krótkiemu opisowi istniejącej wiedzy nt. zastosowania tanin różnego pochodzenia oraz suchego lodu, jako dodatków ograniczających proteolizę podczas zakiszania roślin, a które zastosowała w swoich doświadczeniach. Tak obszerne ujęcie problemu i przytoczenie wielu pozycji literatury przez Doktorantkę, pozwala wnioskować o dobrej znajomości tematu.

Hipotezy badawcze i cele pracy zostały jasno i precyzyjne sformułowane oraz są zgodne z przeprowadzonymi trzema zadaniami badawczymi, w których sprawdzano możliwości zastosowania dodatków na proces hamowania proteolizy podczas zakiszania lucerny. We wspomnianych zadaniach badano wpływ dodatku różnych poziomów komonicy zwyczajnej i łuski bobiku, jako źródeł tanin oraz suchego lodu, jako źródła dwutlenku węgla modyfikującego atmosferę gazową zakiszanej lucerny na skład chemiczny, frakcje węglowodanowe i białkowe, rozkładalność żwaczową suchej masy (SM) i białka ogólnego (BO) *in vitro* oraz skład mikrobiologiczny kiszonek.

Rozdział ***Materiał i metody*** został szczegółowo i przejrzyście opisany. Doktorantka przedstawiła trzy układy doświadczeń, w których sporządzono kiszonki z lucerny wraz z dodatkami. Wszystkie układy zaopatrzono schematami.

W doświadczeniu I sporządzono 6 kiszonek z lucerny, każdą w 3 powtórzeniach z 0, 10, 20, 30, 40 i 50% udziałem komonicy zwyczajnej. W doświadczeniu II zrobiono 17 kiszonek z lucerny, również w 3 powtórzeniach, gdzie zastosowano dodatek - łuskę bobiku w ilości 1,2; 2,4; 3,6; 4,8; 6,0; 12,0; 18,0; 24,0% lub w takiej samej ilości słomę pszenną traktując ją jako grupę kontrolną „pozytywną". Kiszonka z lucerny bez dodatków stanowiła grupę kontrolną „negatywną". Doświadczenie III obejmowało sporządzenie 12 kiszonek, w 3 powtórzeniach, uwzględniając dodatek suchego lodu w ilości 0,5; 1g; 2g lub bez tego dodatku do lucerny przewiędniętej po 12; 24 h lub świeżej (nieprzewiędniętej).

W dalszej części rozdziału Doktorantka dokonuje zwartego opisu przygotowania kiszonek oraz zastosowanych analiz chemicznych, gdzie zakres tych ostatnich w zielonkach, kiszonkach i łusce bobiku przedstawia w formie tabeli, co zdecydowanie ułatwia pracę recenzentowi. W całej pracy (w tym m.in. na str. 43), Doktorantka używa określenia „lotne kwasy tłuszczowe (LKT)", jako jednego ze wskaźników fermentacji kiszonek. W przyszłej publikacji używałabym nazwy „krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA)" (*short chain fatty acid)*, która jest obecnie coraz częściej stosowana.

Następnie Doktorantka opisuje oznaczenie rozkładalności żwaczowej SM i BO zielonek i kiszonek metodą *in vitro*. Tu warte rozważenia jest pytanie (szczególnie na rzecz przyszłych badań), czy płyn żwacza (jako inokulum), który był pobierany od zwierząt 1,5 h po karmieniu, pobierać jednak

przed karmieniem? Moja sugestia dotyczy mikroorganizmów zasiedlających żwacz, które przed karmieniem zwierząt nie do końca są „wypełnione cząsteczkami pasz", a po przeniesieniu ich do „sztucznego żwacza" będą efektywniej wykorzystywały składniki pokarmowe badanych pasz, szczególnie w początkowych czasach inkubacji prób. W opisie tego podrozdziału, nasuwa mi się jeszcze jedno pytanie. Dlaczego określając dynamikę rozkładu SM i BO zielonek i kiszonek *in vitro* nie uwzględniono rozkładu po 16 h. W badaniach *in situ* rozkład składników pokarmowych pasz objętościowych obejmuje właśnie jeszcze tę godzinę (dodatkowo jeszcze 72 h) i wydaje się, że powinien być wykonany również w badaniach *in vitro*.

W końcowych podrozdziałach Doktorantka szczegółowo opisuje analizy mikrobiologiczne kiszonek, obejmujące całkowitą liczbę bakterii: *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. i *Bacillus* spp., oraz całkowitą liczbę grzybów i drożdży, a także analizę sekwencjonowania nanoporowego mikrobiomu bakteryjnego kiszonek. Na uwagę zasługuje również bardzo staranny i zwięzły opis wszystkich obliczeń wskaźników z podaniem wzorów, a także opis zastosowanych analiz statystycznych.

W rozdziale ***Wyniki*** Doktorantka opisuje bardzo dokładnie otrzymane efekty swoich badań. Wszystkie wyniki zamieszczone są w czytelnych tabelach. Dodatkowo na wykresach przedstawiono regresję liniową analizy kowariancji oraz interakcji dla frakcji białkowych badanych kiszonek. Doktorantka na wykresach pokazała kinetykę rozkładu SM i BO zielonek i kiszonek z dodatkami a wskaźniki dynamiki modelu rozkładu ww. składników chemicznych w tabelach. Bardzo dokładnie opisała i przedstawiła graficznie wyniki dotyczące całkowitej liczebności bakterii, grzybów i drożdży oraz bakterii *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. i *Clostridium* spp. oraz procentową strukturę mikrobiomu bakteryjnego.

Analizując wyniki dopatrzyłam się kilku nieścisłości. Na str. 69 Doktorantka podaje, że najwyższy ładunek bakterii *Clostridium* spp. stwierdzono w kiszonce z 10% udziałem komonicy. Natomiast z Tab. 7 wynika, że najwyższy był w kiszonkach z 30% udziałem tej rośliny. Nie ma to jednak dużego znaczenia, ponieważ nie wykazano tu różnic statystycznych. Na str. 100 zauważyłam, że podano wartości (20,28 i 4,32) stosunku kwasu mlekowego do kwasu octowego, których nie ma w Tab. 19. Najniższy stosunek stwierdzono dla kiszonki z lucerny przewiędniętej po 12 h z dodatkiem 2 g suchego lodu (Tab. 19), a nie jak jest w opisie po 24 h przewiędnięcia roślin i dodatku 1 g lodu.

Mam jedną generalną uwagę do Doktorantki dotyczącą opisu tej części rozdziału. Przy tak dużej ilości otrzymanych wyników oraz pokazaniu różnych zależności, zrezygnowałabym z opisu niepotwierdzonych statystycznie efektów. Jeśli nie ma statystycznych różnic w omawianym wskaźniku pomiędzy grupami, to znaczy, że czynnik doświadczalny nie miał wpływu lub jego wpływ był niewielki na omawiany parametr. Uwaga ta nie rzutuje na jakość dysertacji, a może jedynie świadczyć o bardzo wnikliwej analizie wyników przez Doktorantkę.

Na uwagę zasługuje, bardzo dobrze napisany rozdział ***Dyskusja***, w którym Doktorantka porównuje uzyskane wyniki z efektami doświadczeń innych badaczy. Wiadomym jest, że rozdział ten jest najtrudniejszym do opracowania fragmentem rozprawy doktorskiej. Napisany jest obszernie i liczy 51 stron maszynopisu. Doktorantka, w moim przekonaniu, poradziła sobie z tą częścią dysertacji znakomicie. Wykazała się dużą znajomością tematu, przeprowadzając logiczne wyjaśnienia swoich wyników i spostrzeżeń. Po przeczytaniu tej części rozdziału rozprawy, a szczególnie podrozdziałów poświęconych rozkładowi *in vitro* zielonek i kiszonek, nasuwa się uwaga: w warunkach „sztucznego żwacza", rozkład składników pokarmowych zawartych w paszach, przebiega w stabilnych i optymalnych warunkach. Nie docierają tu bodźce fizyczne lub biochemiczne, czy też czynniki zewnętrzne np. pobieranie pokarmu i wody przez zwierzęta, powodujące fluktuacje (nie koniecznie negatywne) tempa rozkładu składników pokarmowych, jakie mają miejsce w żwaczu. Dlatego też, badania prowadzone metodą *in vitro* lub wykonywane w mikroskali m.in. zakiszanie materiału roślinnego w mikrosilosach, powinny być potwierdzone na zwierzętach lub w warunkach produkcyjnych, co słusznie zauważyła Doktorantka w końcowej części dyskusji, w odniesieniu do oceny mikrobiomu kiszonek.

W końcowej części dysertacji Doktorantka dokonuje zwięzłego ***Podsumowania*** zadań badawczych. Recenzentowi zdecydowanie ułatwia to końcową ocenę pracy. W doświadczeniu I Kandydatka stwierdza m.in., że najwyższą jakość fermentacyjną i ograniczenie degradacji białka właściwego uzyskały kiszonki z 40 i 50% udziałem komonicy zwyczajnej. W doświadczeniu II wykazano, że dodatek łuski bobiku do zakiszanej lucerny obniżył wartość pokarmową kiszonek, poprzez zmniejszenie ilości BO i zwiększenie udziału ligniny. Natomiast dodatek 12, 18 i 24% łuski bobiku obniżył tempo rozkładu BO *in vitro*. W ostatnim doświadczeniu Doktorantka zwróciła uwagę, że zastosowanie suchego lodu w zakiszaniu lucerny nie wpłynęło na przebieg fermentacji. Stwierdzono natomiast wpływ czasu przewiędnięcia lub interakcję obu czynników doświadczalnych. Na koniec opracowania, Doktorantka zredagowała 10 poprawnych ***wniosków***, w których odniosła się do postawionych hipotez i które są logicznie związane z uzyskanymi wynikami badań. ***Bibliografia*** liczy 393 pozycje, z czego ponad 16% stanowią artykuły opublikowane w ostatnich pięciu latach.

Podsumowanie oceny rozprawy doktorskiej

Problematyka poruszona w rozprawie doktorskiej pt. „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny" przez mgr inż. Martę B. Borsuk-Stanulewicz jest aktualna i niezwykle ważna, z punktu widzenia, poprawy efektu procesu zakiszania lucerny i uzyskania dobrej jakości paszy białkowej. Dobrze wpisuje się w nurt badań nad poszukiwaniem dodatków do kiszonek wpływających na podniesienie wartości pokarmowej i jakości pasz konserwowanych. Przeprowadzenie badań, wymagało od Doktorantki, ale również od członków zespołu, dużego zaangażowania, czasu i

nakładu pracy. Bez wątpienia, rozprawa doktorska posiada potencjał poznawczy, a uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w praktyce. Przedstawione przeze mnie uwagi i sugestie do poszczególnych rozdziałów dysertacji, mają przede wszystkim na celu przygotowanie pracy do druku. Wyrażam również nadzieję, że Doktorantka ustosunkuje się do moich komentarzy i wskazówek podczas publicznej obrony.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz pt. „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny", wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny naukowej zootechnika i rybactwo, posiada dużą wartość zarówno pod względem naukowo-poznawczym jak i aplikacyjnym. Zostały spełnione warunki określone w *art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.)*. W związku z powyższym przedkładam Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Doświadczenia przeprowadzone przez Doktorantkę mają charakter badań kompleksowych, na które składają się prace badawcze nad poprawieniem warunków fermentacji podczas zakiszania lucerny, prowadzące do polepszenia wartości pokarmowej oraz jakości uzyskanych pasz. W konsekwencji, otrzymanie dobrej kiszonki, rzutuje na uzyskanie wysokiej jakości produktu końcowego pochodzenia zwierzęcego, na który jest coraz większe zapotrzebowanie konsumentów. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę bez wątpienia, mogą znaleźć zastosowanie w żywieniu zwierząt gospodarskich, w szczególności bydła wysokoprodukcyjnego. Na szczególną uwagę zasługują wyniki prac badawczych poświęconych określeniu liczebności i struktury mikrobiomu kiszonek. Biorąc powyższe pod uwagę, wnoszę do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz pt. „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny".

Dr hab. Barbara Kowalik, profesor instytutu