Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań

Dr hab. Barbara Stefańska
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii
Katedra Łąkarstwa i Krajobrazu Przyrodniczego

Poznań, 08.03.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej 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" wykonanej pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Cezarego Purwina oraz Promotora pomocniczego dr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego w Katedrze Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Podstawa formalna:

Pismo przewodnie Pani Prof. dr hab. Doroty Witkowskiej, Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 16.01.2024 r. (WBZ-DZ.6350.2.1.2022).

Recenzję pracy doktorskiej przygotowano zgodnie z wymogami określonymi w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.).

Ocena formalna pracy doktorskiej:

Zarówno Promotor, Promotor pomocniczy jak i Doktorantka złożyli stosowne oświadczenia, co do zgodności opracowania naukowego z warunkami do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego, w tym samodzielnego opracowania problemu badawczego, bez naruszenia praw autorskich osób trzecich.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska 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" przygotowana została w formie monografii naukowej zawierającej łącznie 238 ponumerowanych stron formatu A4. Tytuł dysertacji w pełni odzwierciedla zagadnienia poruszane w opracowaniu naukowym. W pracy zachowano układ typowy dla rozpraw doktorskich obejmujący stronę tytułową, spis treści, wykaz skrótów, streszczenie zarówno

w języku polskim jak i angielskim, wstęp, przegląd piśmiennictwa, hipotezy i cele badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, uogólnienia i wnioski, spisy: literatury, schematów, tabel i wykresów oraz załączniki. Układ pracy doktorskiej jest jasny i logiczny, a kolejność rozdziałów z wyodrębnionymi podrozdziałami nie budzi zastrzeżeń. Przedstawiona do oceny dysertacja naukowa spełnia warunki formalne określone w w/w ustawie oraz jest zgodna z wymogami edytorskimi określonymi w Jednostce Macierzystej.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej:

1. Problem naukowy i znaczenie badań

W najbliższych kilkudziesięciu latach prognozowane jest zwiększenie liczby ludności na świecie z 7,6 do 10,5 mld, co spowoduje konieczność zwiększenia produkcji żywności o ponad 50%. Dynamicznemu rozwojowi demograficznemu towarzyszyć będzie wzrost konsumpcji produktów pochodzenia zwierzęcego, w tym mleka. Dodatkowo, poważnymi problemami społeczno-gospodarczymi są postępujący deficyt wody, duża konkurencja o dostępność gruntów rolnych niezbędnych do produkcji żywności, nadmierna emisja amoniaku oraz metanu i dwutlenku węgla (gazy cieplarniane przyczyniające się do zmian klimatu). Dlatego w najbliższych latach produkcja zwierzęca będzie podlegać dynamicznym zmianom zarówno metod jak i technologii, tak aby spełniała coraz wyższe wymagania w odniesieniu do żywienia i dobrostanu zwierząt oraz ochrony środowiska naturalnego.

Wspólnym mianownikiem zarówno bieżącej sytuacji w hodowli i chowie bydła mlecznego jak i przedstawionej wizji produkcji mleka w najbliższych kilkudziesięciu latach jest dynamiczny wzrost zapotrzebowania na składniki pokarmowe (energia i białko) rosnące wraz z wydajnością oraz coraz większe trudności w ich zaspokojeniu. Krowy mleczne jako przeżuwacze ze względu na specyficzną budowę układu pokarmowego są doskonale przygotowane do pobierania i produkcji energii z pasz objętościowych zawierających węglowodany strukturalne. Z drugiej strony aktualnie wyzwaniem jest maksymalizacja wykorzystania składników pokarmowych z wyżej wymienionych pasz w dawkach dla wysoko wydajnych krów mlecznych w tym również białka, co pozwoliłoby na lepszą konwersję i ograniczenie niekorzystnego oddziaływania tej grupy zwierząt gospodarskich na środowisko naturalne (m. in. emisja amoniaku). Mając na uwadze przytoczone zależności kluczowym działaniem wydaje się być doskonalenie technologii produkcji pasz objętościowych konserwowanych białkowych w tym z roślin bobowatych grubo- i drobnonasiennych.

W krótkim wstępie Autorka wskazuje lucernę siewną (*Medicago sativa* L.) wśród roślin bobowatych drobnonasiennych jako wieloletnią, odporną na suszę, roślinę paszową umożliwiającą produkcję bardzo wysokiego plonu białka ogólnego. Z drugiej jednak strony, ze względu na niskie minimum cukrowe oraz dużą pojemność buforową lucerna siewna klasyfikowana jest do roślinnego materiału paszowego trudno ulegającemu zakiszaniu. Dodatkowo, błędy popełniane w technologii produkcji kiszonki z lucerny wpływają na znaczne modyfikacje w składzie chemicznym w tym zmianach w profilu aminokwasowym, postaci białka właściwego w formy o niekorzystnie wyższym rozkładzie żwaczowym lub silnie zdegradowane, co skutkuje między innymi obniżeniem efektywności syntezy białka mikrobiologicznego w żwaczu zwierząt przeżuwających. Mając na uwadze powyższe zależności Autorka słusznie uzasadniła istotę podjętych działań związanych z przeprowadzeniem kompleksowych badań naukowych mających na celu zbadanie sposobów hamowania proteolizy podczas zakiszania lucerny, co równocześnie mogłoby zwiększyć możliwości wykorzystania tej paszy objętościowej konserwowanej w żywieniu zwierząt przeżuwających. Należy więc uznać, że tematyka podjęta przez Panią mgr inż. Martę Barbarę Borsuk-Stanulewicz w ramach pracy naukowej jest w pełni uzasadniona o dużym znaczeniu naukowym i praktycznym.

Autorka konsekwentnie dokonuje przeglądu piśmiennictwa, a jako kluczowe aspekty poruszane w tym rozdziale rozprawy doktorskiej można wskazać przedstawienie wiedzy stanowiącej wprowadzenie do ogólnej problematyki badawczej w następujących obszarach:

- znaczenie gospodarcze lucerny;
- charakterystyka związków azotowych i ich przemian podczas zakiszania;
- omówienie wybranych wskaźników charakteryzujących zakres proteolizy w materiale kiszonkarskim;
- wskazanie metod możliwości ograniczenia proteolizy białka podczas zakiszania lucerny.

Przegląd literatury jest merytorycznie spójny, w pełni odzwierciedla zagadnienia poruszane w pracy oraz umożliwia trafny wybór kierunku, zakresu i metod prowadzenia badań naukowych. W tym fragmencie przedstawionej do oceny pracy doktorskiej stwierdzono nieliczne błędy stylistyczne lub użycie sformułowań języka potocznego, które nie umniejszają wartości poznawczych przedstawionych w rozdziale, np.:

- „wcześniejsze badania wykazały, że dodatek *Lactobacillus buchnerii* (....), przy czym spadek pH był znacznie wolniejszy w porównaniu do traktowania innymi dodatkami bakteryjnymi", s. 24;
- „w innych badaniach lucerna traktowana celulazą (....)", s. 26;

- „inne źródło tanin można uzyskać poprzez dodatek rośliny zasobnych właśnie w te polifenole (….)", s. 28;
- „(…), gdyż działały inhibitująco na bogactwo i różnorodność mikrobiomu bakteryjnego", s. 29;
- „(…) forma uśpiona enzymu", s. 29;
- „(…) komonica zwyczajna jest równie wartością roślinną do zakiszania podobnie jak lucerna", s. 32;
- „łuska, (….) jako by-product", s. 33.

2. Zdefiniowanie hipotez i celów badawczych

Doktorantka zawarła cztery założenia badawcze zakładające możliwość zakiszania lucerny z komonicą zwyczajną lub łuską bobikową jako źródeł tanin oraz ditlenkiem węgla jako metody skrócenia fazy tlenowej fermentacji na ograniczenie procesu proteolizy, wskaźniki przebiegu fermentacji i mikrobiomu kiszonek. Autorka podczas formułowania hipotez badawczych nie uniknęła jednak przeoczeń, mających znaczenie merytoryczne – nie wspomniała o rozkładzie żwaczowym *in vitro* białka lucerny, który występuje zarówno w tytule pracy doktorskiej jak i celach badawczych. W kolejnym rozdziale zostały przedstawione cztery cele badawcze, które w mojej opinii mogłyby zostać wyrażone w dwóch, gdyż zarówno drugi jak i czwarty w sposób ogólny został zawarty w pierwszym.

3. Materiał i metody badań

Weryfikacja założonych hipotez badawczych została przeprowadzona w formie trzech zadań doświadczalnych zrealizowanych w latach 2020-2022. W poszczególnych zadaniach analizowano wpływ różnych poziomów dodatku komonicy zwyczajnej, łuski bobikowej oraz suchego lodu (ditlenek węgla) na skład chemiczny, wskaźniki jakościowe przebiegu fermentacji, rozkład żwaczowy *in vitro* zarówno suchej masy jaki i białka ogólnego oraz mikrobiom kiszonek z lucerny. Opis doświadczeń został wzbogacony przygotowanymi przez Doktorantkę przejrzystymi, autorskimi schematami zastosowanych układów doświadczeń, co znacznie ułatwia ocenę merytoryczną.

Badania zostały przeprowadzone w komercyjnych plantacjach zlokalizowanych na terenie północnej Polski w obrębie jednej gminy, co umożliwiło przygotowanie kiszonek z roślinnego materiału kiszonkarskiego pozyskanego z obszaru o zbliżonych warunkach glebowo-klimatycznych. Ponadto, w opisie wszystkich zadań badawczych podano szczegółowe informacje dotyczące charakterystyki roślinnego materiału doświadczalnego zawierające numer pokosu i fazy rozwojowej roślin (początek pączkowania) w momencie zbioru oraz postępowania podczas przygotowania kiszonek zgodnie z przyjętymi założeniami

doświadczalnymi. W okresie realizacji badań wykonano w próbach materiałów paszowych szereg analiz chemicznych, mikrobiologicznych oraz rozkładu żwaczowego *in vitro* suchej masy i białka ogólnego. W tym miejscu należy podkreślić, że Doktorantka wykazała się bardzo dużym zaangażowaniem i zdolnościami organizacyjnymi, co potwierdza wykonanie zróżnicowanych i ambitnych zadań badawczych oraz bardzo szerokiego spektrum analiz laboratoryjnych.

Uzyskane wyniki poddano właściwie dobranej, przeprowadzonej analizie statystycznej i interpretacji graficznej przy użyciu programów komputerowych XLSTAT (XLSTAT, Addinsoft, UK), Statistica ver. 13.3 (StatSoft, 2013), a także SigmaPlot ver. 12 (SigmaPlot, San Diego, CA, USA). Jedyna uwaga do tej części pracy sprowadza się do braku wyszczególnienia precyzyjnych modeli statystycznych przeprowadzonej jedno- (zadanie badawcze I) lub dwuczynnikowej (zadanie badawcze II i III) analizy wariancji.

Mając na uwadze nowatorski charakter założeń doświadczalnych (jak w przypadku m. in. zastosowania ditlenku węgla w postaci suchego lodu, co potwierdza nieliczne piśmiennictwo w tym zakresie) oraz szerokie spektrum przeprowadzonych analiz laboratoryjnych i statystycznych jednoznacznie można stwierdzić, że Autorka w bardzo dobrym stopniu opanowała warsztat badawczy i wykazuje się dużą dojrzałością naukową. W ocenie merytorycznej tego rozdziału z myślą o dalszej pracy naukowej Doktorantki i kontynuacji podjętej tematyki badawczej nasuwa się również sugestia dotycząca poszerzenia zakresu analizowanych czynników doświadczanych i podjęcia badań mających na celu określenie wpływu zakiszania lucerny z różnymi źródłami tanin w zależności od zawartości suchej masy roślinnego surowca kiszonkarskiego.

4. Wyniki badań wraz z dyskusją

Autorka w kolejnym, objętościowo najobszerniejszym rozdziale dysertacji doktorskiej liczącym łącznie 68 stron przedstawiła uzyskane wyniki w formie opisu oraz licznych tabel i wykresów. Ponadto, w obrębie rozdziału wyznaczyła w sposób spójny i logiczny trzy podrozdziały zawierające rezultaty poszczególnych zadań badawczych, których opis merytoryczny wskazuje na konsekwentną weryfikację założeń i celów badawczych. Wśród najważniejszych osiągnięć naukowych uzyskanych w ramach realizacji poszczególnych zadaniach badawczych przedstawionych również w dalszych rozdziałach w tym podsumowaniu oraz uogólnieniach i wnioskach należy wskazać:

- zakiszanie lucerny z komonicą zwyczajną w relacji 50:50 wpłynęło pozytywnie na ograniczenie hydrolizy białka właściwego oraz mikrobiom kiszonki (eudominanta bakterie kwasu mlekowego);

- zakiszanie lucerny z dodatkiem łuski bobikowej od 18,0 do 24 % wpłynęło pozytywnie na ograniczenie proteolizy, przy jednoczesnym negatywnym wpływie na zawartość niestrawnej frakcji białka ogólnego i wartość pokarmową kiszonki;
- wpływ źródła tanin na efektywność ograniczenia hydrolizy białka właściwego lucerny – wyższa z komonicy zwyczajnej w porównaniu do łuski bobikowej;
- zastosowanie suchego lodu podczas zakiszania zielonki z lucerny wpłynęło pozytywnie na ograniczenie przemian proteolitycznych;
- zarówno zastosowana dawka suchego lodu (1 g i/lub 2) jak i stopień przewiędnięcia zielonki (po 12 h i 24 h) wpłynęły na skład frakcji białka ogólnego kiszonki z lucerny, jednakże ich najkorzystniejsza kompilacja (obniżenie PA1 i PA2 przy jednoczesnym podwyższeniu PB1) została stwierdzona w kiszonce sporządzonej z przewiędniętej lucerny (po 24 h) niezależnie od poziomu zastosowanego suchego lodu;
- stopień przewiędnięcia zielonki z lucerny niezależnie od zastosowanej dawki suchego lodu wpłynęły na strukturę mikrobiomu kiszonki z dominacją bakterii kwasu mlekowego.

Dobre przygotowanie merytoryczne do prowadzenia badań naukowych Pani mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz potwierdza kolejny rozdział pracy doktorskiej zawierający szczegółową dyskusję uzyskanych wyników, popartą właściwie dobraną bibliografią zarówno polsko- jaki anglojęzyczną liczącą łącznie 393 pozycje literaturowe. W obrębie tego rozdziału wyznaczono również trzy podrozdziały, które konsekwentnie w swoim brzmieniu odpowiadają podrozdziałom zawartym w sekcji *„Wyniki"* i odnoszą się do charakterystyki chemicznej, przemian związków azotowych, rozkładalności żwaczowej *in vitro* zarówno zielonek jak i kiszonek oraz ich mikrobiomu. Autorka zestawiając liczne piśmiennictwo przedstawiające aktualny stan wiedzy w zakresie przeprowadzonych badań naukowych nie uniknęła przeoczeń (wymienione poniżej), które nie umniejszają wartości merytorycznych przedstawionej do oceny dysertacji doktorskiej i mają jedynie charakter edytorski:
- piśmiennictwo zawarte w treści pracy doktorskiej – brak w spisie literatury (Li i in., (2023), s. 11; Hymes-Fecht i in., (2003), s. 32; Pagella i in., (2017), s. 156; Sousa i in., (2019), s. 176; Broderick, (2018), s. 177; Wilson i Kennedy (1996), s. 179);
- piśmiennictwo zawarte w spisie literatury – brak w treści pracy doktorskiej (Grabber (2008), poz. 103; Pagella i in., (2018), poz. 266).

Na podstawie analizy i oceny dysertacji doktorskiej nasuwają się poniższe sugestie i pytania, wyrażając równocześnie swoje oczekiwania dotyczące sformułowania odpowiedzi i opinii przez Doktorantkę podczas publicznej obrony:

1. Czy oprócz fazy rozwojowej uwzględniono również inne wskaźniki np. zawartość suchej masy zarówno w lucernie jak i komonicy zwyczajnej w dniu zbioru zielonek?

2. Jakie zastosowano odmiany lucerny i komonicy zwyczajnej w pierwszym zadaniu badawczym?

3. Dlaczego w drugim zadaniu badawczym zastosowano słomę pszenną jako absorbent stanowiący grupy kontrolne pozytywne dla grup doświadczalnych zawierających zróżnicowane poziomy łuski bobikowej?

4. Na jakiej podstawie określono poziomy dodatku (od 0 % do 24 %) łuski bobikowej podczas sporządzania kiszonek z lucerny?

5. Dlaczego w trzecim zadaniu badawczym zastosowano suchy lód o konkretnej średnicy 16 mm?

6. Dlaczego nie wykonano analizy zawartości tanin w kiszonkach sporządzonych z lucerny zakiszanej z komonicą zwyczajną oraz łuską bobikową?

W praktyce podawanie tanin w dawkach pokarmowych dla krów mlecznych spowalnia pasaż treści przez układ pokarmowy, co może pozytywnie wpływać na strawność składników pokarmowych i poprawić wykorzystanie białka (mniejszy rozkład w żwaczu, więcej białka *by-pass*), a tym samym pośrednio ograniczyć emisję azotu do środowiska naturalnego. Z drugiej jednak strony podawanie nadmiaru tego dodatku fitobiotycznego może negatywnie wpływać na pobranie suchej masy dawki pokarmowej i skorelowanymi z nim wynikami produkcyjnymi (wydajność, płodność). Mając na uwadze powyższe zależności optymalizacja dawki tanin pochodzących z kiszonek przygotowanych zgodnie z przedstawionymi założeniami badawczymi byłaby szczególnie intersująca w aspekcie praktycznym, gdyż aktualna technologia produkcji mleka opiera się na żywieniu wysoko wydajnej krowy mlecznej w laktacji dawką pokarmową o znacznym udziale pasz objętościowych konserwowanych.

7. Tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę w ramach pracy naukowej jest nowatorska o dużym znaczeniu naukowym i praktycznym. Dlatego proszę o wskazanie rezultatów będących efektem realizacji przeprowadzonych badań, które można bezpośrednio zaimplementować do szeroko pojętej praktyki rolniczej?

Ocena końcowa:

Podsumowując należy podkreślić, że uzyskane przez Autorkę osiągnięcia dotyczące określenia różnych mechanizmów hamowania proteolizy podczas zakiszania lucerny wnoszą nowe wartości poznawcze do aktualnego stanu wiedzy oraz wpływają na rozwój dyscypliny

zootechnika i rybactwo. Ponadto, stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja doktorska Pani mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz do dalszego procedowania postępowania doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość merytoryczną i nowatorski charakter przeprowadzonych badań oraz możliwość wykorzystania w praktyce wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o wyróżnienie dysertacji doktorskiej Pani mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz. W uzasadnianiu chciałabym podkreślić dociekliwość badawczą Doktorantki, która od momentu sformułowania założeń i celów badawczych konsekwentnie realizowała swoje zamierzenia, wykazując się przy tym bardzo dobrą znajomością nowatorskich metod i technik badawczych oraz statystycznych. Na uznanie zasługuje również fakt dużej pracochłonności podjętych badań oraz rzetelna i dogłębna analiza uzyskanych wyników, które w przyszłości z pewnością będą podstawą do przygotowania wartościowych, oryginalnych publikacji naukowych.

Barbara Stefańska

Dr hab. Barbara Stefańska