UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ BIOINŻYNIERII ZWIERZĄT

Dziedzina nauk rolniczych

Dyscyplina zootechnika i rybactwo

mgr inż. Marta Barbara Borsuk-Stanulewicz

Rozprawa doktorska

Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny

The effect of additives with different proteolysis inhibition mechanisms on the composition of protein fractions, silage microbiome and rumen degradability of alfalfa protein

Praca wykonana w Katedrze Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła

Promotor: prof. dr hab. Cezary Purwin

Katedra Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Promotor pomocniczy: dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki

Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Wydział Rolnictwa i Leśnictwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2023

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie 4
Streszczenie 6
Summary 7
1. Wstęp 8
2. Przegląd piśmiennictwa 11
2.1. Znaczenie gospodarcze lucerny 11
2.2. Związki azotowe i ich przemiany podczas zakiszania 14
2.3. Wybrane wskaźniki charakteryzujące zakres proteolizy w roślinie 20
2.4. Metody ograniczenia proteolizy białka lucerny 22
2.5. Proponowane metody ograniczenia proteolizy w zakiszaniu lucerny 31
3. Hipotezy badawcze 35
4. Cele pracy 36
5. Materiał i metody badań 37
5.1. Układ doświadczeń 37
5.2. Przygotowanie kiszonek 40
5.2.1. Zadanie badawcze I 40
5.2.2. Zadanie badawcze II 40
5.2.3. Zadanie badawcze III 41
5.3. Analizy chemiczne 41
5.4. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* 44
5.5. Analizy mikrobiologiczne 46
5.6. Obliczenia i analizy statystyczne 49
5.6.1. Obliczenia 49
5.6.2. Ocena i przygotowanie danych do analiz statystycznych 51
5.6.3. Analizy statystyczne 52
5.6.3.1. Analizy wyników opisujących parametry kiszonek 52
5.6.3.2. Analizy rozkładalności żwaczowej 53
5.6.3.3. Analizy mikrobiomu bakteryjnego kiszonek 54
6. Wyniki 55
6.1. Zadanie badawcze I 55
6.1.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek 55
6.1.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek 58

6.1.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek 63
6.1.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych 69
6.2. Zadanie badawcze II 73
6.2.1. Charakterystyka chemiczna zielonki i kiszonek 73
6.2.2. Związki azotowe zielonki i kiszonek 77
6.2.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonki i kiszonek 82
6.2.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych 90
6.3. Zadanie badawcze III 97
6.3.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek 97
6.3.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek 102
6.3.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek 107
6.3.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych 117
7. Dyskusja 124
7.1. Zadanie badawcze I 124
7.1.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek 124
7.1.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek 128
7.1.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek 133
7.1.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych 136
7.2. Zadanie badawcze II 144
7.2.1. Charakterystyka chemiczna zielonki i kiszonek 144
7.2.2. Związki azotowe zielonki i kiszonek 151
7.2.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonki i kiszonek 156
7.2.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych 160
7.3. Zadanie badawcze III 166
7.3.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek 166
7.3.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek 172
7.3.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek 177
7.3.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych 180
8. Podsumowanie 186
9. Uogólnienia i wnioski 189
10. Spis literatury 191
11. Spis schematów, tabel i wykresów 229
12. Załączniki 233

Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie

ADF	włókno kwaśno-detergentowe
ADICP	białko ogólne nierozpuszczalne w kwaśnym detergencie
ADIN	azot nierozpuszczalny w kwaśnym detergencie
ADL	lignina kwaśno-detergentowa
AHC	aglomeracyjne grupowanie hierarchiczne
BC	pojemność buforowa
BO	białko ogólne (surowe)
BSN	azot rozpuszczalny w buforze
CNCPS	*ang. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System*
CO_2	dwutlenek węgla
CT	taniny skondensowane
FM	świeża masa
HT	taniny hydrolizujące
N	azot
NDF	włókno neutralno-detergentowe
NDICP	białko ogólne nierozpuszczalne w neutralnym detergencie
NDIN	azot nierozpuszczalny w neutralnym detergencie
NH_3	amoniak
N-NH_3	azot amoniakalny
$N_{ogólny}$	azot ogólny
NPN	związki azotowe niebiałkowe
PA1	azot amoniakalny
PA2	białko rozpuszczalne w buforze
PB1	białko nierozpuszczalne w buforze
PB2	białko związane z włóknem
PC	białko niestrawne
PPO	oksydaza polifenolowa
PS	popiół surowy
R^2	współczynnik determinacji
RUBISCO	karboksylaza rybulozo-1,5-bisfosforanu
SCP	białko rozpuszczalne w buforze
SM	sucha masa

TP	białko właściwe
TS	tłuszcz surowy
WS	włókno surowe
WSC	cukry rozpuszczalne w wodzie

Streszczenie

Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny

Celem głównym pracy była ocena skuteczności dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy poprzez analizę składu frakcji białkowych, rozkładalności żwaczowej *in vitro* białka oraz mikrobiomu kiszonek z lucerny. Dodatkowymi celami było określenie optymalnego poziomu dodatków, ocena możliwości wykorzystania łuski bobiku jako dodatku kiszonkarskiego oraz określenie skuteczności działania suchego lodu w zależności od stopnia przewiędnięcia lucerny przed zakiszeniem.

Powyższe cele zostały zrealizowane w trzech zadaniach badawczych. Lucernę zakiszano w różnych proporcjach z komonicą zwyczajną (zadanie badawcze I), z różnym dodatkiem łuski bobikowej (zadanie badawcze II) oraz z różnym dodatkiem suchego lodu przy trzech stopniach przewiędnięcia surowca (zadanie badawcze III).

Na podstawie uzyskanych rezultatów należy stwierdzić, że najefektywniejszym dodatkiem w ograniczeniu proteolizy zakiszanej lucerny było współzakiszanie z komonicą zwyczajną w proporcjach 50:50, jak i również zastosowanie dodatku suchego lodu na poziomie 1 g i/lub 2 g do przewiędniętej lucerny. Dodatek łuski bobiku okazał się skuteczny w hamowaniu proteolizy, ale dopiero na poziomie 18,0% i 24,0%, co obniżyło wartość paszową kiszonek i zwiększyło udział niestrawnej frakcji białka ogólnego. Najniższą rozkładalnością białka ogólnego *in vitro* charakteryzowały się kiszonki lucerny z komonicą zwyczajną.

Słowa kluczowe: lucerna, proteoliza, frakcje białkowe, rozkładalność *in vitro*, mikrobiom kiszonki

Summary

The effect of additives with different proteolysis inhibition mechanisms on the composition of protein fractions, silage microbiome and rumen degradability of alfalfa protein

The main objectives of this study were to evaluate the effectiveness of additives with different mechanisms of proteolysis inhibition by analyzing the composition of protein fractions, *in vitro* rumen degradability of protein and the microbiome of alfalfa silage. Additional objectives were to determine the optimum level of additives, to evaluate the feasibility of using faba bean husk as a silage additive, and to determine the effectiveness of dry ice depending on the degree of alfalfa wilting before ensiling

The above objectives were achieved in three research tasks. Alfalfa was ensiled in different proportions with bird's-foot trefoil (research task I), faba bean husk (research task II) and dry ice at three degrees of wilting of the plant material (research task III).

Based on the results, it should be concluded that the most effective addition in reducing proteolysis of ensiled alfalfa was the co-silage with bird's-foot trefoil in a 50:50 ratio, as well as the application of dry ice addition at the level of 1 g and/or 2 g to the wilted alfalfa. The addition of faba bean husk proved effective in inhibiting proteolysis, but only at levels of 18.0% and 24.0%, which lowered the silage value and increased the proportion of the indigestible fraction of crude protein. Alfalfa silage with bird's-foot trefoil had the lowest *in vitro* degradability of protein.

Key words: alfalfa, proteolysis, protein fractions, *in vitro* degradability, silage microbiome

1. Wstęp

Sektor produkcji zwierzęcej przeżuwaczy stoi obecnie w obliczu wielu globalnych wyzwań, takich jak zanieczyszczanie środowiska, zmiany populacji ludzkiej czy bezpieczeństwo żywnościowe. Towarzyszy temu wzrost konkurencji sektorów produkcji zwierzęcej i żywności o grunty orne, wykorzystywane w celach paszowych oraz żywnościowych. Dotychczasowe zmiany klimatyczne regionów geograficznych, w których rolnictwo jest silnie uwarunkowane poziomem opadów, przyczyniły się do wzmożenia globalnego niepokoju o dostępność wystarczającej ilości nie tylko produktów żywnościowych dla ludzi, ale także pasz dla zwierząt (Khanal, Mishra, 2017; Wheeler, Von Braun, 2013).

Pośród argumentów dotyczących ograniczenia populacji przeżuwaczy wskazuje się na nadmierną emisję metanu i azotu do środowiska, a także wynikający z tego niski stopień wykorzystania energii oraz azotu skarmianych pasz (Jayet, Isbasoiu, de Cara, 2020; Ripple i in., 2014). Z drugiej strony zwierzęta te wyróżnia zdolność konwersji na produkty zwierzęce, pasz nie nadających się do spożycia przez ludzi (Mottet i in., 2017) oraz efektywne wykorzystanie roślin alternatywnych (Röös i in., 2017) oraz gruntów nieodpowiednich do uprawy roślin spożywczych (Moorby, Fraser, 2021). Właściwa suplementacja dawek wraz z wysoką jakością pasz objętościowych zasobnych w wartościowe białko może ograniczyć emisję, zwiększając strawność i efektywność wykorzystania składników pokarmowych diet przeżuwaczy (Herrero i in., 2016; Knapp, Laur, Vadas, Weiss, Tricarico, 2014).

Wyzwaniem jest maksymalizacja efektywności wykorzystania składników pokarmowych pasz objętościowych w dawkach dla przeżuwaczy, przede wszystkim białka, co pozwoli na wyższą konwersję i ograniczenie związanego z tym śladu środowiskowego (Moorby, Fraser, 2021). Produkcja żywności w oparciu o przeżuwacze ma więc duży potencjał do poprawy efektywności przy racjonalnym zastosowaniu wysokiej jakości pasz białkowych. Spowoduje to wzrost znaczenia roślin bobowatych grubo- i drobnonasiennych, bogatych w wartościowe białko (Halmemies-Beauchet-Filleau i in., 2018; Kulkarni i in., 2018). Rośliny te w większym stopniu mogą spełniać rolę alternatywy dla drogiego, importowanego białka pasz treściwych (Moorby, Fraser, 2021). Ponadto posiadają biologiczną zdolność do wiązania azotu atmosferycznego, dzięki czemu umożliwiają zmniejszenie nawożenia mineralnego, pozytywnie wpływając

na stan środowiska naturalnego i zmniejszenia śladu węglowego produkcji zwierzęcej (Watson i in., 2017).

Pośród roślin bobowatych drobnonasiennych najczęściej i najchętniej uprawianą na świecie jest lucerna siewna (*Medicago sativa* L.). Jej uprawa daje możliwość uzyskania wysokiego plonu białka ogólnego, wynoszącego od 2 do 3 $Mg \cdot ha^{-1}$, który przewyższa trzykrotnie plon białka soi oraz czterokrotnie plon białka pszenicy (Rafińska, Pomastowski, Wrona, Górecki, Buszewski, 2017). Jest rośliną wieloletnią, odporną na suszę, nie wymagającą intensywnego nawożenia, ponadto pozostawia po sobie bardzo dobre stanowisko, co przyczynia się do jej ciągłego wzrostu udziału w światowym bilansie upraw (Kulkarni i in., 2018). W ostatnich latach w rejonach Polski o niskiej średniej opadów, lucerna zaczęła wypierać z dawek pokarmowych przeżuwaczy trawy, stając się jednym z podstawowych składników diet wysokowydajnych zwierząt, obok kiszonki z kukurydzy (Purwin i in., 2020).

Jednakże lucerna jest rośliną o niskiej przydatności do zakiszania, co wynika ze stosunkowo niewielkiej zawartości cukrów rozpuszczalnych w wodzie, wysokiej pojemności buforowej, a także wysokiej zawartość białka ogólnego (Besharati i in., 2022; Lin i in., 2023). Straty podczas zakiszania lucerny dotyczą zmiany postaci białka właściwego w formy o wyższej rozpuszczalności lub silnie zdegradowane, skutkując obniżeniem wydajności syntezy białka bakteryjnego w żwaczu. Procesom tym towarzyszą zmiany składu aminokwasowego i powstawanie kompleksów białkowo-węglowodanowych, czego efektem jest wzrost udziału frakcji białka nierozpuszczalnego w kwaśnym detergencie, które nie jest trawione w przewodzie pokarmowym zwierząt (Fijałkowska, Pysera, Lipiński, Strusińska, 2015; Tao, Sun, Li, Xu, Cai, 2019; Yuan, Wen, Desta, Dong, Shao, 2016). Konsekwencją jest nieefektywne wykorzystanie azotu ogólnego paszy i konieczność suplementowania dawek pokarmowych białkiem pasz treściwych (Huhtanen, Nousiainen, Rinne, Kytölä, Khalili, 2008). Obniżenie wartości paszowej białka podczas zakiszania jest obecne także u innych roślin paszowych, jednak intensywność przemian jest znacznie niższa w porównaniu z lucerną (Fijałkowska i in., 2015).

Dotychczas literatura nie podaje zadowalających, spójnych i wykonalnych sposobów hamowania proteolizy podczas zakiszania lucerny. Przedstawione rozwiązania często są trudne do wdrożenia w aspekcie ekonomicznym i nakładów pracy w warunkach gospodarczych (Guo, Cheng, Yang, Zhou, 2011; Ke i in., 2022). Znaczącym wyzwaniem jest znalezienie możliwości maksymalizacji efektywności wykorzystania potencjału

paszowego lucerny jako kiszonki, której znaczenie w żywieniu przeżuwaczy niezmiennie rośnie (Tedeschi, Muir, Riley, Fox, 2015). Pozwoli to na obniżenie kosztów żywienia przeżuwaczy oraz ograniczy uzależnienie od pasz importowanych pochodzących często z upraw niezrównoważonych (Lüscher, Mueller-Harvey, Soussana, Rees, Peyraud, 2014).

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1. Znaczenie gospodarcze lucerny

Lucerna siewna obok lucerny mieszańcowej (*Medicago media* Pers.) i koniczyn (*Trifolium* L.) jest jedną z najchętniej uprawianych roślin bobowatych drobnonasiennych na świecie z rodziny *Fabaceae*. Wywodzi się z południowo-zachodniej Azji, obszaru Persji, terenu dzisiejszego Iranu (Bhattarai, Biswas, Fu, Biligetu, 2020; Bouton, 2012). Gatunek był uprawiany już od czasów starożytnych, a wysoka zdolność adaptacyjna do zmiennych warunków środowiskowych sprawiła, że lucerna stała się rośliną ekspansywną, która objęła swoim zasięgiem różnorodne regiony świata, w tym wiele terenów europejskich (Blume, Hoischen-Taubner, Sundrum, 2021; Li i in., 2023). Dzięki szerokiemu zakresowi tolerancji uprawa lucerny jako rośliny jadalnej i paszowej zajęła tereny od bardzo zimnych północnych równin po wysokogórskie doliny, od najzasobniejszych regionów rolniczych klimatu umiarkowanego, poprzez klimat śródziemnomorski do terenów ubogich w składniki pokarmowe (Bora, Sharma, 2011a). W klimacie o łagodnych zimach może być uprawiana przez 3 – 4 lata, a w przypadku mroźnych zim uprawa może trwać nawet przez okres 6 – 9 lat (FAO, 2017). Globalny areał uprawy szacuje się na około 30 mln ha (Bhattarai i in., 2020). Zgodnie z doniesieniami lucerna zajmuje czwarte miejsce na świecie pod względem powierzchni i wartości ekonomicznej wśród roślin uprawnych, tuż po kukurydzy, soi i pszenicy (Samac, Jung, Lamb, 2016).

W Polsce lucernę można uprawiać na glebach zaliczanych do kompleksu pszennego bardzo dobrego, dobrego oraz wadliwego, a także żytniego bardzo dobrego i dobrego. Wymaga gleb brunatnych, płowych na podłożu wapiennym, mad średnich lub rędzin czarnoziemnych i brunatnych. Optymalny zakres kwasowości gleby wynosi od 6,5 do 7,2. Niewłaściwe dla lucerny będą gleby kwaśne i o wysokim poziomie wód gruntowych. Korzenie lucerny wymagają strukturalnej i przewiewnej gleby, co ma na celu stworzenie korzystnych warunków do rozwoju bakterii brodawkowych. Ponadto roślina posiada niskie wymagania względem nawożenia azotem. Natomiast stosowanie nawozu fosforowego jest niezbędne, gdyż pierwiastek ten uczestniczy w przemianach energetycznych i wpływa na jakość paszy. Uśredniona dawka roczna P_2O_5 w uprawie lucerny w klimacie umiarkowanym powinna wynosić od 40 do 80 $kg \cdot ha^{-1}$, zależnie od zasobności gleb. W nawożeniu lucerny należy zastosować K_2O, średnia dawka powinna wynosić od 80 do 120 $kg \cdot ha^{-1}$ rocznie (Ćwintal, Wilczek, 2008). Plantacja lucerny średnio

może być użytkowana przez okres 4 – 5 lat, gdzie każdego roku plon można zebrać dwu, trzy- lub czterokrotnie w zależności od regionu geograficznego. Znaczenie ekonomiczne opiera się o wysoki potencjał produkcyjny biomasy, wynoszący średnio do 80 $t \cdot ha^{-1}$ świeżej masy i blisko 20 $t \cdot ha^{-1}$ suchej masy. Prace związane ze zbiorem mogą zostać w pełni zmechanizowane, bez konieczności stosowania specjalistycznych maszyn (Nešić, Tomić, Žujović, Krnjaja, 2005; Radović, Lugić, Ignjatović, Delić, 2004).

Jakość i ilość zebranego plonu, odporność na wyleganie i wczesnowiosenny wigor, uważane są za najważniejsze cechy agronomiczne lucerny (McCord i in., 2014). W skutek biologicznej zdolności do symbiozy z bakteriami brodawkowymi, posiada zdolność wiązania azotu atmosferycznego w ilości nawet do 350 kg azotu$\cdot ha^{-1}$ (Carlsson, Huss-Danell, 2003), jest to znacznie więcej niż jest w stanie wprowadzić do gleby uprawa soi (średnio 79 kg azotu$\cdot ha^{-1}$) (Salvagiotti i in., 2008). Cecha ta jest wykorzystywana w uprawie z innymi roślinami paszowymi, w tym z trawami, w skutek czego następuje znaczący transfer azotu do gatunków innych niż bobowate (Rasmussen, Søegaard, Pirhofer-Walzl, Eriksen, 2012). Uprawa w monokulturze maksymalizuje produkcję białka paszowego z jednostki powierzchni (Huyghe, 2003). Lucerna zwiększa zasobność gleby w materię organiczną, poprawiając jej właściwości i żyzność (Bhattarai i in., 2020). Roślina ta wymaga znacznie mniejszych nakładów stosowania środków ochrony roślin w porównaniu do pozostałych upraw paszowych, ponadto chroni glebę przed erozją. Dodatkowym atutem jest bardzo dobrze rozwinięty palowy system korzeniowy, o długości powyżej 6 m, co umożliwia pobieranie wody i składników pokarmowych z głębszych warstw gleby (Bora, Sharma, 2011a). Odporność na częste koszenie i szybkie tempo odrostu lucerny zapewnia efektywniejsze wykorzystanie wody i składników pokarmowych, zwłaszcza w okresach suszy (Porqueddu, Maltoni, McIvor, 2005).

Lucerna jest ważną globalną rośliną uprawną o różnokierunkowym zastosowaniu, z przeznaczeniem na paszę, żywność (Bora, Sharma, 2011a), jako surowiec do produkcji biopaliw w tym etanolu (Hrbáčková i in., 2020), w wytwarzaniu rekombinowanych białek farmaceutycznych (Fu, Grbic, Ma, Tian, 2015) oraz w fitoremediacji (Nirola i in., 2016). Produkowane mączki i ekstrakty białkowe, a także koncentraty soku z lucerny, są atrakcyjnym komponentem żywności dla ludzi w wielu regionach rozwijających się, jako źródło nie tylko wartościowego białka, ale również witamin, składników mineralnych i związków bioaktywnych (Gaweł, Grzelak, Janyszek, 2017). Dlatego też w ostatnich latach zainteresowanie lucerną i jej produktami w żywieniu człowieka znacznie wzrosło (Hadidi, Palacios, McClements, Mahfouzi, Moreno, 2023). Najpowszechniejszym

obecnie kierunkiem wykorzystania są jednak cele paszowe. Lucerna jest skarmiana głównie w żywieniu zwierząt przeżuwających, jak i również w mniejszym odsetku u zwierząt monogastrycznych, jako zielona pasza, kiszonka, sianokiszonka, siano bądź też susz (Bhattarai i in., 2020).

Biomasa lucerny charakteryzuje się wyższą zawartością białka ogólnego w stosunku do innych roślin bobowatych drobnonasiennych (Arlabosse, Blanc, 2011; Chiesa, Gnansounou, 2011). Zawartość tego składnika może wynosić średnio nawet do 230 $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy (Guo, Ding, Han, Zhou, 2008; Ke i in., 2022). Wartości te związane są ze stadium wegetacji rośliny podczas zbioru oraz stosunku liści do łodyg, wynikającym z wysokości cięcia (Popovic, Grljusic, Cupic, Tucak, Stjepanovic, 2001). W lucernie łodygi i liście stanowią odpowiednio około 61% i 39% suchej masy (Tremblay, Belanger, McRae, Michaud, 2002), a ich średnia zawartość białka surowego wynosi odpowiednio 151 g i 358 $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy (Popovic i in., 2001). Białko lucerny jest zasobne w niezbędne aminokwasy, takie jak: walina, leucyna, treonina czy lizyna, których proporcje są zbliżone do standardowego białka jaja kurzego (Rafińska i in., 2017). Średnia koncentracja lizyny może wynosić od 2,0 g do 5,7 g, a metioniny od 1,6 g do 2,0 $g \cdot 100\ g^{-1}$ białka ogólnego, w zależności od przyjętej metody konserwacji (Kyntäjä, Partanen, Siljander-Rasi, Jalava, 2014).

Części nadziemne lucerny są jednym z bogatszych źródeł chlorofilu i witamin A, D, E, K, C, B_1, B_2, B_6, B_{12}, niacyny, kwasu foliowego, biotyny, inozytolu, choliny czy β-karotenu i ksantofilu (Blume i in., 2021; Furgał, Milik, 2008). W składzie chemicznym wyróżnia się znaczne ilości takich składników mineralnych jak: Ca, Cu, K, Fe, Mg, Mn, P, Zn czy Si (Bora, Sharma, 2011a; Bora, Sharma, 2011b; Furgał, Milik, 2008). Liczne badania wykazały także, że roślina ta jest bogatym źródłem związków aktywnych biologicznie, takich jak flawonoidy czy saponiny (Karimi i in., 2013; Rafińska i in., 2017; Tava, Scotti, Avato, 2011). Metabolity wtórne lucerny wykazują zróżnicowaną aktywność, zależnie od odmiany, warunków środowiskowych, fazy fizjologicznej i koncentracji w poszczególnych częściach nadziemnych roślin. Głównym czynnikiem indukującym syntezę wtórnych metabolitów jest obrona przed stresorami i adaptacja do środowiska (Neugart i in., 2018). Saponiny mają charakter przeciw mikrobiologiczny, stanowiąc komponent systemu odporności lucerny. Posiadając właściwości pieniące, saponiny działają również jako naturalny emulgator i środek powierzchniowo czynny poprawiając właściwości powierzchniowe i użytkowe rośliny. Dzięki nim woda nie pozostaje na kwitnących częściach rośliny i nie dochodzi do zakażenia roślin patogenami

(Barna i in., 2022; Rafińska i in., 2017; Wojciechowski, Kezwon, Lewandowska, Marcinkowski, 2014). Flawonoidy stanowią najbogatszą grupę metabolitów wtórnych w lucernie. Większość flawonoidów w komórkach roślinnych występuje w postaci glikozydów. Glikozydy flawonoidowe i wolne aglikony są zaangażowane w patogenne i symbiotyczne interakcje z mikroorganizmami. Działają jako ochrona przed promieniowaniem UV w komórkach roślin, nadają kolor kwiatom i liściom, a także są naturalnymi insektycydami oraz fungicydami (Barna i in., 2022; Goławska, Łukasik, Kapusta, Janda, 2010; Rafińska i in., 2017).

Pośród roślin paszowych lucerna charakteryzuje się najwyższą pojemnością buforową, która warunkowana jest wysoką zawartością wapnia, związków azotowych i krótkołańcuchowych kwasów organicznych (McDonald, Henderson, Heron, 1991). Dodatkowo zawiera znacznie mniej substratów cukrowych, niezbędnych do szybkiego przebiegu fermentacji (Lin i in., 2023). Dodatkowo wysoki udział białka surowego, którego produkty rozpadu neutralizują środowisko utrudnia odpowiednio szybkie i skuteczne zakwaszenie (Muck, 2010). Kiszenie jako naturalny proces fermentacji niesie za sobą straty składników pokarmowych, w tym głównie cukrów rozpuszczalnych w wodzie, oraz duże ryzyko wtórnej fermentacji. Odnotowuje się liczne straty jakościowe azotu białkowego, co jest wynikiem gatunkowej skłonności lucerny do rozległych przemian proteolitycznych (Fijałkowska i in., 2015; Zhang, Yu, Wang, Tian, 2018).

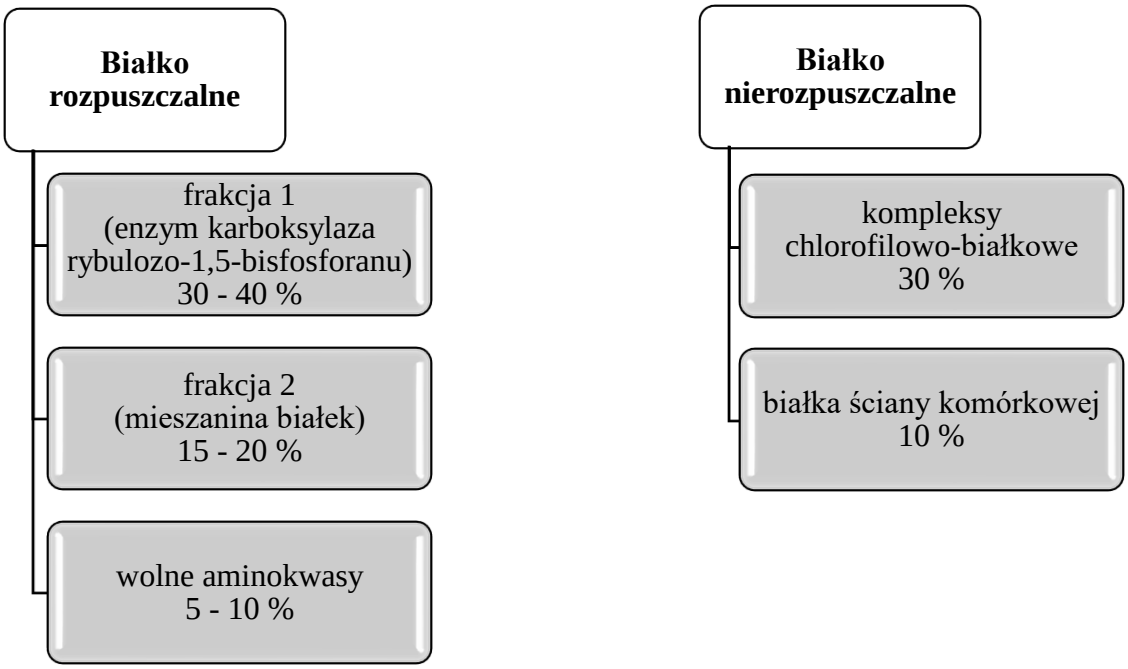
2.2. Związki azotowe i ich przemiany podczas zakiszania

Związki azotowe w roślinie określane jako białko ogólne (surowe), są heterogenną mieszaniną białka właściwego (azot białkowy) i związków azotowych niebiałkowych (Fijałkowska i in., 2015; Yuan i in., 2016). W rosnącej roślinie 75 – 90% azotu ogólnego stanowi białko właściwe, pozostała część to azot niebiałkowy składający się z różnej długości peptydów, wolnych aminokwasów, amidów, nukleotydów, chlorofilu oraz azotanów, a niespełna 1% to azot amoniakalny (Givens, Rulquin, 2004; Martineau, Lapierre, Ouellet, Pellerin, Berthiaume, 2007; McDonald i in., 1991; Tao i in., 2019).

Zawartość białka surowego, jak i również relacje między zawartością białka właściwego oraz związków azotowych niebiałkowych w świeżej roślinie uwarunkowane są fazą wegetacji zbioru, nawożeniem w szczególności azotowym, a także podażą wody (Coblentz, Grabber, 2013; Tremblay i in., 2002; Yang, Wang, Zhao, Wang, 2020). W początkowych fazach wzrostu roślina zawiera zwykle większe ilości azotu niebiałkowego, który złożony jest przede wszystkim z amoniaku, azotanów, wolnych

aminokwasów, amidów i amin (Jones, 2000). Poziom nawożenia azotem wpływa na zawartość wszystkich związków azotowych w roślinie. Jednak zwiększenie koncentracji białka ogólnego w zielonce jest nieproporcjonalne, ponieważ pula azotu białkowego wzrasta znacznie wolniej niż azot niebiałkowy (Buxton, O'Kiely, 2003). Dzieję się tak, ponieważ rośliny korzystają przede wszystkim z mineralnych form pierwiastka takich jak: azotany (Dechorgnat i in., 2011), jony amonowe (Yuan i in., 2007) czy proste związki organiczne, do których należy mocznik (Wang, Hsu, Tsay, 2012). Lucerna jako roślina bobowata, przy niskim nawożeniu azotowym i zdolności symbiotycznego wiązania azotu cząsteczkowego, zwykle w niższym stopniu kumuluje azotany. Niemniej jednak tempo konwersji azotanów do azotu organicznego w komórkach roślinnych warunkowane jest przede wszystkim stopniem intensywności procesu fotosyntezy (Buxton, O`Kiely, 2003).

W zielonce białko właściwe występuje głównie w formie enzymatycznej, a największy udział w liściach ma enzym karboksylaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (Rubisco), który jest pierwszym enzymem w cyklu Calvina. Enzym ten jest pojedynczym białkiem frakcji 1, należącej do białek rozpuszczalnych (Schemat 1). W lucernie enzym karboksylaza rybulozo-1,5-bisfosforanu stanowi od 30% do 40% białka surowego (McDonald i in., 1991; van Vuuren, 1993). W składzie białek rozpuszczalnych druga frakcja (frakcja 2) stanowi około 25% białka liści i jest to mieszanina białek zlokalizowana w chloroplastach, cytoplazmie i częściowo ścianie komórkowej. Pozostałą część stanowią wolne aminokwasy. Białko nierozpuszczalne może stanowić do 50% białka liści i znajduje się w błonie chloroplastów. Membrana tylakoidów, będących podstawowymi elementami budowy wewnętrznej chloroplastu stanowi średnio 30 – 40% białka chloroplastowego, występującego jako kompleksy chlorofilowo-białkowe. Kolejną część białka nierozpuszczalnego stanowi białko związane z celulozą w pierwotnych ścianach komórkowych. Białka te różnią się od roślinnych białek cytoplazmatycznych, gdyż są silnie zasadowymi glikoproteinami, zasobnymi w arabinozę, galaktozę, lizynę, serynę i tyrozynę, a także bogate w hydroksyprolinę (van Vuuren, 1993).



Schemat 1. Proporcje różnych białek występujących w zielonce (źródło: van Vuuren, 1993)

Zmiany ilościowe i jakościowe składu chemicznego rośliny rozpoczynają się w momencie ścięcia i trwają aż do skarmienia dojrzałej kiszonki. Ten okres czasowy można podzielić na kilka faz, obejmujących przygotowanie, sporządzenie i magazynowanie paszy (Borreani, Tabacco, Schmidt, Holmes, Muck, 2018; Duniére, Sindou, Chaucheyras-Durand, Chevallier, Thévenot-Sergentet, 2013; Hartinger, Gresner, Südekum, 2019). Proteoliza jako hydrolityczny proces rozpadu wiązań peptydowych prowadzi do powstawania różnych form azotu niebiałkowego, co jest efektem aktywności roślinnych enzymów proteolitycznych i działalności mikroorganizmów (Duniére i in., 2013; Hartinger i in., 2019; Hoedtke, Gabel, Zeyner, 2010; McDonald i in., 1991; You i in., 2022).

Po ścięciu rośliny następują pierwsze przemiany proteolityczne, a ich wymiar zależy od zakresu i długości trwania procesu więdnięcia lub podsuszenia (Fijałkowska i in., 2015). Wynikiem jest wzrost udziału frakcji azotu rozpuszczalnego w buforze, a w szczególności części niebiałkowej, czyli frakcji związków azotowych niebiałkowych oraz wolnych aminokwasów. Jednak wśród roślin bobowatych stwierdzono różnice gatunkowe, mianowicie podczas podsuszania zielonki z lucerny obniżeniu uległ udział białek rozpuszczalnych, a wzrastał poziom azotu niebiałkowego. W koniczynie czerwonej zaobserwowano odwrotną sytuację, wzrostowi uległa frakcja białek rozpuszczalnych, przy czym nie stwierdzono dynamicznego wzrostu związków azotowych niebiałkowych (Guo i in., 2008; Purwin i in., 2011; Purwin i in., 2014a;

Purwin i in., 2014b). Według literatury straty białka właściwego podczas więdnięcia mogą wynosić średnio do 10% względem świeżo ściętej zielonki (Guo i in., 2008; Purwin i in., 2014b), gdzie w wyniku podsuszania nawet ponad 20% białka właściwego może ulec degradacji do azotu niebiałkowego (Fijałkowska i in., 2015).

Po ścięciu, przygotowaniu i okryciu zakiszanej masy następuje pierwsza faza fermentacji, w trakcie której komórki roślinne wykazują aktywność w procesie respiracji, zużywając tlen obecny między cząstkami zielonej masy i węglowodany proste, takie jak glukoza i fruktoza pochodzące z uszkodzonych komórek roślinnych (Shao, Zhang, Shimojo, Wang, Masuda, 2005). W fazie tlenowej następuje wzrost temperatury w wyniku aktywności epifitycznej mikroflory aerobowej, a także wzmożenie aktywności enzymów proteolitycznych, co prowadzi do natężenia rozkładu hydrolitycznego białka do aminokwasów (Duniére i in., 2013). W początkowych stadiach zakiszania wzmożony rozkład białka właściwego do związków azotowych niebiałkowych był już wcześniej obserwowany, a zakres przemian był bardzo zróżnicowany w zależności od gatunku rośliny pastewnej (Fijałkowska i in., 2015).

W drugiej fazie zakiszania w beztlenowych warunkach wzrasta liczebność bakterii fermentacji mlekowej, pH ulega obniżeniu, ograniczając tym samym aktywność niepożądanych mikroorganizmów. W przypadku niekorzystnych warunków aktywność *Clostridium* spp. może nie zostać zredukowana, wynikiem czego będzie wtórna fermentacja (fermentacja masłowa) i bakteryjna degradacja białka właściwego do aminokwasów, jak i również wzrost koncentracji azotu amoniakalnego jako następstwo deaminacji i reakcji Sticklanda (McDonald i in., 1991; Jones, 2000; Yang i in., 2020; Zheng i in., 2018).

Kolejnym elementem zmian jakościowych białka surowego kiszonki są reakcje Maillarda, podczas których następuje kondensacja grupy karbonylowej węglowodanu redukującego z wolną grupą aminową aminokwasu, peptydu lub białka (Guo i in., 2008; Lund, Ray, 2017). Reakcje te przebiegają wskutek podwyższenia temperatury kiszonki, jako czynnika indukującego, związanego z zagrzewaniem paszy w kontakcie z tlenem. Następstwem jest powstanie niestrawnych kompleksów białkowo-węglowodanowych, wchodzących w pulę azotu nierozpuszczalnego w kwaśnym detergencie (Guo i in., 2008; Li i in., 2021; Nishino, Uchida, 2000). Reakcje Maillarda prowadzą do uszkodzenia takich aminokwasów jak: lizyna, arginina, tryptofan, cystyna czy histydyna w zależności od natężenia temperatury i przebiegu szlaku reakcji. Ponadto wykazują działania hamujące dla aktywności enzymów jelitowych, czy zmniejszają wchłanianie niektórych

składników mineralnych w przewodzie pokarmowym (Hofmann, Engling, Martens, Steinhöfel, Henle, 2020; Lund, Ray, 2017; Nishino, Uchida, 2000).

Podsumowując zakres przemian proteolitycznych w lucernie obejmuje wzrost udziału związków azotowych niebiałkowych średnio z poziomu 167 – 199 $g \cdot kg^{-1}$ białka ogólnego w zielonce nieprzewiędniętej do 591 – 826 $g \cdot kg^{-1}$, a nawet do 870 $g \cdot kg^{-1}$ białka ogólnego w kiszonce, gdzie średnio 73% białka surowego stanowi azot niebiałkowy zakiszonej lucerny (Jones, 2000). Frakcja związków azotowych niebiałkowych jest podstawowym końcowym produktem przemian proteolitycznych, których zakres wśród kiszonek jest najwyższy właśnie u lucerny (Kung, Muck, 2006). Dla porównania w kiszonce z koniczyny czerwonej azot niebiałkowy może stanowić od 7% do maksymalnie 40,8% białka ogólnego (Sullivan, Hatfield, 2006).

Aktywność proteolityczną w trakcie fermentacji mlekowej przypisuje się w dużej mierze roślinnym enzymom, natomiast dalszy katabolizm wolnych aminokwasów został potwierdzony i przypisany jako działalność drobnoustrojów (Winters, Cockburn, Dhanoa, Merry, 2000). Szybkie tempo obniżenia pH środowiska zakiszanej masy roślinnej ogranicza rozpad białek poprzez mechanizm hamujący potencjał proteaz roślinnych i ogranicza wzrost *Clostridium* spp. (McDonald i in., 1991; Tao, Zhou, Guo, Long, Zhu, 2011; Tao, Guo, Zhou, Undersander, Nandety, 2012). optymalne pH dla aktywności roślinnych enzymów proteolitycznych mieści się w zakresie od 5,0 do 7,0 (Tao i in., 2011; Tao i in., 2012). Szybkość zakwaszenia surowca roślinnego uwarunkowana jest między innymi długością pierwszej fazy fermentacji. Od ilości tlenu znajdującego się w wolnych przestrzeniach między cząstkami roślin zależy długość fazy aerobowej, czyli też aktywność drobnoustrojów tlenowych, metabolizujących węglowodany (Fijałkowska i in., 2015). Po zakończeniu tejże fazy zostaje spełniony warunek środowiska beztlenowego, pozwalając na zapoczątkowanie aktywności bakteriom fermentacji mlekowej (Guo i in., 2008).

Enzymom roślinnym przypisuje się odpowiedzialność za większość zmian w składzie azotu ogólnego zakiszanych pasz (Guo i in., 2011; Tao i in., 2011; Tao i in., 2012). Jednak Kung, Bedrosian (2010) wskazali, że aktywność roślinnych proteaz kończy się wraz z obniżeniem pH poniżej ich optymalnej kwasowości. Tym samym na zakres proteolizy może wpływać optimum pH enzymów roślinnych (Tao i in., 2011; Tao i in., 2012), tempo i stopień zakwaszenia (You i in., 2022), gatunek rośliny, zawartość suchej masy oraz temperatura (Fijałkowska i in., 2015; Tao i in., 2019; Wang i in., 2019). Optymalne wartości pH dla enzymów roślinnych są więc zróżnicowane w zależności od

gatunku, a często nawet odmiany. Zgodnie z doniesieniami w literaturze, optymalne pH u lucerny wynosi 4,5 dla proteinazy kwaśnej, 6,7 dla proteinazy obojętnej, 5,4 dla karboksypeptydazy i 6,5 dla aminopeptydazy. Dla porównania u życic (*Lolium* L.) ogólne optymalne pH dla proteaz wynosi od 5,0 do 7,0, a kwaśne i zasadowe endopeptydazy w liściach kukurydzy wykazują optymalną aktywność odpowiednio przy pH na poziomie 5,4 oraz 7,5 (Tao i in., 2011; Tao i in., 2012). Przeprowadzone dotychczas badania na lucernie sugerują, iż optymalne pH enzymów rośliny wydaje się być niższe w stosunku do innych roślin uprawnych. Ponadto wartość pH w zakiszanej lucernie często przekracza 4,0 w przeciwieństwie do kiszonki z kukurydzy czy traw (Guo i in., 2011; Schmidt, Hu, Mills, Kung, 2009; Tao i in., 2011; Tao i in., 2012). Kiszonka z lucerny nawet po dłuższym czasie magazynowania może uzyskiwać pH na poziomie 4,3 – 4,6 (Kung, Stockes, Lin, 2003a).

Dotychczasowe badania skupiały się nad zakresem optimum pH enzymów roślinnych pod kątem ogólnej klasyfikacji enzymów proteolitycznych (proteazy kwaśne, obojętne i zasadowe). Badania Guo i in. (2011) oraz Tao i in. (2011) wykazały, że czwarta klasa endopeptydaz (tj. seryna, cysteina, kwas asparaginowy i metalopeptydazy) oraz piąta klasa egzopeptydaz (tj. aminopeptydaza, karboksypeptydaza, dipeptydaza, dipeptydylo- i tripeptydylopeptydaza) były obecne w każdej zielonce z lucerny, odgrywając różnorodne role w degradacji białka właściwego rośliny, a w efekcie czego każda z nich była odpowiedzialna za tworzenie różnych składników azotu ogólnego podczas fermentacji. W innych badaniach wykazano, że zarówno endopeptydazy, jak i egzopeptydazy w zielonce z lucerny wykazują różne reakcje na wartość pH i temperaturę (Tao i in., 2012). Optymalne wartości pH dla endopeptydazy, peptydazy serynowej, metalopeptydazy i peptydazy cysteinowej oraz egzopeptydazy, dipeptydazy, karboksypeptydazy i tripeptydylopeptydazy dodatkowo potwierdzają, że są one głównymi czynnikami przyczyniającymi się do zmian azotowych podczas zakiszania lucerny. Ponadto wysoka aktywność proteolityczna przy pH wynoszącym między 3,0, a 6,0 tych peptydaz może sugerować, że odgrywają rolę w hydrolizie białek podczas długotrwałego przechowywania rośliny (Tao i in., 2011; Tao i in., 2012).

W fazie tlenowej aktywność wykazują bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, odpowiedzialne za przeprowadzanie dekarboksylacji i deaminacji aminokwasów, a także uczestniczące w rozkładzie azotanów. W wyniku ich działalności powstają NO i NO_2, amoniak oraz aminy biogenne (He, Lv, Xing, Chen, Zhang, 2020). Długość fazy aerobowej zależy od stopnia zagęszczenia surowca i ilości obecnego w masie powietrza

(Guo, Zhou, Yu, Zhang, 2007). W drugiej fazie fermentacji w warunkach beztlenowych aktywność roślinnych enzymów ulega redukcji, lecz działalność *Enterobacteriaceae* trwa, aż do osiągnięcia kwasowości masy roślinnej poniżej wartości 5,0 (Jones, 2000). O ogólnej jakości przebiegu procesu fermentacji decyduje przede wszystkim konkurencja niepożądanych mikroorganizmów, w tym głównie *Clostridium* spp., *Entecobacter* spp. i drożdży, z pożądanymi bakteriami fermentacji mlekowej, takimi jak na przykład *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. czy *Enterococcus* spp. (Wang i in., 2019).

Zmiany w proporcjach poszczególnych form azotu niebiałkowego zależą od tempa i zakresu degradacji aminokwasów (Givens, Rulquin, 2004). Podczas fermentacji *Clostridium* spp. grupy proteolitycznej (głównie *Clostridium sporogenes* i *Clostridium bifermentans*) selektywnie rozkładają aminokwasy na drodze deaminacji, dekarboksylacji oraz w reakcji Sticklanda (McDonald i in., 1991; Jones, 2000). W procesach dekarboksylacji aminokwasów główną rolę odgrywają *Enterobacteriaceae*, redukujące azotany do azotynów, fermentujące heksozy do kwasu octowego, mrówkowego i etanolu, hamując tym samym rozwój *Clostridium* spp. (Krzywiecki, Preś, Bodarski, 2008), oraz bakterie fermentacji mlekowej, które także mają zdolność deaminacji aminokwasów, takich jak seryna i arginina. Zmiany jakościowe w składzie aminokwasowym białka ogólnego kiszonek, zachodzące w wyniku dekarboksylacji i deaminacji, polegają głównie na wzroście udziału alaniny (Jones, 2000), metioniny i aminokwasów o łańcuchach rozgałęzionych oraz na obniżeniu udziału argininy, histydyny, a także tworzeniu w kiszonkach amin biogennych, w tym histaminy, tyraminy, kadaweryny czy putrescyny (Fijałkowska i in., 2015; Givens, Rulquin, 2004).

2.3. Wybrane wskaźniki charakteryzujące zakres proteolizy w roślinie

Podstawowymi wskaźnikami charakteryzującymi rozkład związków azotowych kiszonek jest określenie poziomu białka właściwego i związków azotowych niebiałkowych, a także udziału azotu amoniakalnego w azocie ogólnym, jako wynik deaminacji (Dentinho, Portugal, Moreira, Santos-Silva, Bessa, 2018; Guo i in., 2008; Licitra, Hernandez, Van Soest, 1996). Stosunek azotu białkowego w kiszonce do zawartości w zielonce pozwala na określenie stopnia hydrolizy białka podczas fermentacji (Givens, Rulquin, 2004; Guo i in., 2008; Purwin i in., 2014b). Szczegółowymi wskaźnikami są zawartość azotu aminokwasowego kiszonki oraz azotu rozpuszczalnego w buforze lub wodzie (Givens, Rulquin, 2004; Hedqvist, Udén, 2006;

Jones, 2000; Ke i in., 2018; Purwin i in., 2014b; Slottner, Bertilsson, 2006). Analiza zawartość azotu nierozpuszczalnego w neutralnym detergencie i azotu nierozpuszczalnego w kwaśnym detergencie pozwolą na określenie zmian spowodowanych procesami aerobowymi i termicznymi w kiszonce (Fijałkowska i in., 2015; Licitra i in., 1996).

Szacowanie potencjalnej podatności na zakres i szybkość degradacji związków azotowych jest jednym z warunków wstępnej oceny jakości białkowej pasz w różnych systemach, które modelują dynamikę żwacza. Obecnie metody *in situ* i *in vivo* są jednymi z głównych metod referencyjnych stosowanych w Europie (Chrenková i in., 2014). Współczesne systemy badań żywieniowych opierają się na grupach badawczych i nie odzwierciedlają wszystkich zmiennych. Dodatkowym aspektem jest potencjał biologiczny zwierząt, który jest wypadkową szeregu czynników (Fox i in., 2004). Jednak modele te wymagają zbyt wiele czasu, pracy, jak i odpowiednio licznych grup zwierząt. Także pasze sporządzone z różnych roślin zwykle wykazują wysoką zmienność w zawartości i dostępności składników odżywczych, związanych z gatunkiem, odmianą, stanowiskiem i technologią uprawy, nawożeniem, zbiorem, przetwarzaniem oraz magazynowaniem (Fox, Tedeschi, 2003; Fox i in., 2004). Zatem uzyskanie użytecznych wyników z dowolnego modelu biologicznego jest bardzo zależne od jakości danych wykorzystywanych do przeprowadzenia symulacji (Haefner, 2005). W ostatnich latach bardziej powszechne stały się metody chemiczne, które pozwalają na frakcjonowanie między innymi białka pasz o wysokiej różnorodności. System, który ujednolica dotychczasowe metody rozkładu frakcji węglowodanowych i azotowych jest amerykański The Cornell Net Carbohydrate and Protein. Po raz pierwszy w literaturze opis tego systemu pojawił się w 1992 i 1993 roku (Fox i in., 2004). Podstawowym kryterium podziału związków azotowych pasz jest rozpuszczalność w buforze boranowo-fosforanowym, a także neutralnym i kwaśnym detergencie, przy jednoczesnej analizie podatności związków na rozkład enzymatyczny w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy (Nadeau, Richardt, Murphy, Auerbach, 2012). W odniesieniu do związków azotowych pasz system ten pozwala na ocenę jakości białka surowego, a także zakres zmian proteolitycznych zachodzących podczas konserwacji, jak i magazynowania. System ewoluował przez wiele lat, poprzez włączanie nowych danych badawczych i opisów funkcji żwacza, a także metabolizmu przeżuwaczy w postaci równań matematycznych. W odniesieniu do rozdziału frakcji azotowych również zostały wprowadzone zmiany do jeszcze niedawno obecnego systemu wersji 6.0 i 6.1 (Tylutki

i in., 2008; Van Amburgh i in., 2010), wynikiem czego jest postawnie najnowszej wersji systemu – 6.5 (Higgs, Chase, Ross, Van Amburgh, 2015; Van Amburgh i in., 2015).

Podstawowym narzędziem modelu The Cornell Net Carbohydrate and Protein System jest wyodrębnienie frakcji białkowych (Schemat 2), które obejmuje analizę białka ogólnego, amoniaku, białka ogólnego rozpuszczalnego w buforze boranowo-fosforanowym, białka ogólnego nierozpuszczalnego w neutralnym detergencie i białka ogólnego nierozpuszczalnego w kwaśnym detergencie (Fox i in., 2004; Higgs i in., 2015; Tylutki i in., 2008; Van Amburgh i in., 2015).

<table>
<tr><td colspan="4">Białko ogólne</td></tr>
<tr><td colspan="3">Białko właściwe + aminokwasy</td><td>Amoniak</td></tr>
<tr><td colspan="2">Białko nierozpuszczalne w buforze</td><td>Białko rozpuszczalne w buforze</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="1">Białko nierozpuszczalne w neutralnym detergencie</td><td>Białko rozpuszczalne w neutralnym detergencie</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>Białko nierozpuszczalne w kwaśnym detergencie</td><td>Białko rozpuszczalne w kwaśnym detergencie</td><td></td><td></td></tr>
</table>

Schemat 2. Rozdział frakcji białka ogólnego według The Cornell Net Carbohydrate and Protein System v 6.5 (źródło: Higgs i in., 2015; Van Amburgh i in., 2015)

2.4. Metody ograniczenia proteolizy białka lucerny

Literatura obszernie opisuje różnorodne metody i mechanizmy ograniczenia przemian proteolitycznych w zakiszaniu roślin, a przede wszystkim produkcji kiszonki z lucerny. Poza metodami fizycznymi, jak więdnięcie (Tao i in., 2017) czy podsuszenie (Brink i in., 2010), do ograniczenia rozkładu hydrolitycznego białka często stosowane są inhibitory lub stymulatory fermentacji w postaci kiszonkarskich dodatków chemicznych oraz biologicznych (Ke, Yang, Undersander, Guo, 2015; Ke i in., 2018).

Aktywnymi składnikami dodatków chemicznych są kwasy, a także ich sole. Powszechnie stosowanym inhibitorem fermentacji, jednocześnie hamującym proteolizę jest kwas mrówkowy i jego sole, np. mrówczan wapnia, mrówczan sodu czy mrówczan amonu (Auerbach, Weiss, Nadeau, 2012; Muck i in., 2018). Dodatki te działają restrykcyjnie na przebieg fermentacji, ograniczając reakcje deaminacji i dekarboksylacji

bakteryjnej, a także hamują działalność roślinnych enzymów proteolitycznych (Broderick, Brito, Olmos Colmenero, 2007; Winters, Fychan, Jones, 2001). Powodują bezpośrednio zakwaszenie i ograniczenie aktywności niepożądanych mikroorganizmów, przyczyniając się do zmniejszenia ilości węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie metabolizowanych przez drobnoustroje i obniżenia zawartości kwasu octowego (Muck i in., 2018). Nadeau, Hallin, Auerbach, Jakobsson, Arnesson (2013) stwierdzili również zmniejszenie strat suchej masy i zawartości etanolu oraz ogólnej liczebność drożdży. Kwas mrówkowy cechuje niski koszt produkcji i wysoka zdolność zakwaszenia, przy jednocześnie szeroko rozwiniętym mechanizmie przeciw patogennym (Kung i in., 2003a). W zależności od formy dysocjacyjnej kwas mrówkowy hamuje aktywność *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Campylobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Penicillium* spp. i *Cladosporium* spp. (Borreani i in., 2018; Driehuis, Wilkinson, Jiang, Ogunade, Adesogan, 2018; Muck i in., 2018; Ogunade i in., 2018a; Queiroz, Ogunade, Weinberg, Adesogan, 2018), a także *Listeria* spp. i bakterii z grupy coli (He i in., 2019). Przeprowadzone dotychczas badania wykazały pozytywny wpływ dodatku kwasu mrówkowego w zakiszaniu lucerny, co w efekcie pozwoliło na szybkie zakwaszenie, obniżenie koncentracji związków azotowych niebiałkowych, azotu amoniakalnego i puli wolnych aminokwasów (Li i in., 2016; Yuan, Wen, Dong, Desta, Shao, 2017). Zmniejszenie koncentracji kwasu masłowego, etanolu i liczebności *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* spp. oraz ogólnej liczby drożdży i pleśni, skutkowało mniejszymi stratami suchej masy i wyższą koncentracją węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie, przy jednocześnie lepszej stabilności tlenowej kiszonek w stosunku do wariantów zakiszanych bez dodatku (Li i in., 2016; Yuan i in., 2017).

Wśród stosowanych powszechnie dodatków chemicznych również znajdują się kwasy organiczne, takie jak kwas octowy (Queiroz, Arriola, Daniel, Adesogan, 2013) lub kwas propionowy (Mills, Kung, 2002), lecz najlepsze efekty poprawy jakości białka surowego i wzoru fermentacji lucerny uzyskano jednak przy dodatku kwasu mrówkowego (Li i in., 2016). Przeprowadzono także badania wpływu zastosowania dodatku kwasu jabłkowego i cytrynowego w zakiszaniu lucerny, jako związków chemicznych szeroko stosowanych w przemyśle spożywczym (Ke i in., 2017; Ke i in., 2018). Efektem było skuteczne ograniczenie proteolizy i poprawa składu kwasów tłuszczowych przy niższym udziale dodatków. Należy uwzględnić negatywny wpływ zwiększonej liczebności ogólnej drożdży po zastosowaniu wyższych dawek obu tych kwasów (Ke i in., 2017). Perspektywa dalszego stosowania zarówno kwasu jabłkowego,

jak i cytrynowego, nawet w niższych dawkach w zakiszaniu lucerny nie ma przyszłości, ponieważ nie sprzyjały one w takim wysokim stopniu fermentacji mlekowej jak zabieg inolukacji *Lactobacillus plantarum* (Ke i in., 2018).

W grupie biologicznych dodatków najstarszymi i najpowszechniejszymi inokulantami bakteryjnymi do produkcji kiszonek są bakterie fermentacji mlekowej homofermentatywne i heterofermentatywne (Pahlow, Muck, Driehuis, Oude Elferink, Spoelstra, 2003). Szeroko stosowanymi gatunkami homofermentatywnymi są m.in.: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium* i różne gatunki *Pedicoccus* spp. Aplikacja inokulantów jako modyfikatorów fermentacji pozwala na zwiększenie startowej populacji pożytecznych bakterii fermentacji mlekowej, czego efektem jest wzrost tempa i zakresu produkcji głównie kwasu mlekowego, szybsze obniżenie pH i w konsekwencji zmniejszenie wymiaru proteolizy, jak też redukcja niepożądanych mikroorganizmów (Duniére i in., 2013). Dowiedziono, że inokulacja *Lactobacillus plantarum* lucerny przed zakiszeniem znacząco zwiększyła produkcję kwasu mlekowego (Guo i in., 2018; Yang, Yuan, Li, Dong, Shao, 2019), poprawiając względną liczebność *Lactobacillus* spp. (Ogunade i in., 2018b), zmniejszyła poziom azotu niebiałkowego (Ke i in., 2018), koncentracje azotu amoniakalnego i skutecznie hamowała wzrost *Clostridium* spp. (Yang i in., 2020; Zhao, Wang, Yang, Wang, Zhang, 2020). Pośród gatunków heterofermentatywnych często opisywanym jest *Lactobacillus buchnerii*, posiadający zdolność do metabolizowania umiarkowanych ilości kwasu mlekowego do kwasu octowego (Muck i in., 2018). Wcześniejsze badania wykazały, że dodatek *Lactobacillus buchnerii* w lucernie zwiększył poziom azotu amoniakalnego, a produkcja kwasu mlekowego była niższa w porównaniu do grupy kontrolnej (Kung, Taylor, Lynch, Neylon, 2003b), przy czym spadek pH był znacznie wolniejszy w porównaniu do traktowania innymi dodatkami bakteryjnymi (Schmidt i in., 2009). W późniejszych badaniach wykazano, że szczep ten wpłynął istotnie na obniżenie pH, ograniczenie fermentacji węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie i wzrost produkcji kwasu octowego. Ogólna liczebność bakterii fermentacji mlekowej uległa znacznej poprawie, przy ograniczeniu aktywności bakterii kwasu masłowego oraz liczebności pleśni. Nie odnotowano znaczącej poprawy w zakresie produkcji kwasu mlekowego i ograniczenia deaminacji (Zhang i in., 2009). Badania przeprowadzone przez Bai i in. (2020) w zakresie charakterystyki fermentacji i mikrobiomu kiszonki potwierdzają wcześniejsze doniesienia Zhang i in. (2009). Jednakże badania prezentowały znaczną poprawę jakości białka lucerny, w zakresie której dodatek *Lactobacillus buchnerii*

istotnie obniżył hydrolizę białka właściwego i deaminację (Bai i in., 2020). Szczep ten naturalnie występujący na zielonce nie jest w stanie zdominować fermentacji, gdyż wpływ aktywności zarówno jako formy epifitycznej, czy jako dodatku jest wykrywalny w późniejszym okresie kiszenia, zwykle między 45, a 90 dniem, co wynika z powolnego wzrostu tego gatunku bakterii i zostało potwierdzone w badaniach (Bai i in., 2020; Schmidt i in., 2009; Zhang i in., 2009). Pomimo wielu doniesień skuteczność i wpływ inokulantów jest różny, warunkowany wieloma czynnikami, jak skład mikroflory epifitycznej, zawartość wody, ilość substratu cukrowego, potencjał buforowy, liczebność jednostek tworzących kolonie i ich żywotność (Li i in., 2018b; Li, Wang, Zhang, Lin, Yang, 2018c; Muck i in., 2018; Yang i in., 2019).

W celu poprawy jakości fermentacji lucerny stosowane powszechnie są dodatki węglowodanowe, które dostarczają niezbędnych substratów do produkcji kwasów kiszonkarskich. Zjawisko to pozwala często na szybsze obniżenie pH, skrócenie pierwszej fazy fermentacji i ograniczenie aktywności proteaz. W praktyce popularne jest stosowanie jedynie dodatków cukrowych lub też w celu wzmocnienia oczekiwanego efektu wraz z inokulacją bakteriami fermentacji mlekowej (Gao, Wang, Jia, Luo, Yu, 2021; Luo i in., 2021). Powszechnie stosowana w produkcji kiszonek jest melasa, jako produkt uboczny przemysłu cukrowniczego (Luo i in., 2021). Po zastosowaniu której w kiszeniu lucerny uzyskano homofermentację mlekową, ponadto dominowały bakterie *Enterococcus* spp. i *Lactobacillus* spp., a niepożądane mikroorganizmy zostały zredukowane w warunkach niższego pH. Ograniczona została także produkcja azotu amoniakalnego prawie dwukrotnie (Luo i in., 2021). Porównując wpływ melasy z innymi źródłami węglowodanów w zakiszaniu lucerny Gao i in. (2021) wykazali, że spadek pH był szybszy już w pierwszych dniach fermentacji po dodatku fruktozy lub pektyn. Lucerna zakiszona z dodatkiem fruktozy lub pektyn charakteryzowała się wolniejszym tempem wzrostu azotu amoniakalnego w stosunku do dodatku melasy (Gao i in., 2021).

Zakiszanie lucerny z roślinami pastewnymi o wyższej zawartości węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie, takimi jak kukurydza (Wang, Yu, Wu, Hannaway, 2017) lub słodkie sorgo (Zhang i in., 2015a) może także polepszyć jakość fermentacyjną paszy. Wzrastający udział kukurydzy w zakiszaniu lucerny znacząco poprawiał zakwaszenie masy roślinnej i gwarantował niższą koncentrację azotu amoniakalnego, a wartość odżywcza sporządzonych kiszonek wykazywała tendencję spadkową. Efekt poprawy uzyskanych wyników wzmocniony inokulacją bakteryjną i dodatkiem chemicznym miał większy wymiar (Wang i in., 2017). Podobnie w przypadku słodkiego sorga, wzrastający

udział w kiszonce z lucerny sprzyjał obniżeniu pH i ograniczeniu produkcji azotu amoniakalnego. Najkorzystniejsze wyniki uzyskano dla wariantów doświadczalnych o 60% i 80% udziale słodkiego sorga, gdzie jednak w efekcie końcowym udział białka ogólnego kiszonek zmniejszył się o 44 i 61 punktów %, odpowiednio (Zhang i in., 2015a). Prezentowane w literaturze wyniki wpływu tego rodzaju dodatków w zakresie jakości białka ogólnego często ograniczone są do podania zawartości azotu amoniakalnego, co zatem nie daje pełnych wniosków o ich wpływie na zakres proteolizy, przebiegającej podczas procesu fermentacji (Wang i in., 2017; Zhang i in., 2015a).

Popularnymi, lecz ostatnio często pomijanymi w produkcji kiszonek są dodatki enzymatyczne, jako pojedyncze enzymy, np. celulaza, hemicelulaza lub też mieszaniny egzogennych enzymów fibrolitycznych, stosowane w celu zwiększenia puli uwalnianych węglowodanów ścian komórkowych roślin, udostępniając tym samym substrat dla bakterii fermentacji mlekowej. Dodatki enzymatyczne są w większości stosowane w połączeniu z inokulantami bakteryjnymi, co też utrudnia rozróżnienie pomiędzy bakteryjnymi, a enzymatycznymi reakcjami podczas kiszenia (Lynch, Baah, Beauchemin, 2015; Muck i in., 2018). Zastosowanie celulazy w kiszeniu lucerny obniżyło końcowe pH, a wraz z modyfikatorem bakteryjnym (Su i in., 2019), bądź też kwasem mrówkowym (Nadeau, Buxton, Lindgren, Lingvall, 1996) wpłynęło na poprawę ogólnej jakości kiszonki. W innych badaniach lucerna traktowana celulazą uzyskała istotnie niższe pH, stężenie kwasu octowego i obniżoną zawartość azotu amoniakalnego, a także wyższą końcową koncentrację kwasu mlekowego w porównaniu z grupą kontrolną. Warianty doświadczalne dodatkowo traktowane kwasem mrówkowym wykazały jednakże wyższy stopień poprawy jakości ogólnej kiszonki (Nadeau, Russell, Buxton, 2000). Zastosowanie egzogennych enzymów fibrolitycznych przy zakiszaniu lucerny generalnie nie sprzyjało pozytywnej odpowiedzi w przebiegu fermentacji, ani poprawie wartości odżywczej kiszonki. Dodatek modyfikatora w połączeniu z inokulantem wytwarzającym esterazę kwasu ferulowego prowadził do zwiększenia wymiaru heterofermentacji mlekowej i wyższych strat suchej masy podczas konserwacji lucerny (Lynch, Jin, Lara, Baah, Beauchemin, 2014). Su i in. (2019) co więcej potwierdzili, że samodzielna aplikacja celulazy w zakiszaniu lucerny nie pozwala na uzyskanie takiej poprawy fermentacji, jak w połączeniu z inokulacją bakteryjną. Dodatki enzymatyczne mają wieloletnie zastosowanie w zakiszaniu różnych pasz, to jednak w przypadku lucerny ilość wykonanych doświadczeń jest znikoma, co też jednoznacznie nie pozwala na wykluczenie ich stosowania w celu poprawy tempa spadku pH. Ponadto

profile enzymatyczne i aktywność mieszanin enzymów są często mało przewidywalne, co daje zmienne odpowiedzi prowadzonych obserwacji (Muck i in., 2018).

Ochronę białka roślinnego przed hydrolitycznym rozkładem można uzyskać także w wyniku zastosowania dodatków, mających zdolność to tworzenia kompleksów białkowych, opornych na rozkład enzymatyczny, takimi dodatkami są formaldehyd lub taniny (Ke i in., 2022; Salawu, Acamovic, Stewart, Hvelplund, Weisbjerg, 1999). Degradacja białka właściwego została ograniczona, frakcja białka rozpuszczalnego w buforze była dobrze zachowana w kiszonce z lucerny traktowanej formaldehydem, a wzrost udziału białka nierozpuszczalnego w kwaśnym detergencie był nieznaczny (Ding, Guo, Ataku, 2013a; Guo i in., 2008).

Taniny to heterogenna grupa polifenoli, w której wyróżnić można dwie główne podgrupy: taniny hydrolizujące i skondensowane (proantocyjanidyny). Związki te są naturalnymi składnikami roślin, chroniącymi je przed patogenami (Aerts, Barry, McNabb, 1999; Mueller-Harvey, 2006). Taniny tworzą kompleksy z makrocząsteczkami i jonami metali w szczególności z białkami. Zdolność łączenia się z białkami jest zależna od wartości pH, zatem jest to proces odwracalny i obejmuje zarówno efekty hydrofobowe, jak i wiązania wodorowe. Ponadto taniny mają korzystny wpływ na wyniki produkcyjne zwierząt, wówczas gdy są podawane w optymalnych ilościach dla danego gatunku (Aerts i in., 1999). Biologiczne właściwości tanin wskazują na potencjał w zmniejszeniu proteolizy (Aguerre, Capozzolo, Lencioni, Cabral, Wattiauxn, 2016; He i in., 2020). Ochrona białka ma miejsce podczas produkcji kiszonki (Salawu i in., 1999), jak i w żwaczu, co obniża jego rozpuszczalność i koncentrację azotu amoniakalnego w płynie żwaczowym, zwiększając pulę azotu nieamoniakalnego i aminokwasowego przechodzącego do jelita cienkiego (Tabacco i in., 2006).

Właściwości przeciwdrobnoustrojowe tanin mają szerokie spektrum działania, w skutek którego mogą ograniczyć aktywność bakteryjnych enzymów w wyniku wytrącenia ich i tworzenia wiązań z ich błonami komórkowymi (Wang i in., 2019). Wykazano, że związki te zmniejszają aktywność bakterii i pleśni, ograniczają konwersję mleczanu do octanu, etanolu lub maślanu. Efektem zastosowania w zakiszaniu roślin pastewnych jest ograniczenie degradacji białka właściwego i zmniejszenie ilości związków azotowych rozpuszczalnych (Salawu i in., 1999). Potwierdzono, że dodatek hydrolizujących tanin w zakiszaniu lucerny zmniejszył skutecznie zakres proteolizy (Chen i in., 2021a; Chen i in., 2021b; Tabacco i in., 2006). Dowiedziono również, że dodatek mieszaniny tanin hydrolizujących i skondensowanych może efektywniej

zmniejszyć koncentrację azotu amoniakalnego, ograniczając liczebność grzybów i aktywność proteaz lucerny (Chen i in., 2021c). Zakres efektywności stosowania w sporządzaniu kiszonek z lucerny szerzej został zbadany i opisany przez Ke i in. (2022). Badania wykazały istotnie niższą zawartość azotu amoniakalnego i azotu aminokwasowego, przy wyższej koncentracji kwasu mlekowego w lucernie traktowanej skondensowanymi taninami. Zastosowany dodatek zwiększył liczebność *Pseudomonas* spp., która była ujemnie skorelowana z aktywnością aminopeptydaz, a zmniejszył liczebność *Pediococcus* spp., który to z kolei był dodatnio skorelowany z aktywnością aminopeptydaz oraz koncentracją związków azotowych niebiałkowych, azotu amoniakalnego i azotu wolnych aminokwasów. Natomiast taniny hydrolizujące obniżyły liczebność *Lactobacillus* spp., powodując wzrost liczebności *Enterococcus* spp., podczas gdy w grupie traktowanej taninami skondensowanymi zanotowano przeciwstawne wyniki. Jednym z wniosków przeprowadzonych badań było wykazanie istotnych różnic w mechanizmie działania obu grup tanin na strukturę mikrobiomu bakteryjnego kiszonek. Zastosowanie każdej z grup tanin pozwoliło na efektywną redukcję zakresu przemian proteolitycznych w zakiszanej lucernie (Ke i in., 2022).

Stosowane w doświadczeniach taniny mogą mieć charakter ekstraktów taninowych pozyskiwanych m.in.: z kasztanowca, dębu (Herremans, Decruyenaere, Beckers, Froidmont, 2018), drzewa Kebraczo (Chen i in., 2021a), orzecha galasowego (Chen i in., 2021b), mimozy czy migdałecznika (Salawu i in., 1999). Inne źródło tanin można uzyskać poprzez dodatek rośliny zasobnych właśnie w te polifenole, jak np. esparceta siewna (*Onobrychis viciifolia*) (Wang, Barbieri, Berg, McAllister, 2007), komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus* L.) (Grabber, 2009), komonica błotna (*Lotus pedunculatus* S.), seradela pastewna (*Ornithopus sativus* B.), życica trwała (*Lolium perenne* L.) (Aerts i in., 1999), czy koniczyna czerwona (Grabber, 2009). Przeprowadzone badania wskazują, że stopień redukcji degradacji białka lucerny zależy od rodzaju i poziomu zastosowanego dodatku tanin (Getachew i in., 2008; Ke i in., 2022). Wang i in. (2007) wykorzystali esparcetę siewną naturalnie zasobną w taniny podczas zakiszania lucerny, co poprawiło jakość fermentacji w silosach w skali laboratoryjnej. Proporcja lucerny i esparcety siewnej dająca optymalne zakiszenie i przebieg fermentacji według Wang i in. (2007) wynosiła około 60:40. Dodatek esparcety siewnej obniżył pH, wpłynął na zmiany ilościowe i jakościowe struktury mikrobiomu bakteryjnego kiszonek. Udział azotu rozpuszczalnego, niebiałkowego i amoniakalnego zmniejszyły się liniowo wraz ze wzrostem udziału esparcety siewnej, co potwierdziło ograniczenie zakresu

proteolizy (Wang i in., 2007). Wpływ tanin zawartych w esparcecie siewnej na jakość fermentacji zbadali również Huang i in. (2022), którzy zastosowali glikol polietylenowy do dezaktywacji tanin, aby poznać skutki ich obecności w roślinie. Badania te potwierdziły, że taniny zawarte w esparcecie siewnej istotnie wpływają na ograniczenie strat składników pokarmowych kiszonek, zmniejszając koncentrację kwasu mlekowego i kwasu octowego, gdyż działały inhibitująco na bogactwo i różnorodność mikrobiomu bakteryjnego. Dodatkowym atutem tanin zawartych w esparcecie siewnej było hamujące działanie na aktywność grzybów, co ma duże znaczenie przy jakości sporządzonych kiszonek i możliwości ich przechowywania. Przeprowadzone badania nie obejmowały jednak oceny jakości białka zakiszonej esparcety siewnej, a wśród przedstawionych wyników nie zawarto wskaźników proteolitycznych (Huang i in., 2022).

Koniczyna czerwona w porównaniu z lucerną wykazuje znacznie mniejszy stopień proteolizy, co znajduje potwierdzenie w niższej zawartości puli azotu niebiałkowego. Przyczyną jest naturalny mechanizm ochronny białka, który został przypisany obecnym taninom i aktywności oksydazy polifenolowej, enzymowi zawierającemu miedź i naturalnie obecnemu w roślinie (Sullivan, Hatfield, 2006). Enzym ten występuje w tkankach roślinnych w formie aktywnej stanowiąc około 10% i w formie uśpionej, jest to średnio 90%. Pierwsza forma wykazuje aktywność wewnątrz komórek przy pH neutralnym, natomiast forma uśpiona wymaga wzbudzenia, czyli jednoczesnego uszkodzenia tkanek roślinnych, gdzie dojdzie do połączenia enzymu i substratu, a także wymaga warunków tlenowych. W nienaruszonych tkankach nie dochodzi do aktywacji puli formy drugiej enzymu (Lee, Scott, Tweed, Minchin, Davies, 2008). Po ścięciu lub obróbce mechanicznej oksydaza polifenolowa w roślinie katalizuje utlenianie endogennych *o*-difenoli do chinonów. Chinony zaś wykazują wysoką reaktywność i następnie polimeryzowane są do usieciowionych kompleksów białkowych, chroniąc białko przed działaniem proteaz i jednocześnie je inaktywując (Bittner, 2006; Lee, Colmenero, Winters, Scollan, Minchin, 2006). Procesom tym towarzyszy ograniczenie proteolizy i strat wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, gdyż enzym ten także jest inhibitorem lipolizy, dezaktywując roślinne enzymy lipolityczne (Lee i in., 2004). Chronione tym sposobem białko może stanowić nawet 80% białka właściwego, poprawiając wykorzystanie azotu pochodzącego z paszy w żwaczu (Fijałkowska i in., 2015; Winters, Minchin, 2001).

Lucerna charakteryzuje się znacznie ograniczoną aktywnością oksydazy polifenolowej (Lee i in., 2008), a rola ochronna białka nie została odnotowana

w zakiszaniu transgenicznej lucerny z ekspresją enzymu, ze względu na brak endogennego substratu fenolowego (Getachew i in., 2009). Stwierdzono zmniejszoną proteolizę w lucernie genetycznie zmienionej w celu ekspresji oksydazy polifenolowej, gdy dodano *o*-difenol do zakiszania (Sullivan, Zeller, 2013). Warunki te mogą zostać spełnione w naturalnym środowisku bez wymogu modyfikacji genetycznych. Zarówno substrat oksydazy polifenolowej, jak i *o*-difenol można dodawać do lucerny poprzez zmieszanie roślin ze sobą, czyli współzakiszanie. W kilku badaniach podjęto próby zakiszania obu roślin wspólnie w celu zmniejszenia proteolizy. Początkowo stwierdzono, że mieszanie koniczyny czerwonej z lucerną w stosunku 1:1 zmniejsza proteolizę o 70 punktów % w stosunku do samodzielnego zakiszanie lucerny (Jones, 2000). Kolejnym etapem było zakiszenie dwuplonu lucerny i koniczyny czerwonej w różnych stosunkach wysiewu, gdzie po zakiszeniu koncentracja rozpuszczalnego białka i azotu wolnych aminokwasów zmniejszyła się wraz ze wzrostem udziału koniczyny czerwonej (Marley, Fychan, Fraser, Winters, Jones, 2003). Za optymalny stosunek wysiewu uznano 1:1, co nie odzwierciedla końcowych proporcji roślin w sporządzonych kiszonkach ze względu na różnice we wzroście. Dalsze badania dowiodły, iż wzrastający udział koniczyny czerwonej w zakiszaniu lucerny wpłynął na liniowy spadek zawartości azotu całkowitego, niebiałkowego, peptydowego, wolnych aminokwasów i amoniaku, a frakcja białka nierozpuszczalnego w kwaśnym detergencie liniowo wzrastała. Podczas zakiszania aktywność karboksypeptydazy, aminopeptydazy i proteinazy kwaśnej zmniejszyła się wraz ze wzrostem udziału koniczyny czerwonej. Generalnie za optymalny stosunek mieszaniny obu roślin uznano 50:50, przy czym uwzględniono także produkty fermentacji (Li i in., 2018a). Badania dynamiki fermentacji mieszaniny lucerny z koniczyną czerwoną w stosunku 1:1 wykazały lepsze właściwości fermentacyjne, niższą wartość pH i wyższą koncentrację kwasu mlekowego. Współzakiszanie wpłynęło na opóźnioną przemianę azotu, co w efekcie pozwoliło uzyskać znacznie obniżoną zawartość wolnych aminokwasów, wyższy udział azotu peptydowego i zmniejszony poziom azotu amoniakalnego już po 14 dniach kiszenia. Różnice w tempie degradacji białka właściwego pomiędzy mieszaniną roślin, a czystą koniczyną czerwoną nie były istotne do 14 dnia fermentacji (Dong, Chen, Li, Yuan, Shao, 2019).

Wykorzystując wiedzę w zakresie aktywności enzymów zbadano wpływ obróbki termicznej na zahamowanie proteolizy w zakiszaniu lucerny. Zielonkę poddano działaniu temperatury 100°C w dehydratorze przez czas 2 minut. Następstwem był spadek aktywności proteaz o 34%, wzrost wydajności syntezy białka mikrobiologicznego o 28%,

co zwiększyło pulę aminokwasów trawionych w jelicie cienkim o 42% (Broderick, Yang, Koegel, 1993; Charmley, Veira, 1990a; Charmley, Veira, 1990b).

Odmiennym podejściem do redukcji rozkładu białka właściwego lucerny podczas zakiszania była inaktywacja enzymów rośliny w autoklawie lub sterylizacja promienia γ. Poddana obróbce lucerna została zaszczepiona bakteriami kwasu mlekowego i wówczas dopiero zakiszona. Rezultatem była istotnie mniejsza zawartość związków azotowych niebiałkowych, azotu wolnych aminokwasów, amoniakalnego i peptydowego. Dezaktywacja enzymów w autoklawie pozwoliła na uzyskanie znacznie mniejszej puli azotu niebiałkowego w porównaniu do grupy traktowanej promieniami γ czy kiszonką kontrolną (Ding, Long, Guo, 2013b).

Możliwości ograniczenia proteolizy w zakiszaniu lucerny poszukiwano także w dodatku produktów ubocznych. Jedną ze skutecznych prób był dodatek wytłoków jabłkowych i winogronowych, bogatych w liczne polifenole, o niskim pH w zakresie 3,4 do 4,2. Wytłoki włączone do zakiszania lucerny ograniczyły znacznie proteolizę, koncentracja azotu niebiałkowego zmniejszyła się średnio o 63 punkty %, a zawartość azotu amoniakalnego ponad trzy krotnie była niższa (Ke i in., 2015). Dodatek produktu ubocznego z produkcji kwasu cytrynowego pozwolił na znacznie szybsze tempo obniżenia pH już od trzeciego dnia fermentacji lucerny, ograniczając tym samym pulę azotu amoniakalnego i ogólną liczebność *Enterobacteriaceae*, przy niskiej liczebności bakterii fermentacji mlekowej, co wykazali Tao i in. (2020a) oraz Tao i in. (2020b).

2.5. Proponowane metody ograniczenia proteolizy w zakiszaniu lucerny

Wykorzystując dotychczasową wiedzę warto zwrócić uwagę ponownie na taniny w zakiszaniu lucerny. Obecnie przeprowadzone badania obejmowały dodatek ekstraktów taninowych pozyskiwanych z różnych gatunków roślin, które w większości nie należały do upraw paszowych. Natomiast nie podjęto prób aplikacji dodatku w innej formie, jak na przykład dodatek roślin naturalnie zasobnych w taniny. W grupie roślin pastewnych wysoką zawartością tychże związków może wyróżnić się m.in. komonica zwyczajna, należąca do wieloletnich roślin bobowatych drobnonasiennych. Roślina ta jest odporna na wiele stresów środowiskowych, a ponadto ma niskie wymagania glebowe. Uprawa może być prowadzona w siewie czystym bądź też w wielu krajach występuje mieszankach z trawami (Aerts i in., 1999; Dear, Moore, Hughes, 2003; Striker, Insausti, Grimoldi, Ploschuk, Vasellati, 2005). Komonica zwyczajna poza taninami, zasobna jest

w flawonoidy, kwas oleanolowy i saponiny. Często zajmuje ważne miejsce w składzie runi pastwiskowej, ponieważ dzięki obecności wtórnych metabolitów wykazuje działanie przeciwpasożytnicze (Aerts i in., 1999), przeciwutleniające, immunomodulujące (Lin, Kuo, Chou, 2002), a także przeciwzapalne i przeciwbólowe (Wang, Gao, Kou, Zhu, Yu, 2008). Literatura podaje, że zawartość tanin w tejże roślinie może wahać się od 2 – 14 $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy (Hedqvist, Mueller-Harvey, Reed, Krueger, Murphy, 2000; Grabber, 2009), a nawet do 21 – 39 $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy (Woodward, Laboyrie, Jansen, 2000). Koncentracja powyższych związków biologicznie aktywnych zależy od regionu uprawy, klimatu i warunków środowiskowych. Dodatkowym czynnikiem wyjaśniającym tak wysokie różnice jest zastosowana metoda analityczna oznaczenia poziomu tanin (Hedqvist i in., 2000).

Wykorzystując właściwości biologiczne tanin przeprowadzono doświadczenie, samodzielnego zakiszenia lucerny, koniczyny czerwonej i komonicy zwyczajnej, która uzyskała najniższą zawartość frakcji białka nierozpuszczalnego w neutralnym detergencie i białka nierozpuszczalnego w kwaśnym detergencie, a także zmniejszony udział azotu amoniakalnego (Hymes-Fecht, Broderick, Muck, Grabber, 2013). Powyżej cytowane badania obejmowały jedynie wpływ na zakres proteolizy samodzielnie zakiszanych roślin. Nie dotyczyły współzakiszania lucerny z komonicą zwyczajną jako źródła tanin, co mogłoby pozwolić na pozyskanie nowych informacji, a według Hymes-Fecht i in. (2003) komonica zwyczajna jest równie wartością rośliną do zakiszenia podobnie jak lucerna.

Następnym rozwiązaniem może być zastosowanie łuski bobiku, będącej produktem ubocznym uszlachetniania nasion bobiku i jednocześnie będącej źródłem tanin oraz pełniącej funkcję absorbentu, zwłaszcza gdy zielonka z lucerny jest zbyt wilgotna. Zawartość skondensowanych tanin w konwencjonalnych odmianach bobiku wynosi średnio od 5 g do 10 $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy. Niemniej jednak nasiona bobiku składają się z łuski, czyli okrywy nasiennej i bielma, których skład chemiczny i wartość odżywcza jest zróżnicowana (Duc, Marget, Esnault, Guen, Bastiannelli, 1999). W nasionach bobiku, taniny koncentrują się głównie w łusce i dlatego też mogą być łatwo eliminowane poprzez proces obłuszczenia (Duc i in., 1999). Duc i in. (1999) podają, że od 137 g do 146 $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy nasion stanowi łuska. Wyniki te potwierdza praca Milczarek, Osek (2016), gdzie udział łuski wynosił średnio 133 $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy, a udział bielma odpowiednio 867 $g \cdot kg^{-1}$ suchej masy nasion. Według van der Poel, Gravendeel, Boer (1991) po obłuszczeniu poziom tanin w łusce wahał się od 5,80% do 7,60%, natomiast

w bielmie wynosił od 0,56% do 0,65%. Wynikiem tego zabiegu uszlachetniającego jest powstanie produktu ubocznego jakim jest łuska, która z kolei jako źródło tanin może zostać powtórnie wprowadzona do łańcucha produkcyjnego jako by-product, podczas gdy bielmo nasion będzie głównym źródłem białka roślinnego (Carmo i in., 2020; Neacsu, McBey, Johnstone, 2017; Singh, Singh, Shevkani, Singh, Kaur, 2017). Poziomy zawartości tanin podane w literaturze są wartościami orientacyjnymi, zależnymi od odmiany bobiku, agrotechniki, warunków środowiskowych, ale również zastosowanej metody analitycznej do określenia ich poziomu (van der Poel i in., 1991). Niemniej jednak niezależnie od zróżnicowanego poziomu tanin w łusce, nie przeprowadzono dotychczas badań na temat możliwości wykorzystania łuski jako źródła tanin w zakiszaniu roślin, w tym właśnie lucerny. Zastosowanie łuski bobiku zgodnie z obecną wiedzą na temat aktywności tanin może ograniczyć proteolizę, a jednocześnie być innowacyjnym sposobem zagospodarowania produktu ubocznego, wprowadzając go powtórnie do łańcucha żywieniowego (Carmo i in., 2020; Ke i in., 2022).

W oparciu o dotychczasowe doniesienia w literaturze, za najistotniejszy czynnik odpowiedzialny za zakres proteolizy uznaje się tempo zmian pH, które może być modyfikowane (Jones, 2000). Ditlenek węgla powinien w bardzo krótkim czasie wyprzeć tlen obecny w zakiszanej masie, ze względu na wyższą gęstość gazu (Mazzoldi, Hill, Colls, 2008), lub kompensować niewystarczające wypełnienie wolnych przestrzeni powietrzem, a tym samym skrócić fazę tlenowa zakiszania. W szczególności pozwoli to na zahamowanie działalności mikroorganizmów tlenowych i w efekcie zmniejszyć tlenowe straty cukrów oraz obniżyć temperaturę zakiszanej masy. Ze względów praktycznych aplikacja ditlenku węgla w postaci gazowej jest wręcz niemożliwa w trakcie produkcji pasz objętościowych. Rozwiązaniem może być dodatek suchego lodu, czyli ditlenku węgla, który występuje w stanie stałym w temperaturze -78,8°C, a przy wzroście temperatury przechodzi w stan gazowy (sublimacja). Ze względu na właściwości ma szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, np. czyszczenie suchym lodem, dezynfekcja żywności, przechowywanie w niskich temperaturach czy granulacja farmaceutyczna. Suchy lód jest produktem ubocznym przemysłu chemicznego powstającym w największych ilościach przy produkcji amoniaku. Skompresowany do stanu stałego jest nieszkodliwy i może zostać wykorzystany powtórnie w innych gałęziach gospodarki (Chen, Zhang, 2014; Liu, Maruyama, Matsusaka, 2010; Witte i in., 2017).

Według literatury (Nussbaum, 1996) ditlenek węgla w formie suchego lodu z kwasu węglowego ma niską temperaturę i zapobiega rozprzestrzenianiu się ciepła w silosie w porównaniu z kwasem węglowym pochodzącym z biologicznego utleniania lub naturalnych procesów fermentacyjnych. Pierwsze badania dotyczące zastosowania suchego lodu w produkcji kiszonek dotyczyły właśnie lucerny i zostały opublikowane w 1962 roku w formie streszczenia (Mentler, 1962). Autor pracy przeanalizował zawartość podstawowych składników odżywczych i wybrane parametry fermentacji. W przeprowadzonych badaniach Mentler (1962) wykazał, że w skali laboratoryjnej zastosowanie dawki od 2 g do 14 g suchego lodu·dm^{-3} nie miało wpływu na jakość sporządzonej kiszonki, a straty składników pokarmowych były zbieżne dla wariantów doświadczalnych i grupy kontrolnej.

Rekomendowany poziom suchego lodu wynosi 1 kg·m^{-3} kiszonki (Nussbaum, 1996). Dodatek suchego lodu w badaniach Nussbaum (1996) nie wpłynął jednak na poprawę jakości procesu fermentacji kiszonki z kukurydzy. Badania Thaysen (1996) wykazały zmniejszenie strat podczas kiszenia kukurydzy oraz wyższą jakość fermentacji.

Wprowadzając suchy lód do zakiszanej masy wprowadzamy ditlenek węgla, który może wydawać się niepożądany ze względu na emisję do środowiska. Jednak tlen, który występuje między cząstkami roślin w pierwszej fazie fermentacji także jest metabolizowany do ditlenku węgla, tak więc wprowadzając suchy lód nie wpływamy negatywnie na środowisko. Szybciej możemy uzyskać warunki beztlenowe w zakiszanej roślinie, skracając procesy zachodzące w początkowej fazie kiszenia. Powstały w wyniku sublimacji ditlenek węgla może także wpłynąć na zakwaszenie środowiska, obniżając pH już na początku fermentacji. Szybkość sublimacji uwarunkowana jest takimi czynnikami, jak temperatura, ciśnienie, wilgotność oraz wielkość granul (Mazzoldi i in., 2008).

Dotychczas w zakiszaniu zbadano wpływ suchego lodu na skład chemiczny, wybrane parametry fermentacji, straty składników odżywczych w kiszonce z lucerny, a także możliwości poprawy stabilności tlenowej kiszonki z kukurydzy. Jedynie Nussbaum (1996) przedstawił zmiany temperatury, pH, liczebności bakterii oraz drożdży w różnych odstępach czasowych. Istniejące badania nie wskazują jednoznacznie na zakres działania suchego lodu w zakiszaniu roślin paszowych. Obszar badań dotychczas był zawężony jedynie do kiszonki z kukurydzy. Dotychczas nie podjęto prób dodatku suchego lodu do innych surowców kiszonkarskich. Podobnie nie analizowano wpływu tego dodatku na jakość białka. Dodatkowym argumentem jest możliwość znalezienia kolejnej ścieżki wykorzystania suchego lodu jako produktu ubocznego przemysłu.

3. Hipotezy badawcze

Dotychczasowy stan wiedzy nad możliwością hamowania proteolizy podczas procesu zakiszania i poprawy jakości białka kiszonki z lucerny pozwala postawić następujące hipotezy badawcze:

1. współzakiszanie lucerny z komonicą zwyczajną jako źródłem tanin może pozwolić na ograniczenie hydrolizy białka właściwego, w wyniku tworzenia kompleksów taninowo-białkowych, jednocześnie nie obniżając wartości białkowej sporządzonych kiszonek;

2. dodatek łuski bobiku jako źródła tanin, jednocześnie pełniącego funkcję absorbentu może zredukować proteolizę białka lucerny, poprawiając przy tym parametry fermentacji kiszonek, a dodatkowo pozwolić na nowy kierunek zagospodarowania produktu ubocznego procesu obłuszczania nasion bobiku;

3. ditlenek węgla powstały podczas sublimacji suchego lodu może wpłynąć na modyfikację atmosfery gazowej środowiska zakiszanej masy lucerny, skracając tlenową fazę fermentacji, ograniczając straty cukrów, tworząc kompleks mikroorganizmów pożądanych, co w efekcie pozwoliłoby na szybsze zakwaszenie masy roślinnej i zahamowanie aktywności roślinnych enzymów proteolitycznych, redukując degradację białka właściwego;

4. zastosowane dodatki poprzez wprowadzenie hamujących tanin lub skrócenie fazy tlenowej zakiszania mogą wpłynąć pozytywnie na mikrobiom kiszonek z lucerny.

4. Cele pracy

Niniejsza praca miała na celu:

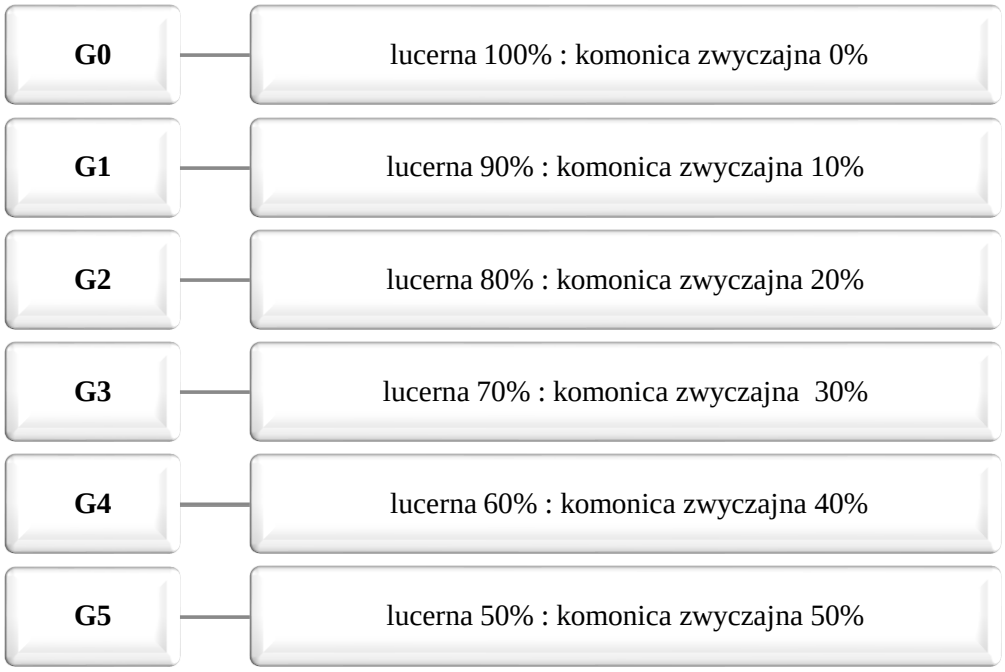
1. ocenę wpływu dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, rozkładalność żwaczową *in vitro* białka oraz mikrobiom sporządzonych kiszonek, jak i również określenie optymalnego poziomu zastosowanych dodatków;
2. ocenę możliwości wykorzystania łuski bobikowej jako dodatku do zakiszania lucerny;
3. porównanie zastosowania komonicy zwyczajnej i łuski bobikowej, pełniących rolę różnych źródeł tanin, jako czynników potencjalnie hamujących przemiany proteolityczne białka lucerny podczas zakiszania;
4. ocenę skuteczności dodatku suchego lodu w zależności od stopnia przewiędnięcia lucerny.

5. Materiał i metody badań

5.1. Układ doświadczeń

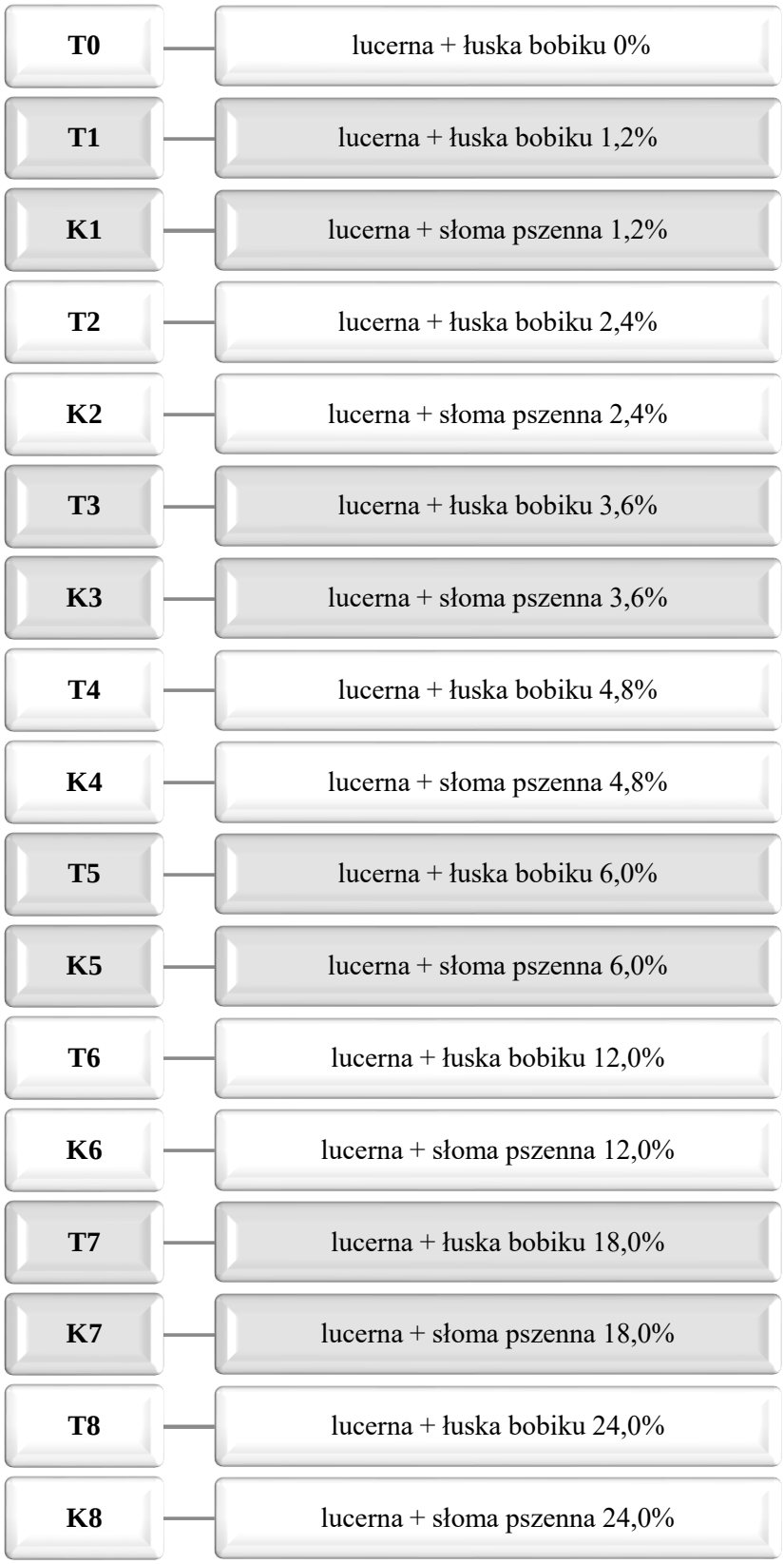
Postawione w pracy hipotezy i cele zostały zrealizowane w trzech zadaniach badawczych, wykonanych w latach 2020 – 2022. W poszczególnych zadaniach analizowano wpływ różnych poziomów wybranego dodatku komonicy zwyczajnej, łuski bobiku i suchego lodu na skład chemiczny, frakcje węglowodanowe, frakcje białkowe, wybrane parametry fermentacji, rozkładalność żwaczową *in vitro* białka ogólnego i suchej masy oraz mikrobiom sporządzonych kiszonek.

W zadaniu badawczym I sporządzono kiszonki z lucerny i komonicy zwyczajnej zgodnie z proporcjami przedstawionymi na Schemacie 3.



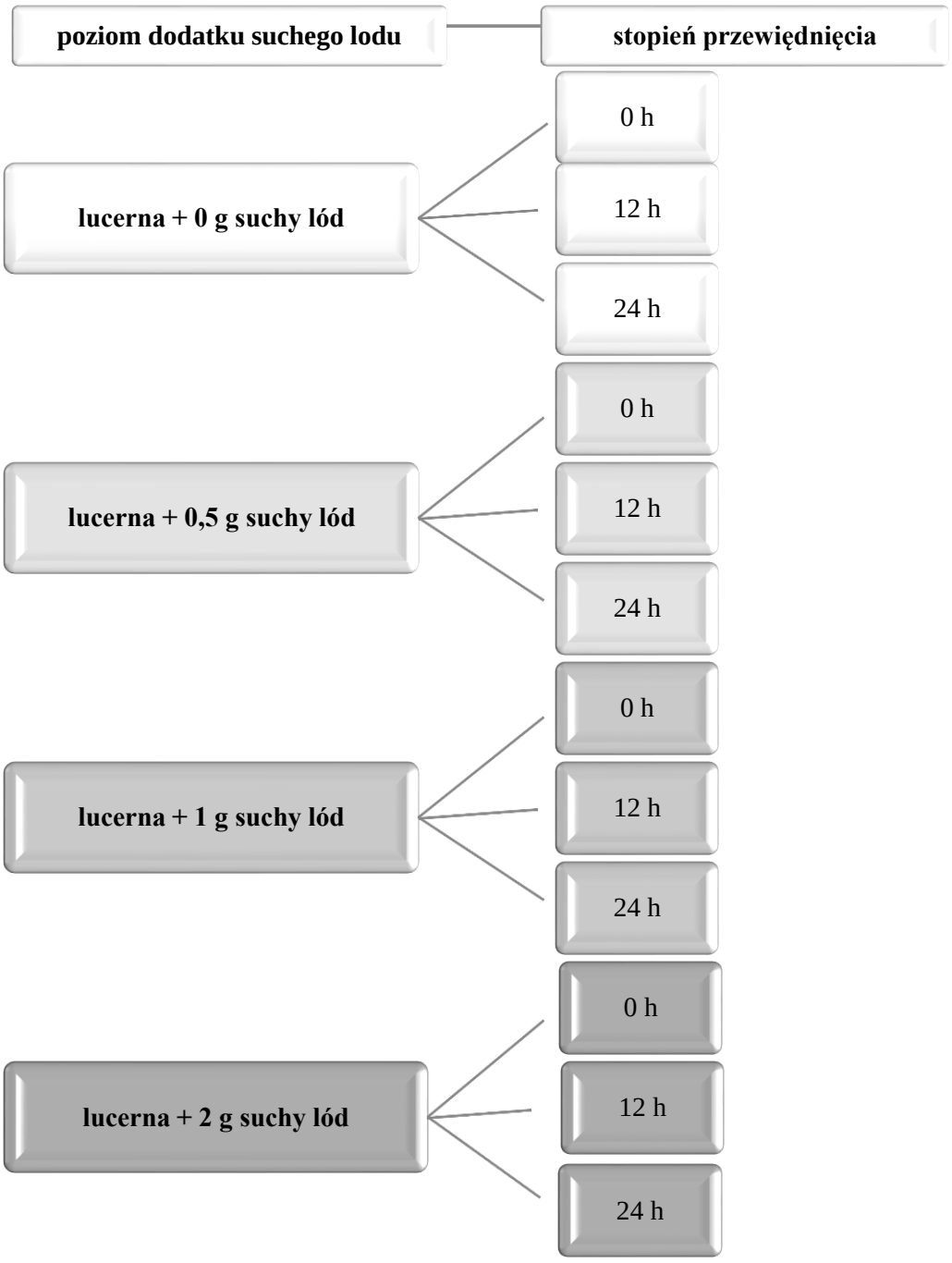
Schemat 3. Schemat doświadczenia realizowanego w zadaniu badawczym I (źródło: opracowanie własne)

W zadaniu badawczym II sporządzono kiszonki lucerny z różnym dodatkiem łuski bobiku (Schemat 4). Poza podstawową grupą kontrolną – „negatywną", obejmującą zakiszenie lucerny bez dodatku, każdemu poziomowi dodatku łuski bobikowej odpowiadał analogiczny dodatek słomy pszennej jako absorbentu stanowiącego grupę kontrolną „pozytywną".



Schemat 4. Schemat doświadczenia realizowanego w zadaniu badawczym II (źródło: opracowanie własne)

W zadaniu badawczym III sporządzono kiszonki z lucerny, uwzględniając dwa czynniki: poziom dodatku suchego lodu (0 g, 0,5 g, 1 g, 2 g) i stopień przewiędnięcia surowca (0 – 0 h, I – 12 h, II – 24 h) (Schemat 5).



Schemat 5. Schemat doświadczenia realizowanego w zadaniu badawczym III (źródło: opracowanie własne)

5.2. Przygotowanie kiszonek

Badania przeprowadzono na materiale roślinnym pochodzącym z plantacji komercyjnych, zlokalizowanych na terenie północnej Polski w obrębie jednej gminy, co pozwoliło na sporządzenie kiszonek w oparciu o zbliżone warunki glebowo-klimatyczne.

5.2.1. Zadanie badawcze I

Kiszonki doświadczalne sporządzono z lucerny siewnej i komonicy zwyczajnej, pochodzących z plantacji komercyjnych, zlokalizowanych w północnej Polsce (54°13′21″N, 20°48′16″E). Lucerna została zebrana w drugim roku, a komonica zwyczajna w pierwszym roku użytkowania plantacji. Zbiór zielonek przeprowadzono w 2020 roku, w pierwszym pokosie, w fazie początku pąkowania dla każdej z roślin, na wysokości 5 cm, kosiarką dyskową Krone AM 283 S (Krone GmbH, Spelle, Niemcy), w godzinach 12:00 – 13:00. Obie zielonki rozłożono na pokosach i pozostawiono do kolejnego dnia w celu przewiędnięcia w warunkach wiaty gospodarczej z zadaszeniem. Następnie zebrany materiał roślinny został rozdrobniony ręcznie do średniej długości sieczki 25 mm, z którego przygotowano mieszaniny lucerny z komonicą zwyczajną według układu doświadczenia (Schemat 3). Wymieszany materiał roślinny został zagęszczony do 750 kg świeżej masy (FM)·m^{-3} w mikrosilosach o objętości 1 dm^3, w trzech powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczalnego. Próby zielonki zostały pobrane po przewiędnięciu, a próby kiszonek po otwarciu mikrosilosów.

5.2.2. Zadanie badawcze II

Kiszonki doświadczalne zostały sporządzone z lucerny siewnej, pochodzącej z plantacji komercyjnej, zlokalizowanej w północnej Polsce (54°13′21″N, 20°48′16″E). Zbiór zielonki przeprowadzono w 2020 roku, w drugim roku użytkowania plantacji. Zielonka pochodziła z drugiego pokosu, zebrana została w fazie początku pąkowania roślin na wysokości 5 cm, kosiarką dyskową Krone AM 283 S (Krone GmbH, Spelle, Niemcy), w godzinach 12:00 – 13:00. Zielonkę pozostawiono do kolejnego dnia w celu przewiędnięcia w warunkach wiaty gospodarczej z zadaszeniem. Zebrany materiał roślinny został rozdrobniony ręcznie do średniej długości sieczki 25 mm. Łuska bobiku pochodziła z nasion odmiany Bobas z plantacji komercyjnej, położonej w północnej Polsce (54°12′32″N, 20°47′01″E), na której wysiano kwalifikowany materiał siewnych C1. Łuskę bobiku pozyskano w wyniku mechanicznego procesu obłuszczenia zebranych nasion. Słoma pszenna wykorzystana w doświadczeniu pochodziła ze zbiorów

z uprzedniego roku 2019, składowana była w odpowiednich warunkach do zachowania jej bardzo dobrej jakości mikrobiologicznej. W oparciu o układ doświadczenia (Schemat 4) przygotowano mieszaniny lucerny z łuską bobiku oraz lucerny z dodatkiem słomy pszennej, które zostały zagęszczone do 750 kg FM·m^{-3} w mikrosilosach o objętości 1 dm^3, w trzech powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczalnego. Próby zielonki zostały pobrane po przewiędnięciu lucerny, a próby kiszonek po otwarciu mikrosilosów. Próbę łuski bobiku pobrano po obłuszczeniu.

5.2.3. Zadanie badawcze III

Kiszonki doświadczalne sporządzono z lucerny siewnej, zebranej w drugim roku użytkowania plantacji, położonej w północnej Polsce (54°12′03″N, 20°49′33″E) w 2022 roku. Zbiór zielonki przeprowadzono w pierwszym pokosie w fazie początku pąkowania roślin na wysokości 5 cm, kosiarką dyskową Krone AM 283 S (Krone GmbH, Spelle, Niemcy), w godzinach 12:00 – 13:00. Część zielonki została zebrana bezpośrednio po ścięciu (0 h więdnięcia), pozostałą część zielonki rozłożono na pokosach, o takiej samej grubości w warunkach wiaty gospodarczej z zadaszeniem i pozostawiono przez 12 h i 24 h do przewiędnięcia. Zebraną zielonkę rozdrobniono mechanicznie do średniej długości sieczki 25 mm. Zielonka świeża i przewiędnięta została zakiszona w mikrosilosach o objętości 1 dm^3, w trzech powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczalnego według Schematu 5. Podczas sporządzania kiszonek po zagęszczeniu 50% masy zielonki w mikrosilosie dodawano suchy lód w formie granul o średnicy 16 mm i kontynuowano zagęszczanie masy roślinnej do ustalonego poziomu (750 kg FM·m^{-3}). Mikrosilosy zaopatrzone w rurki fermentacyjne zostały zamknięte po zakończeniu zagęszczania materiału roślinnego. Próby zielonki zostały pobrane bezpośrednio po ścięciu oraz po 12 h i 24 h więdnięcia lucerny, a próby kiszonek po otwarciu mikrosilosów.

5.3. Analizy chemiczne

Kiszonki z każdego zadania badawczego zostały otwarte po 90 dniach. Reprezentatywne próby zielonek po zbiorze i kiszonek po otwarciu mikrosilosów z każdego powtórzenia wariantu doświadczalnego zamrożono w -25°C, a pozostałość prób podsuszono w 60°C przez 48 h w podsuszarce Binder FED 115 (Binder, GmbH, Tuttlingen, Niemcy), a następnie zmielono w młynku do materiałów włóknistych (ZM 200, Retsch, Haan, Niemcy) do cząstek o wielkości 1 mm.

Uprzednio przygotowany materiał roślinny został poddany analizom chemicznym, których zakres wykonania dla poszczególnych prób przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Zakres wykonanych analiz chemicznych (źródło: opracowanie własne)

Analiza chemiczna	Zielonki	Łuska bobiku	Kiszonki
Podstawowy skład chemiczny			
Sucha masa	+	+	+
Popiół surowy	+	+	+
Białko ogólne	+	+	+
Tłuszczu surowy	+	+	+
Włókno surowe	+	+	+
Frakcje węglowodanowe			
WSC	+	-	+
NDF	+	+	+
ADF	+	+	+
ADL	+	+	+
Frakcje białkowe			
TP	+	-	+
SCP	+	-	+
NDICP	+	-	+
ADICP	+	-	+
Pojemność buforowa	+	-	-
Poziom tanin	+	+	-
Parametry fermentacji			
pH	-	-	+
$N\text{-}NH_3$	+	-	+
etanol	-	-	+
kwas mlekowy	-	-	+
kwas octowy	-	-	+
kwas propionowy	-	-	+
kwas izomasłowy	-	-	+
kwas masłowy	-	-	+
kwas izowalerianowy	-	-	+
kwas walerianowy	-	-	+

Poziom tanin został oznaczony w zielonce z komonicy zwyczajnej i łusce bobiku.

Oznaczenia analityczne przeprowadzono według następujących procedur:

- zawartość podstawowych składników pokarmowych, tj. sucha masa (SM), popiół surowy (PS), białko ogólne (BO), tłuszczu surowy (TS), włókno surowe (WS), oznaczono z wykorzystaniem standardowych metod AOAC (2016);
- frakcje węglowodanów strukturalnych, tj. włókno neutralno-detergentowe (NDF) oznaczono z użyciem termostabilnej amylazy i wyrażono bez pozostałości popiołu, włókno kwaśno-detergentowego (ADF) wyrażono bez pozostałości popiołu i lignina kwaśno-detergentowa (ADL), analizowane zgodnie z metodyką Van Soest, Robertson, Lewis (1991), przy użyciu analizatora włókna ANKOM^{220} (ANKOM Technology Corp., Macedon, Nowy Jork, USA);
- zawartość węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie (WSC) analizowano metodą antronową według Thomas (1977) przy użyciu spektrofotometru EPoll 20 BIO (Poll Limited Sp. z o.o., Warszawa, Polska);
- pojemność buforowa została oznaczona według metody McDonald, Henderson (1962) z wykorzystaniem kwasu mlekowego;
- analizę białka właściwego (TP) wytrąconego przy użyciu kwasu trichloroocotwego o stężeniu 10%, a także frakcji białka ogólnego części rozpuszczalnej w buforze boranowo-fosforanowym (SCP), białka ogólnego części nierozpuszczalnej w neutralnym detergencie (NDICP) i białka ogólnego części nierozpuszczalnej w kwaśnych detergencie (ADICP), wykonano w oparciu opisu metodycznego według Licitra i in. (1991);
- zawartość azotu amoniakalnego (N-NH_3) określono metodą bezpośredniej destylacji przy użyciu aparatu do destylacji 2100 Kjeltec (Foss Analytical A/S, Hilleröd, Dania);
- kwasowość mierzono pH-metrem HI 8314 (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA);
- koncentrację kwasu mlekowego i lotnych kwasów tłuszczowych (LKT) tj. kwasu octowego, propionowego, izomasłowego, masłowego, izowalerianowego, walerianowego, a także etanolu określono według metody podanej przez Kostulak-Zielińska, Potkański (2001) oraz Gąsior (2002). Próby zostały zhomogenizowane w pięciokrotnej w stosunku do masy próby objętości wody, następnie przesączone i wyciśnięte przez gazę młyńską. Uzyskany filtrat ponownie przesączono (miękki sączek), odbiałczono 24% roztworem kwasu

metafosforowego i odwirowano (13000 obr·min^{-1}, w czasie 7 minut). W supernatancie oznaczono zawartość kwasu mlekowego, LKT oraz etanolu. Rozdział i oznaczanie LKT przeprowadzono metodą chromatografii gazowej przy użyciu chromatografu gazowego Varian 450-GC z użyciem autosamplera Varian CP-8410 (Varian Inc., Palo Alto, Kalifornia, USA), z wykorzystaniem detektora płomieniowo–jonizacyjnego (FID), kolumny kapilarnej CP-FFAP o długości 25 m, średnicy wewnętrznej 0,53 mm, grubości filmu 1,0 μm. Wielkość nanoszonej próby 1,0 μl. Temperatura detektora wynosiła 260°C, dozownika 200°C, a kolumny 90°C → 200°C. Gazem nośnym był hel (przepływ 5,0 ml·min^{-1}). Kwas mlekowy oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, SHIMADZU, Kioto, Japonia), z przepływem izokratycznym. Do rozdziału użyto kolumny METACARB 67H (ORGANIC ACIDS COLUMN) firmy Varian (Varian Inc., Palo Alto, Kalifornia, USA), fazy nośnej w postaci 0,002 M roztworu kwasu siarkowego w wodzie dejonizowanej, zastosowano przepływ 1 cm^3·min^{-1}, detektor UV, 210 nm. Wykorzystano metodę standardu zewnętrznego w oparciu o wzorce analizowanych kwasów i etanolu firmy SUPELCO (Sigma-Adrich, Company Ltd., Saint Louis, MI, USA), zaś wzorzec kwasu mlekowego – firmy FLUKA (Chemie GmbH, Buchs, Switzerland);

- poziom tanin w zielonce z komonicy zwyczajnej i łusce bobiku analizowano z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej zgodnie z normą BN-90/79160-62.

Określenie poziomu tanin wykonano w Krajowym Laboratorium Pasz Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Lublinie. Pozostałe analizy chemiczne zostały wykonane w Laboratorium Katedry Żywienia Zwierząt, Paszoznawstwa i Hodowli Bydła, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

5.4. Rozkładalność żwaczowa *in vitro*

Dynamikę rozkładalności żwaczowej SM i BO zielonek i kiszonek oznaczono *in vitro* metodą grawimetryczną z użyciem inkubatora Daisy II (ANKOM Technology, Fairport, Nowy Jork, USA) oraz woreczków filtracyjnych F57 firmy ANKOM, o wymiarach 5,0 × 5,5 cm i wielkości porów 25 μm (ANKOM Technology, Fairport, Nowy Jork, USA). Postępowano zgodnie z procedurą firmy ANKOM oraz metodą opisaną przez Trujillo, Marichal, de Carriquiry (2010). Do analizy przeznaczono próby pasz powietrznie suchych. Woreczki filtracyjne przepłukano w acetonie w celu usunięcia związków powierzchniowo-czynnych i całkowicie wysuszono, a następnie zważono

w celu uzyskania masy pustego woreczka. Kolejno do opisanych woreczków nawożono 0,25 g paszy, po czym szczelnie zamknięto za pomocą zgrzewarki Heat Sealer#1915 (ANKOM Technology, Fairport, Nowy Jork, USA). Przygotowane woreczki filtracyjne wraz z próbami paszy umieszczono w naczyniach inkubatora Daisy II w ilości 24 woreczków w każdym z czterech naczyń. Rozłożenie woreczków było równomierne po obu stronach przegrody w każdym naczyniu inkubacyjnym. Woreczki zostały umieszczone w mieszaninie płynu żwaczowego i roztworze mieszaniny buforów A i B w temperaturze 39°C ± 2°C. Mieszanina składała się z 1600 ml mieszaniny buforu B (w składzie którego były: Na_2CO_3 i $Na_2S \cdot 9H_2O$) i buforu A (w składzie którego były: KH_2PO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, mocznik) w stosunku 1:5 oraz 400 ml przefiltrowanego płynu żwaczowego. Donorami płynu żwaczowego było pięć owiec rasy Polska owca długowełnista odmiana kamieniecka z przetokami dożwaczowymi (zgoda Lokalnej Komisji Etycznej nr 73/2021). Owce były karmione standardową dietą zgodnie z normami żywienia INRA (2009). Płyn żwaczowy był pobierany około 1,5 h po porannym karmieniu, przefiltrowany przez dwuwarstwową gazę serowarską do szczelnego pojemnika ze stałym dostępem ditlenku węgla (CO_2). W warunkach laboratoryjnych płyn odwirowano w wirówce laboratoryjnej MPW-350R (MPW INSTRUMENTS, Warszawa, Polska) z prędkością 3000 obr·min^{-1} przez 30 sekund, celem oderwania mikroorganizmów związanych z treścią pokarmową i utrzymania właściwych warunków mikrobiologicznych dla analizy *in vitro*. Ponownie filtrowano płyn z uzyskaną masą przez czterowarstwową gazę serowarską do kolby, gdzie był ciągle przepuszczany CO_2.

Próby paszy jako oznaczone woreczki w naczyniach inkubowano przez okres 0, 2, 4, 8, 24 i 48 h, w ilości woreczków dla kolejnych przedziałów czasowych: 0 h – 3 szt., 2, 4, 8, 24 h – 6 szt., 48 h – 9 szt. Woreczki godziny 0 były moczone w wodzie destylowanej o temperaturze 39°C ± 2°C przez okres 15 minut. Po zakończeniu inkubacji woreczki wyjęto z naczynia, opłukano zimną, bieżącą wodą. Następnie wypłukano w wodzie w 3 cyklach. Woreczki z pozostałością po inkubacji wysuszono do stałej masy w temperaturze 60°C nie dłużej niż przez 48 godzin w suszarce laboratoryjnej. Wysuszone i ostudzone w eksykatorze woreczki filtracyjne ponownie zważono na wadze analitycznej dla uzyskania masy woreczka z próbką paszy po inkubacji. Uzyskane pozostałości prób poddano analizie na zawartość BO zgodnie z standardową procedurą AOAC (2016).

5.5. Analizy mikrobiologiczne

Próby kiszonek (10 g) zhomogenizowano z wodą destylowaną klasy I w stosunku 1:10, przy użyciu blendera ręcznego firmy Bosch (Bosch, Gerlingen, Niemcy), przez 45 sekund. Po przygotowaniu każdej próby blender był oczyszczony i przepłukany wodą destylowaną. Następnie użyto barwnika – monoazydek propidyny i za pomocą urządzenia do fotolizy LED PMA-Lite™ (Biotium Inc., Landing Parkway, Fremont, Kalifornia, USA) zapewniono analizę molekularną materiału genetycznego pochodzącego tylko i wyłącznie od żywych komórek mikroorganizmów. DNA wyizolowano z zebranego materiału za pomocą zestawu GeneMATRIX Soil DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Polska) na podstawie instrukcji dołączonej przez producenta i oznaczono ilościowo metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR; qPCR w czasie rzeczywistym).

Liczbę kopii genów bakteryjnych (odpowiadającej względnej liczbie bakterii w próbce) określono w teście TaqMan z użyciem Maxima Probe/ROX Real-time PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), 2 µl wyekstrahowanego DNA, pary starterów i sondy. Liczbę kopii 16S rDNA domeny bakterie określono za pomocą starterów BAC338F oraz sondy BAC516F.

Całkowitą liczbę bakterii *Lactobacillus* spp. określono metodą real-time PCR z wykorzystaniem starterów F_alllact_IS i R_alllact_IS oraz sondą P_alllact_IS według metodyki podanej przez Haarman, Knol (2006). Dla każdej z reakcji objętość wynosiła 20 µl, składając się w tym z 0,5 µl każdego startera i 0,2 µM sondy, 2 µM wyizolowanego DNA i 10 µl Maxima Probe qPCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Profil reakcji był następujący: początkowa denaturacja w temperaturze 95°C przez 10 minut, następnie 45 cykli denaturacji w 95°C przez 15 sekund i przyłączanie/elongacja w temperaturze 60°C przez okres 60 sekund. Standard stanowiły *Bacillus subtilis* i *Lactobacillus plantarum*.

Analizowano całkowitą liczebność bakterii *Clostridium* spp. z wykorzystaniem starterów CI-F1 i CI-R2 oraz sondy Probe-1, zgodnie z opisem metodycznym według Song, Liu, Finegold (2004). Objętość reakcji wynosiła 20 µl, w tym zawierała 0,5 µl każdego startera i 0,2 µM sondy, 2 µM wyizolowanego DNA i 10 µl Maxima Probe qPCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Profil reakcji obejmował: denaturację początkową w 95°C przez 10 minut, następnie 45 cykli denaturacji w temperaturze 95°C przez 20 sekund i przyłączenie starterów

w temperaturze 63°C przez czas 30 sekund, elongację w 72°C w czasie 45 sekund. Standardem było *Clostridium perfringens*.

Całkowitą liczbę bakterii *Bacillus* spp. określono przy pomocy starterów 16SBACF i 16SBACR według Mora, Cabrefiga, Montesinos (2011). Objętość reakcji wynosiła 20 µl, w tym zawierała 0,5 µl każdego startera, 0,2 µM sondy, 2 µM wyizolowanego DNA próby i 10 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Profil reakcji był następujący: wstępna denaturacja w 95°C przez 10 minut, kolejno 45 cykli denaturacji w 95°C przez 15 sekund, przyłączenie starterów w 58°C przez 55 sekund i elongację w 72°C przez 30 sekund. Analizy krzywych topnienia prowadzono w następujący sposób: etap denaturacji w temperaturze 95°C przez 15 sekund, inkubację w 60°C przez 60 sekund i topienie w etapach co 0,3°C do 95°C przez 15 sekund. Standard stanowił *Bacillus subtilis*.

Całkowitą liczebność grzybów analizowano według Martin, Rygiewicz (2005) oraz Hemkemeyer, Christensen, Martens, Tebbe (2015) wykorzystując startery NSI1 i 58A2R. Całkowita objętość reakcji wynosiła 20 µl, zawierając 0,4 µM każdego startera, 2 µM wyizolowanego DNA próby i 10 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Profil reakcji obejmował: wstępną denaturację w 95°C przez 10 minut, następnie 45 cykli w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączenie starterów w temperaturze 52°C przez 30 sekund i elongację w 72°C przez 30 sekund oraz zbieranie danych fluorescencyjnych w temperaturze 78°C przez okres 15 sekund. Analizy krzywych topnienia prowadzono w następujący sposób: etap denaturacji w 95°C przez 15 sekund, inkubację w 60°C przez 60 sekund i topienie w etapach co 0,3°C do 95°C przez 15 sekund. Standardem było *Fusarium culmorum*.

Całkowitą liczebność drożdży określono zgodnie z Hierro, Esteve-Zarzoso, Gonzalez, Mas, Guillamon (2006) na podstawie starterów YEASTF i YEASTR. Całkowita objętość reakcji wynosiła 20 µl, zawierając 0,4 µM każdego startera, 2 µM wyizolowanego DNA próby i 10 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Profil reakcji obejmował wstępną denaturacją w 95°C przez 10 minut, a następnie 40 cykli w 95°C przez 15 sekund, przyłączenie starterów w 60°C przez 60 sekund i elongację w 72°C przez 30 sekund. Standard stanowiły *Saccharomyces* spp.

Każdy z testowanych powtórzeń wariantów analizowano w dwóch powtórzeniach. Wyniki qPCR zostały wyrażone jako liczba kopii genu każdej z analizowanych grup mikroorganizmów w SM kiszonek (log10 liczba kopii genu·g^{-1} SM).

Analiza struktury mikrobiomu bakteryjnego kiszonek została przeprowadzona za pomocą sekwencjonowania nanoporowego przy użyciu sekwenatora MinION (Oxford Nanopore Technologies Inc., Oxford, Wielka Brytania) z wykorzystaniem komercyjnego zestawu 16S Barcoding KIT (Oxford Nanopore Technologies Inc., Oxford, Wielka Brytania) wraz z załączoną procedurą producenta. Zgodnie z protokołem przygotowano bibliotekę i przeprowadzono sekwencjonowanie nanoporowe na podstawie izolacji 10µl DNA, zawierającego 10 ng genomowego DNA.

Główne etapy przygotowania biblioteki obejmowały:

1. PCR – amplifikację według następujących warunków cykli: początkowa denaturacja w temperaturze 95°C przez 60 sekund, następnie 25 cykli denaturacji w 95°C przez 20 sekund, 25 cykli inkubacji przez 30 sekund, 25 cykli elongacji w temperaturze 65°C przez 2 minuty i 1 cykl elongacji końcowej w 65°C przez 5 minut, przechowywanie w temperaturze 4°C.
2. Oczyszczenie amplikonów za pomocą kulek magnetycznych i etanolu (70%).
3. Fluorometryczny i spektorfotometryczny pomiar jakości i ilości DNA.
4. Łączenie wszystkich bibliotek z kodami kreskowymi w pożądanych proporcjach do całkowitej ilości 50-100 fmol w 10 µl 10 mM tris-HCl, pH 8,0 z 50 mM NaCl i dodaniem roztworu RAP.

Czynności związane z napełnianiem i ładowaniem komory przepływowej SpotON były następujące:

1. Przygotowanie mieszaniny do napełniania komory przepływowej, dodając bezpośrednio 30 µl rozmrożonego i wymieszanego Flush Tether do probówki z rozmrożonym i wymieszanym buforem Flush Buffer oraz mieszanie przez worteksowanie. Następnie załadowanie 800 µl mieszaniny zalewowej do komory przepływowej przez port zalewowy. Inkubacja trwała 5 minut.
2. Przygotowanie biblioteki do załadowania przez wymieszanie: 34 µl buforu do sekwencjonowania (SQB), 25,5 µl kulek do nanoszenia (B), 4,5 µl wody wolnej od nukleaz i 11 µl biblioteki DNA.
3. Następnie wlanie 200 µl mieszaniny gruntującej do komory przepływowej przez port zalewania.
4. Wprowadzenie kroplami 75 µl próby do kuwety przepływowej przez port próby SpotON.
5. Sekwencjonowanie i zbiór surowych wyników z wykorzystaniem oprogramowania EPI2ME.

5.6. Obliczenia i analizy statystyczne

5.6.1. Obliczenia

W zielonkach obliczono wskaźnik przydatności do zakiszania, określony stosunkiem WSC do pojemności buforowej (BC) (WSC/BC), a także współczynnik fermentacji (FC) zgodnie z równaniem podanym przez Weissbach, Auerbach (2013):

$$FC = SM(\%) + 8 \cdot \frac{WSC}{BC}$$

gdzie:

FC – współczynnik fermentacji,

SM – sucha masa zielonki (%),

WSC – węglowodany rozpuszczalne w wodzie (g·kg^{-1} SM),

BC – pojemność buforowa (g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM).

Zawartość SM kiszonek doświadczalnych skorygowano dla pasz podsuszanych w 60°C, zgodnie z równaniem według Porter, Murray (2001):

$$skorygowana\ SM\ (g \cdot kg^{-1}) = 19{,}96 + (0{,}987 \cdot SM\ (g \cdot kg^{-1}) - 0{,}26).$$

W zielonkach i kiszonkach doświadczalnych określono wskaźnik lignifikacji ścian komórkowych, wyrażony stosunkiem zawartości ligniny kwaśno-detergentowej jako frakcji ADL do zawartości frakcji NDF, opisany jako L/NDF.

Na podstawie składu analizowanych frakcji białkowych oraz koncentracji N-NH_3 dokonano rozdziału BO zgodnie z modelem The Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS) v 6.5 na następujące frakcje: PA1 – reprezentowaną przez N-NH_3; PA2 – stanowiącą część białka rozpuszczalnego w buforze; PB1 – opisującą białko nierozpuszczalne w buforze; PB2 – jako białko związanego z włóknem; PC – prezentującą białko niestrawne. Powyższe frakcje zostały obliczone na podstawie równań według Higgs i in. (2015) oraz Van Amburgh i in. (2015):

$$PA1 = N - NH_3 \cdot \frac{SCP}{100} \cdot \frac{BO}{100}$$

$$PA2 = SCP \cdot \frac{BO}{100} - PA1$$

$$PB1 = BO - (PA1 - PA2 - PB2 - PC)$$

$$PB2 = (NDICP - ADICP) \cdot \frac{BO}{100}$$

$$PC = ADICP \cdot \frac{BO}{100}$$

gdzie:

$PA1$ – azot amoniakalny (% BO),

$PA2$ – białko rozpuszczalne w buforze (% BO),

$PB1$ – białko nierozpuszczalne w buforze (% BO),

$PB2$ – białko związane z włóknem (% BO),

PC – białko niestrawne (% BO),

$N - NH_3$ – azot amoniakalny (% SCP),

SCP – białko rozpuszczalne w buforze (% BO),

BO – białko ogólne (% SM),

$NDICP$ – białko nierozpuszczalne w neutralnym detergencie (% BO),

$ADICP$ – białko rozpuszczalne w kwaśnym detergencie (% BO),

Rozkład SM (P_{SM}) w żwaczu dla każdego powtórzenia i czasu inkubacji obliczono ze wzoru według Kowalski i in. (2008):

$$P_{SM} = 100\ x\ \frac{B - (C - A)}{B}$$

gdzie:

P_{SM} – rozkład suchej masy w żwaczu (%),

A – sucha masa pustego woreczka (g),

B – sucha masa próby przed inkubacją (g),

C – sucha masa woreczka wraz z pozostałością po inkubacji (g).

Rozkład BO (P_{BO}) w żwaczu dla każdego powtórzenia i czasu inkubacji obliczono ze wzoru podanego przez Kowalski i in. (2008):

$$P_{BO} = 100\ x\ \frac{D - E}{D}$$

gdzie:

P_{BO} – rozkład białka ogólnego w żwaczu (%),

D – ilość białka ogólnego w suchej masie próby przed inkubacją (g),

E – ilość białka ogólnego w suchej masie próby po inkubacji (g).

5.6.2. Ocena i przygotowanie danych do analiz statystycznych

W celu określenia parametryzacji danych, wyniki obserwacji (zmienne zależne) poddano ewaluacji normalności rozkładu z zastosowaniem testu Shapiro-Wilk`a oraz sprawdzano homogeniczność wariancji przy pomocy testu Levene`a. Testowanie przeprowadzono na poziomie całej populacji wyników dla danej obserwacji, a także dla efektów głównych oraz poszczególnych wariantów doświadczenia. Ze względu na wieloczynnikowość eksperymentów oraz mieszany charakter zależności prób, podjęto kroki w celu umożliwienia przeprowadzenia testów parametrycznych (modelowania). W przypadku nie spełnienia warunków testu Shapiro-Wilk`a, analizowano współczynnik skośności i jeśli wynik mieścił się w przedziale od -0,67 do 0,67 wyniki uznawano za nadające się do dalszego postępowania. Współczynnik skośności (A) analizowano według następującego równania:

$$A = \frac{\bar{X} - Mo}{S_x}$$

gdzie:

A – współczynnik skośności,

$\bar{X}$ – średnia wartości obserwacji,

Mo – dominanta (moda),

S_x – odchylenie standardowe.

Wyniki nie spełniające kryteriów skośności oraz testu Levene`a poddano przekształceniu Box`a-Cox`a przy optymalnej wartości λ obliczonej automatycznie, co umożliwiło zakwalifikowanie ich do przeprowadzenia testów parametrycznych. Transformacja danych dla obserwacji wyników dotyczących poziomu etanolu w kiszonkach doświadczalnych nie przyniosła zadowalającego efektu, dlatego postanowiono odrzucić tą grupę wyników z dalszego postępowania i wykonano testowanie nieparametryczne w celach poglądowych. Przekształcenie Box`a-Cox`a było następujące (Box, Cox, 1964):

$$y(\lambda) = \begin{cases} \dfrac{(y + \lambda_2)^{\lambda_1} - 1}{\lambda_1} & jeśli\ \lambda_1 \neq 0 \\ \log(y + \lambda_2) \quad jeśli\ \lambda_1 = 0 \end{cases}$$

gdzie:

λ – parametr kontrolujący kształt transformacji,

y – wektor funkcji.

5.6.3. Analizy statystyczne

Wyodrębnienie wartości P w każdym zadaniu wykonano testem dwustronnym odpowiadającemu hipotezie „różne od". Większość testów opierała się na założeniach ogólnych modeli liniowych. Wyniki opracowano statystycznie i zinterpretowano graficznie przy użyciu programu XLSTAT (XLSTAT, Addinsoft, UK), Statistica v 13.3 (StatSoft, 2013), a także SigmaPlot v 12 (SigmaPlot, San Diego, CA, USA).

5.6.3.1. Analizy wyników opisujących parametry kiszonek

W pierwszej kolejności rodzaje obserwowanych zmiennych podzielono tematycznie według zadań badawczych i oszacowano globalny wpływ czynnika/czynników i interakcji na poszczególne grupy obserwacji. W tym celu wykonano wielowymiarową analizę wariancji (MANOVA). Dla analizy MANOVA wykonano test Wilks'a, Hotelling-Lawley'a, Pillai'a i Roy'a.

Wyniki opisujące kiszonki w zależności od rodzaju i udziału zastosowania rośliny/dodatku do zakiszania lucerny wykonano za pomocą niezbalansowanej jednoczynnikowej (zadanie I) lub dwuczynnikowej (zadanie II i III) analizy wariancji z uwzględnieniem interakcji i dopasowania najlepszego modelu. Założenia analizy wieloczynnikowej ANOVA były następujące (https://www.xlstat.com/en/solutions/features/anova-analysis-of-variance):

$$y_i = \beta_0 + \sum_{j=1\ldots p} \beta_{k_{(i,j)},j} + \varepsilon_i$$

gdzie:

y_i – obserwowana wartość zmiennej zależnej dla obserwacji i,

β_0 – wartość średnia,

$k_{(i,j)}$ – indeks kategorii (lub poziomu) czynnika j dla obserwacji i,

ε_i – błąd modelu.

W niniejszej pracy jako współczynnik dopasowania modelu (wielkości wytłumaczenia wariancji) posłużył współczynnik determinacji (R^2). Współczynnik ten użyto jako miarę „głębokości efektu" wywieranego przez dany czynnik i przyjęto ogólne założenie „silnego efektu", gdy R^2 był większy od 0,5. W celu ułatwienia interpretacji uzyskanych wyników wprowadzono dodatkowo przedziały: 0 – 0,2 – słaby efekt, 0,2 – 0,5 – średni efekt, 0,5 – 0,8 – silny efekt, 0,8 – 1,0 – całkowity wpływ danego czynnika na uzyskane wyniki. W następnym kroku wykonano analizy post-hoc dla porównań

wielokrotnych przy użyciu testu Tukey`a oraz porównań parami dla testu Dunnet`a. Ocenę interakcji pomiędzy czynnikami przeprowadzono na podstawie wielkości R^2 oraz wizualnie na podstawie wykresów wygenerowanych dla czynników przy konkretnych obserwacjach. Linie charakteryzujące się równoległym ułożeniem względem siebie wskazywały na brak interakcji pomiędzy czynnikami.

Analizę regresji liniowej dla poszczególnych obserwacji przeprowadzono za pomocą założenia (https://www.xlstat.com/en/solutions/features/linear-regression):

$$y_i = a_1 x_{1i} + a_{2x_{2i}} + \ldots + a_p\, x_{pi} + \ e_i$$

gdzie:

y_i– wartość obserwowana dla zmiennej zależnej dla obserwacji i,

x_{pi} – wartość przyjmowana przez zmienną p dla obserwacji i,

e_i - błąd modelu.

Model podstawowy wyliczono metodą klasyczną, tj. najmniejszych kwadratów, natomiast do korekty modelu posłużono się metodą „Best model" (https://www.xlstat.com/en/solutions/features/linear-regression).

5.6.3.2. Analizy rozkładalności żwaczowej

Przy analizie wyników rozkładalności żwaczowej *in vitro* w każdym zadaniu badawczym posłużono się modelem kinetyki rozkładu SM i BO dla kiszonek doświadczalnych. Założono, że matematyczny model kinetyki rozkładu SM i BO kiszonek, zaproponowany dla wyjaśnienia badanych procesów, opisany został według następującego równania:

$$\frac{dX}{dt} = r \cdot X \cdot (1 - \frac{X}{K})$$

gdzie:

K – stałe w modelu,

X – zmienna stanu,

r – stała wzrostu ($1 \cdot h^{-1}$).

Do wyznaczenia wartości poszukiwanych współczynników r i K w modelu wykorzystano procedurę optymalizacyjną, *knitro_nlp*, zaimplementowaną w pakiecie Knitro v 12.4 (Artelys, Trance). Pakiet ten został wykorzystany w środowisku MATLAB

2021 (MathWorks, USA). Wykorzystano binarną postać modelu utworzoną z wykorzystaniem narzędzia IQM ToolPro (IntiQuan GmbH, Szwajcaria).
Funkcja celu (J_C) była następującej postaci:

$$J_C\ (wsp.modelu) = \sum_{i=1}^{n} (\frac{X_{mes} - X_{mod}}{X_{mes}})^2$$

Wartości poszukiwanych współczynników zostały wyznaczone jako rozwiązanie problemu optymalizacyjnego:

$$\min_{wsp.modelu} J_C\ (wsp.modelu).$$

Dla każdego z zadań badawczych analizowano rozkładalność żwaczową, a także kinetykę rozkładu SM i BO według przyjętego modelu. Parametry modelu kinetyki rozkłady wybranych składników pokarmowych zielonek i kiszonek doświadczalnych (SM, BO) w poszczególnych zadaniach badawczych (I, II, III) zostały przedstawione w odpowiednio w Tabeli 6, 14 i 22.

5.6.3.3. Analizy mikrobiomu bakteryjnego kiszonek

Analizę struktury mikrobiomu bakteryjnego kiszonek doświadczalnych wykonano metodą sekwencjonowania nanoporowego. Przeanalizowano liczbę i skład bakterii na poziomie rodzaju, występujących w sporządzonych kiszonkach. Analizowano różnice taksonomiczne między mikrobiomami za pomocą analizy statystycznej profili metagenomicznych (STAMP v 2.1.3) (Parks, Beiko, 2010).

W pracy przedstawiono wyniki dla rodzajów bakterii na poziomie większym niż 1%. W przeprowadzonej analizie, klasy dominacji zostały określone zgodnie z Czachorowski (2006), gdzie: eudominanci – stanowią liczebność powyżej 10%, dominanci – 5,01 – 10%, subdominanci – 2,01 – 5%, recedenci – 1 – 2%, subrecendenci – poniżej 1%.

Wykonano aglomeracyjne grupowanie hierarchiczne (AHC) dla wyników w zadaniu II i III, w celu przeprowadzenia którego wygenerowano macierz odmienności za pomocą metody Bray-Curtisa, natomiast do konstrukcji dendrogramu odmienności użyto metody Warda.

6. Wyniki

6.1. Zadanie badawcze I

6.1.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek

Zielonki charakteryzowały się zbliżonym składem chemicznym (Tabela 2), a odnotowane różnice nie były istotne statystycznie (P>0,05), poza zawartością NDF (P≤0,01). Pomimo rozbieżności gatunkowych obie zielonki uzyskały podobny stopień przewiędnięcia. Dysproporcja w koncentracji BO między zielonkami wynosiła jedynie 6,08 g·kg^{-1} SM. Różnica w ilości frakcji NDF przełożyła się na wartości wskaźnika L/NDF i była spowodowana odmienną zawartością hemicelulozy w obu roślinach (96,20 g i 10,30 g·kg^{-1} SM dla zielonki z lucerny oraz komonicy zwyczajnej, odpowiednio). W przeprowadzonej analizie statystycznej nie wykazano istotnych różnicy we wskaźnikach określających przydatność zielonek do zakiszania (P>0,05), lecz warto zwrócić uwagę, iż stosunek WSC/BC był wyższy dla zielonki z lucerny (Tabela 2).

Tabela 2. Skład chemiczny i przydatność do zakiszania zielonki z lucerny i komonicy zwyczajnej

Wyszczególnienie	Zielonki		SEM	P
	Lucerna	Komonica zwyczajna		
Sucha masa, g·kg^{-1} świeżej masy	313,6	315,9	0,639	ns
Skład chemiczny, g·kg^{-1} SM				
Popiół surowy	84,24	79,32	1,137	ns
Białko ogólne	207,0	213,1	1,546	ns
Tłuszcz surowy	11,69	20,11	1,904	ns
Włókno surowe	307,0	239,8	15,03	ns
NDF	428,1 ^{a}	298,0 ^{b}	29,09	**
ADF	331,9	287,7	9,883	ns
ADL	58,08	66,22	1,822	ns
L/NDF	0,140	0,220	0,019	ns
Taniny, g·kg^{-1} SM	nd	21,59	nd	nd
Przydatność do zakiszania				
WSC, g·kg^{-1} SM	71,34	59,69	2,612	ns
BC, g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM	58,60	60,46	0,421	ns
WSC/BC	1,220	0,990	0,052	ns
FC	41,09	39,49	0,362	ns

SM – sucha masa; NDF – włókno neutralno-detergentowe; ADF – włókno kwaśno-detergentowe; ADL – lignina kwaśno-detergentowa; L/NDF – stosunek ligniny do NDF; WSC – węglowodany rozpuszczalne w wodzie; BC – pojemność buforowa; WSC/BC – stosunek węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie do pojemności buforowej; FC – współczynnik fermentacji wg Weissbach, Auerbach (2013); SEM – błąd standardowy średniej; nd – nie dotyczy; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych (P > 0,05); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – b) nie różnią się istotnie na poziomie P ≤ 0,05; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.

Skład chemiczny i wybrane parametry fermentacji sporządzonych kiszonek lucerny z różnym udziałem komonicy zwyczajnej przedstawiono w Tabeli 3. Podstawowy skład chemiczny wszystkich kiszonek był wyrównany (P>0,05). W odniesieniu do zielonek (Tabela 2), w kiszonkach stwierdzono jedynie wyższą zawartość TS. Warianty doświadczalne różniły się statystycznie składem frakcji węglowodanów. Wraz ze wzrostem udziału komonicy zwyczajnej w przygotowanych kiszonkach malała zawartość frakcji NDF (P≤0,05) i WSC (P≤0,01) (Tabela 3). W kwestii frakcji ADF i ADL, najniższe wartości uzyskał wariant z 20% udziałem komonicy zwyczajnej (P≤0,05). Zawartość ADF była najwyższa w grupie kontrolnej, a ilość ADL w grupie z 50% udziałem komonicy zwyczajnej. Pomimo istotnych różnic w składzie węglowodanów strukturalnych, wskaźnik L/NDF był zbliżony dla wszystkich wariantów sporządzonych kiszonek doświadczalnych (P>0,05).

Nie stwierdzono różnic w koncentracji kwasu mlekowego i kwasu masłowego w sporządzonych kiszonkach (P>0,05) (Tabela 3). W przeprowadzonym badaniu odnotowano jednak istotne różnice w kwasowości kiszonek (pH) (P≤0,01), pomimo małych różnic liczbowych (od 4,74 do 4,82). Wraz ze wzrostem udziału komonicy zwyczajnej w kiszonkach wzrastała zawartość kwasu octowego (P≤0,001). Kiszonka lucerny z 50% udziałem komonicy zwyczajnej uzyskała najwyższą zawartość tego kwasu, jak i sumę LKT, w stosunku do pozostałych kiszonek były to różnice potwierdzone statystycznie (P≤0,001).

Pośród analizowanych produktów fermentacji odnotowano także obecność etanolu (P≤0,001) (Tabela 3). Najwyższą koncentrację stwierdzono w grupie kontrolnej oraz w kiszonce lucerny z 10% udziałem komonicy zwyczajnej, a jego zawartość malała wraz z dalszym wzrostem ilości komonicy zwyczajnej w kiszonkach. Udział $N\text{-}NH_3$ okazał się zmienny (P≤0.001) wśród wariantów doświadczalnych kiszonek. Grupy kiszonek z lucerny z 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej miały znacznie wyższy poziom $N\text{-}NH_3$ w stosunku do pozostałych grup.

Tabela 3. Skład chemiczny i wybrane parametry fermentacji kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej

Wyszczególnienie	Kiszonki						SEM	P	R^2
	G0	G1	G2	G3	G4	G5			
Sucha masa, g·kg^{-1} świeżej masy	321,4	320,7	321,7	324,1	326,1	327,9	0,871	ns	0,544
Skład chemiczny, g·kg^{-1} SM									
Popiół surowy	87,15	85,06	86,03	89,93	88,91	90,44	0,901	ns	0,286
Białko ogólne	196,2	189,8	202,6	194,5	196,1	197,6	1,951	ns	0,221
Tłuszcz surowy	19,79	18,51	19,29	20,19	22,96	21,88	0,561	ns	0,436
Włókno surowe	295,4	274,5	263,2	278,9	284,7	285,2	4,267	ns	0,324
NDF	465,0 ^{a}	422,0 ^{ab}	404,1 ^{b}	401,8 ^{b}	397,3 ^{b}	392,5 ^{b}	7,383	*	0,657
ADF	366,7 ^{a}	350,2 ^{ab}	325,4 ^{b}	338,9 ^{ab}	340,2 ^{ab}	337,5 ^{ab}	4,087	*	0,573
ADL	60,78 ^{ab}	60,70 ^{ab}	56,87 ^{b}	61,37 ^{ab}	61,15 ^{ab}	64,43 ^{a}	0,793	*	0,555
L/NDF	0,130	0,140	0,140	0,150	0,150	0,160	0,003	ns	0,799
WSC	17,18 ^{a}	15,01 ^{ab}	15,66 ^{ab}	14,19 ^{abc}	11,87 ^{bc}	10,51 ^{c}	0,634	**	0,749
Produkty fermentacji, g·kg^{-1} SM									
pH	4,81 ^{a}	4,79 ^{ab}	4,74 ^{b}	4,83 ^{a}	4,79 ^{ab}	4,82 ^{a}	0,008	**	0,724
N-NH_3, g·kg^{-1} $N_{ogólny}$	44,11 ^{c}	43,85 ^{c}	42,62 ^{c}	44,68 ^{bc}	57,73 ^{b}	74,52 ^{a}	2,969	***	0,898
Kwas mlekowy	53,81	46,27	32,87	26,65	43,30	43,41	3,058	ns	0,498
Kwas octowy	2,798 ^{c}	3,288 ^{bc}	3,023 ^{bc}	2,566 ^{c}	4,307 ^{b}	5,812 ^{a}	0,292	***	0,866
Kwas propionowy	0,139 ^{b}	0,119 ^{b}	0,101 ^{b}	0,115 ^{b}	0,146 ^{b}	0,279 ^{a}	0,016	***	0,865
Kwas masłowy	0,006	0,004	0,005	0,010	0,006	0,004	0,001	ns	0,205
LKT	2,980 ^{c}	3,445 ^{bc}	3,163 ^{bc}	2,732 ^{c}	4,540 ^{b}	6,186 ^{a}	0,310	***	0,875
Kwas mlekowy : kwas octowy	20,20 ^{a}	14,38 ^{ab}	10,88 ^{ab}	10,40 ^{ab}	10,02 ^{ab}	7,519 ^{b}	1,316	*	0,569
Etanol	8,490 ^{a}	11,01 ^{a}	6,220 ^{a}	1,110 ^{b}	0,000 ^{c}	0,000 ^{c}	1,343	***	0,694

Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%; SM – sucha masa; NDF – włókno neutralno-detergentowe; ADF – włókno kwaśno-detergentowe; ADL – lignina kwaśno-detergentowa; L/NDF – stosunek ligniny do NDF; WSC – węglowodany rozpuszczalne w wodzie; $N_{ogólny}$ – azot ogólny; N-NH_3 – azot amoniakalny, g·kg^{-1} $N_{ogólny}$; LKT – suma lotnych kwasów tłuszczowych tj. kwasu octowego, propionowego, izomasłowego, masłowego, izowalerianowego, walerianowego; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych (P > 0,05); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – c) nie różnią się istotnie na poziomie P ≤ 0,05; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.

6.1.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek

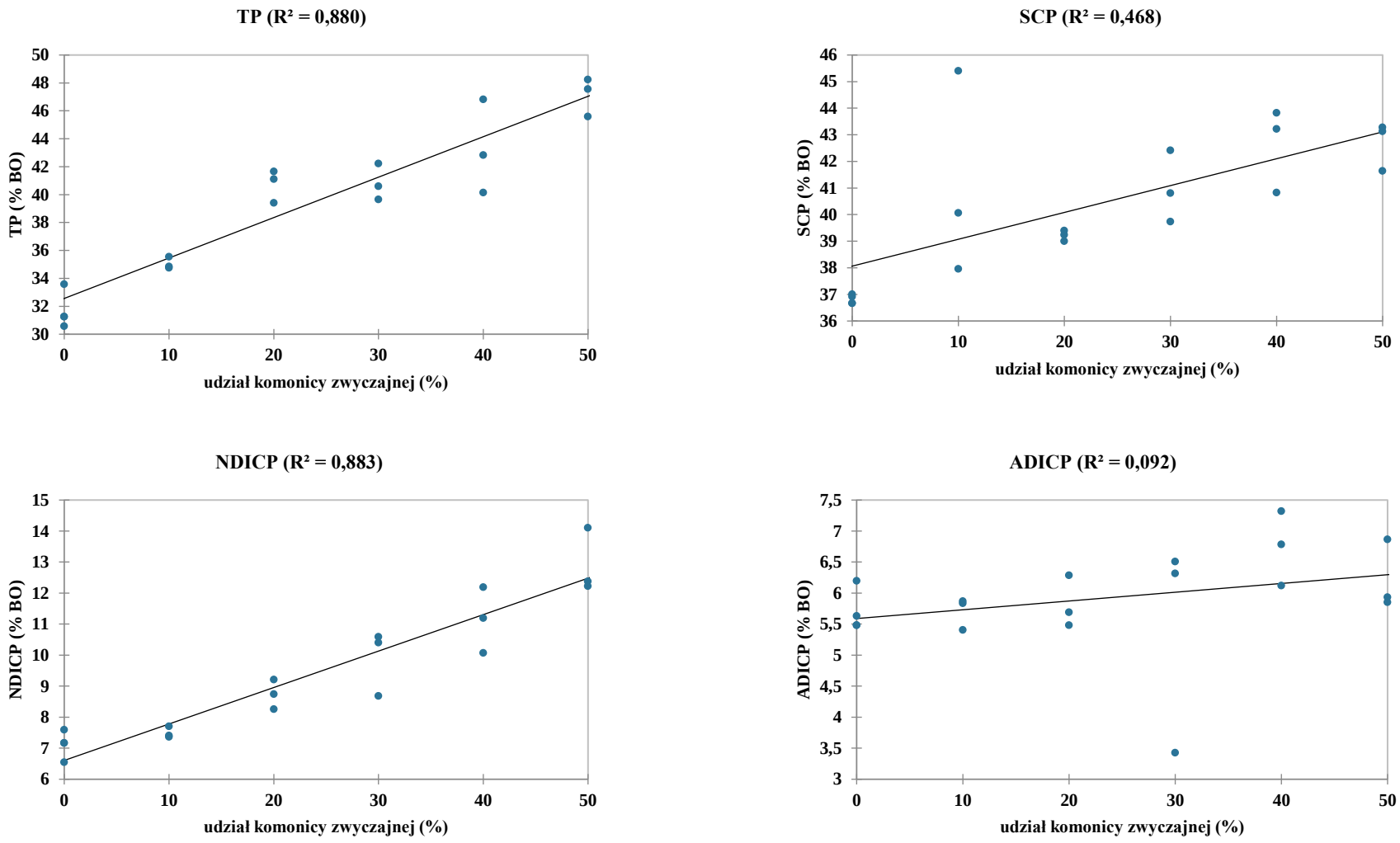
Skład frakcji białkowych kiszonek doświadczalnych, w odniesieniu do zielonek przedstawiono w Tabeli 4. Obie zielonki uzyskały zbliżony skład BO. Jednak należy nadmienić, że zielonka z komonicy zwyczajnej wyróżniała się wyższą zawartością TP w porównaniu do zielonki z lucerny o 11,36 punktów % (pkt. %). Analiza statystyczna potwierdziła różnice między koncentracją frakcji TP i NDICP ($P \leq 0,001$), a także w zawartości SCP ($P \leq 0,05$) w składzie BO kiszonek. Jedynie udział ADICP nie różnił się istotnie ($P > 0,05$). W grupach doświadczalnych z 20% udziałem komonicy zwyczajnej i powyżej (tj. 30%, 40% i 50%) stwierdzono wpływ czynnika doświadczalnego na ograniczenie degradacji TP do form prostszych, co potwierdzono statystycznie ($P \leq 0,001$). Udział 10% komonicy zwyczajnej w kiszonce z lucerny nieznacznie wpłynął na zawartość tej frakcji względem grupy kontrolnej, gdyż nie wykazano między tymi grupami różnic statystycznych. W grupie z 50% udziałem komonicy zwyczajnej ilość TP była aż o 15,32 pkt. % wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. Wraz ze wzrostem udziału komonicy zwyczajnej w przygotowanych kiszonkach doświadczalnych stwierdzono wzrost ilości frakcji SCP i wzrost udziału NDICP.

W oparciu o przeprowadzoną regresję liniową analizy kowariancji dla oznaczonych frakcji BO kiszonek (Wykres 1) stwierdzono, że położenie punktów na wykresach wskazuje na występowanie wyraźnego powiązania pomiędzy udziałem komonicy zwyczajnej, a zawartością frakcji TP i NDICP. Ponadto otrzymane wartości współczynnika determinacji ($R^2 = 0,880$ i 0,883, odpowiednio) pozwoliły stwierdzić, że zwiększenie udziału komonicy zwyczajnej powodowało liniowy wzrost udziału wyżej wymienionych frakcji BO badanych kiszonek. Wykresy sporządzone dla frakcji TP i NDICP potwierdziły dobre dopasowanie linii regresji, oznaczonej linią ciągłą do rzeczywiście uzyskanych wyników. Pomimo istotnych różnic w zawartości SCP ($P \leq 0,05$), wynikających z udziału komonicy zwyczajnej, wpływ czynnika był zauważalny w niższym stopniu, co też potwierdził współczynnik R^2 (0,468). Czynnik doświadczalny wywierał średni wpływ na uzyskane wyniki dla ilości SCP. Frakcja ADICP nie była powiązana z udziałem komonicy zwyczajnej, a linia ciągła odznaczała się niskim dopasowaniem do rzeczywiście uzyskanych wartości ($R^2 = 0,092$), co świadczyło o słabym efekcie wpływu czynnika doświadczalnego, udziału komonicy zwyczajnej.

Tabela 4. Frakcje białkowe zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej (% białka ogólnego)

Wyszczególnienie	Frakcje białkowe, % białka ogólnego			
	Białko właściwe	Białko rozpuszczalne w buforze	Białko nierozpuszczalne w neutralnym detergencie	Białko nierozpuszczalne w kwaśnym detergencie
Zielonki				
Lucerna	55,92	10,09	4,21	1,76
Komonica zwyczajna	67,28	8,32	4,58	2,65
Kiszonki				
G0	31,81 ^{c}	36,86 ^{b}	7,10 ^{d}	5,70
G1	35,05 ^{c}	41,14 ^{ab}	7,49 ^{d}	5,70
G2	40,73 ^{b}	39,21 ^{ab}	8,73 ^{cd}	5,82
G3	40,83 ^{b}	40,99 ^{ab}	9,89 ^{bc}	5,42
G4	43,26 ^{ab}	42,62 ^{a}	11,15 ^{ab}	6,74
G5	47,13 ^{a}	42,68 ^{a}	12,90 ^{a}	6,22
SEM	2,265	2,871	0,604	0,370
P	***	*	***	ns

Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%; TP – białko właściwe; SCP – białko rozpuszczalne w buforze; NDICP – białko nierozpuszczalne w neutralnym detergencie; ADICP – białko nierozpuszczalne w kwaśnym detergencie; SEM – błąd standardowy średniej; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – d) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$.



Wykres 1. Regresja liniowa analizy kowariancji dla frakcji białkowych kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej

Na podstawie oznaczonych frakcji białkowych przeprowadzono ocenę BO według systemu CNCPS v 6.5 (Tabela 5). Wykonana analiza statystyczna potwierdziła istotne różnice w udziale frakcji PA1 ($P \leq 0{,}001$), co było zbieżne z wynikami zawartymi w Tabeli 4, dotyczącymi koncentracji $N\text{-}NH_3$ w kiszonkach. Najwyższym udziałem tejże frakcji charakteryzowała się grupa z 50% udziałem komonicy zwyczajnej. Najwyższy udział frakcji PA2 stwierdzono w BO grupy kontrolnej, a także w kiszonce z lucerny z 10% oraz 20% udziałem komonicy zwyczajnej. Pozostałe warianty doświadczalne, tj. z 30%, 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej uzyskały istotnie niższą zawartość tejże frakcji ($P \leq 0{,}001$) względem grupy kontrolnej, przy jednocześnie wyższych ilościach BO należącego do frakcji PB2. Dla frakcji PB1 statystycznie wykazano różnice tylko pomiędzy grupą kontrolną, a kiszonką z lucerny z 40% udziałem komonicy zwyczajnej ($P \leq 0{,}05$). Kiszonka z 50% udziałem komonicy zwyczajnej uzyskała o 11,61 pkt. % mniej rozpuszczalnej frakcji PA2, a także o 5,28 pkt. % więcej frakcji PB2 względem grupy kontrolnej. Porównując skład BO kiszonek w przeprowadzonej ocenie nie wykazano istotnych dysproporcji w udziale frakcji PC, która była związana z zawartością ADICP. Zróżnicowanie w ilości frakcji PC kiszonek wynosiło poniżej 1,50 pkt. %, a względem zielonek było to do 5,00 pkt. %.

Silny wpływ udziału komonicy zwyczajnej w sporządzonych kiszonkach na skład BO odnotowano dla frakcji PA1 ($R^2 = 0{,}898$), PB1 ($R^2 = 0{,}794$) i PB2 ($R^2 = 0{,}702$) (Tabela 5). Uzyskane wyniki były ważne, przede wszystkim ze względu na jeden z istotniejszych wskaźników zakresu proteolizy, czyli zawartość frakcji PA2, która częściowo w swoim składzie zawierała powstałe w wyniku degradacji TP prostsze związki azotowe niebiałkowe (NPN), a dla której wartość R^2 (0,328) wskazywała na niski stopień wpływu czynnika doświadczalnego. Natomiast względem frakcji PC wykazano bardzo niski stopień powiązania uzyskanych wyników rzeczywistych z wpływem udziału komonicy zwyczajnej ($R^2 = 0{,}094$).

Tabela 5. Frakcje białkowe zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej (% białka ogólnego) według CNCPS v 6.5

Wyszczególnienie	Frakcje białkowe, % białka ogólnego				
	Frakcja PA1	Frakcja PA2	Frakcja PB1	Frakcja PB2	Frakcja PC
Zielonki					
Lucerna	0,34	30,05	65,40	2,45	1,76
Komonica zwyczajna	0,33	28,29	66,80	1,93	2,65
Kiszonki					
G0	4,41 ^{c}	56,03 ^{a}	32,46 ^{b}	1,40 ^{b}	5,70
G1	4,39 ^{c}	51,37 ^{abc}	36,75 ^{ab}	1,79 ^{b}	5,70
G2	4,26 ^{c}	52,05 ^{ab}	34,96 ^{ab}	2,91 ^{b}	5,82
G3	4,47 ^{bc}	49,12 ^{bcd}	36,52 ^{ab}	4,47 ^{ab}	5,42
G4	5,77 ^{b}	46,23 ^{cd}	36,85 ^{a}	4,41 ^{ab}	6,74
G5	7,45 ^{a}	44,42 ^{d}	35,23 ^{ab}	6,68 ^{a}	6,22
SEM	2,969	3,385	2,678	0,402	0,370
P	***	***	*	**	ns
R^2	0,898	0,328	0,794	0,702	0,092

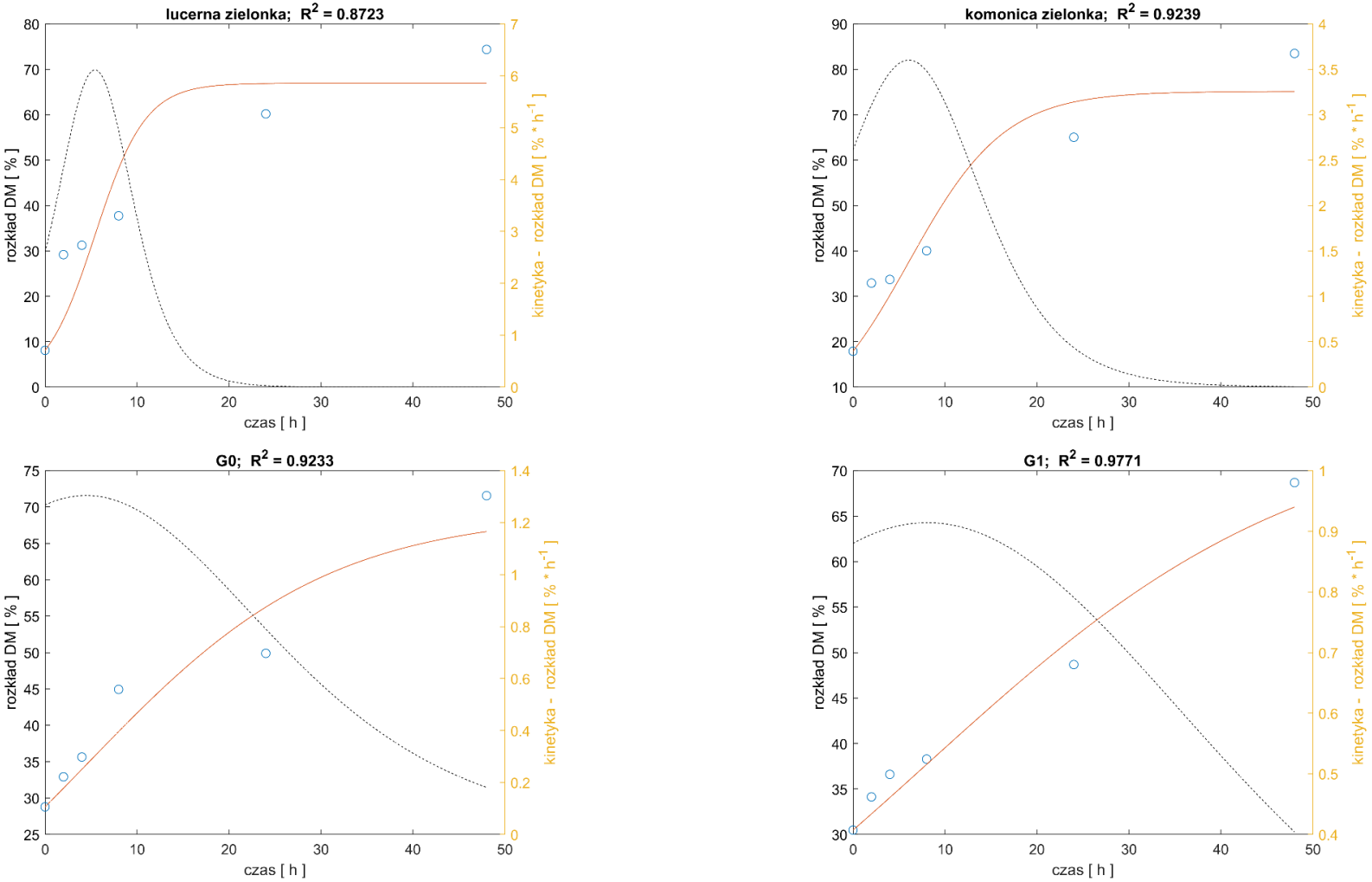
Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%; PA1 – azot amoniakalny; PA2 – białko rozpuszczalne w buforze; PB1 – białko nierozpuszczalne w buforze; PB2 – białko związane z włóknem; PC – białko niestrawne; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – d) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001

6.1.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek

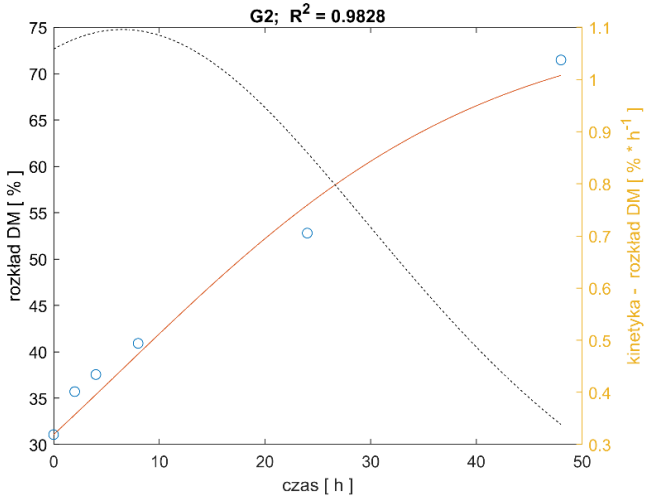
Zielonka z komonicy zwyczajnej charakteryzowała się wyższą degradacją SM, której rozkład był wolniejszy w czasie niż w przypadku lucerny, na co wskazywała linia kinetyki rozkładu (Wykres 2). Na podstawie wyznaczonego modelu zaobserwowano wzrastającą rozkładalność SM wraz ze wzrostem udziału komonicy zwyczajnej, lecz sporządzone kiszonki generalnie uzyskały średnio niższe wartości dla rozkład SM do 48 h inkubacji włącznie względem zielonek. Wariant kiszonki lucerny z 50% udziałem komonicy zwyczajnej wyróżniał się najszybszym i najwyższym rozkładem SM. Między 4 h, a 8 h inkubacji prób zanotowano najwyższy rozkład SM w grupie kontrolnej. Udział powyżej 30% komonicy zwyczajnej zwiększył rozkładalność SM pomiędzy 8 h, a 24 h inkubacji. W pozostałych wariantach najwyższy rozkład SM stwierdzono między 24 h, a 48 h inkubacji prób (powyżej 18,00 pkt. %). Uzyskana, wysoka wartość współczynnika R^2, wskazywała na dobre dopasowanie przyjętego modelu statystycznego.

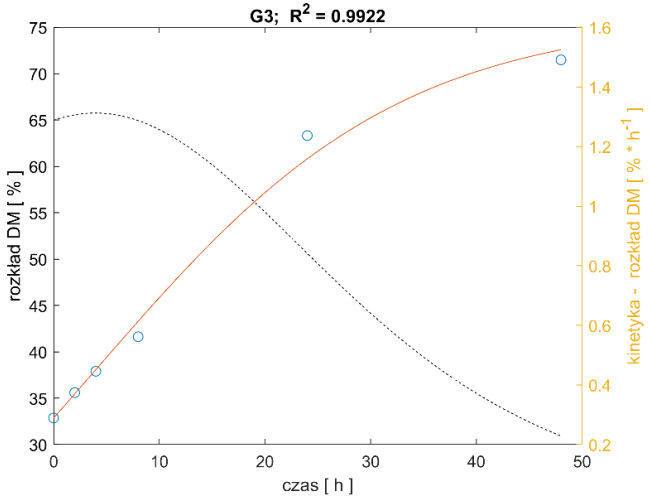
Kinetyka rozkładu BO dla obu zielonek była zbliżona (Wykres 3). Stwierdzono znaczne rozbieżności w ilości BO rozłożonego po 48 h, z korzystniejszym wynikiem dla zielonki z komonicy zwyczajnej. Zielonka ta uzyskała o 24,84 pkt. % niższą ilość BO rozłożonego dla wskazanego czasu. Miarą tempa zachodzących zmian w rozkładalności BO była wartość stałej wzrostu (r) w modelu (Tabela 6), która charakteryzowała się najwyższymi wartościami dla lucerny zakiszonej z 30% i 40% udziałem komonicy zwyczajnej. Wyższe wartości liczbowe świadczyły o wyższej intensywności zmian w rozkładalności BO.

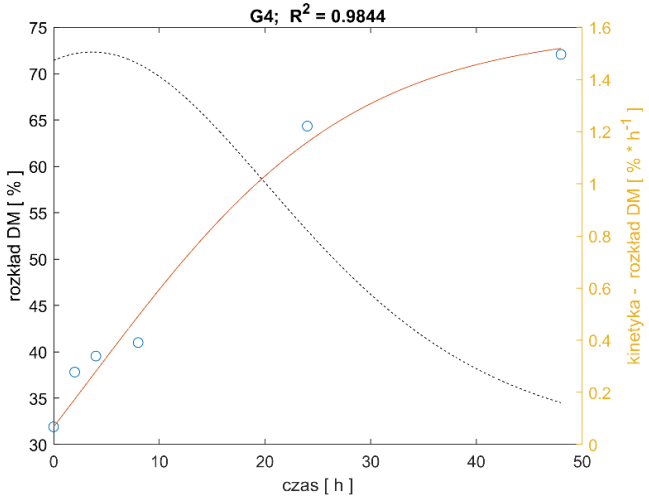
Dynamika degradacji BO dla grupy z 50% udziałem komonicy zwyczajnej na początku przyjęła tempo zbliżone do pozostałych wariantów, które znacznie obniżyło się już po 2 h inkubacji. Najmniej BO zostało rozłożone pomiędzy 24 h, a 48 h w omawianej grupie. Współczynnik R^2 przybierał wysokie i bardzo wysokie wartości dla wszystkich kiszonek, łącznie z zielonkami (Tabela 6). Dla rozkładalności żwaczowej *in vitro* BO najwyższe wartości R^2 odnotowano w zielonce z komonicy zwyczajnej i kiszonce z 50% udziałem komonicy zwyczajnej, gdzie czynnik doświadczalny wpływał na wyniki w najwyższym stopniu. Na podstawie przeprowadzonej analizy i przyjętego modelu stwierdzono, że wraz ze wzrastającym udziałem komonicy zwyczajnej zmniejszała się rozkładalność BO i wzrastało tempo rozkładu SM, zgodnie z wartościami stałej wzrostu (r) (Tabela 6). Rozkładalność żwaczowa BO zarówno zielonek, jak i kiszonek kształtowała się odmiennie w stosunku do rozkładalności SM (Wykres 2 i 3).

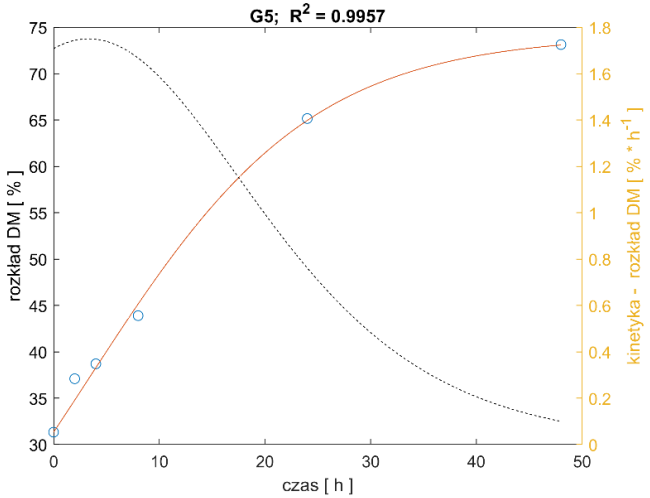


Wykres 2. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej
Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; DM – sucha masa; R^2 – współczynnik determinacji.

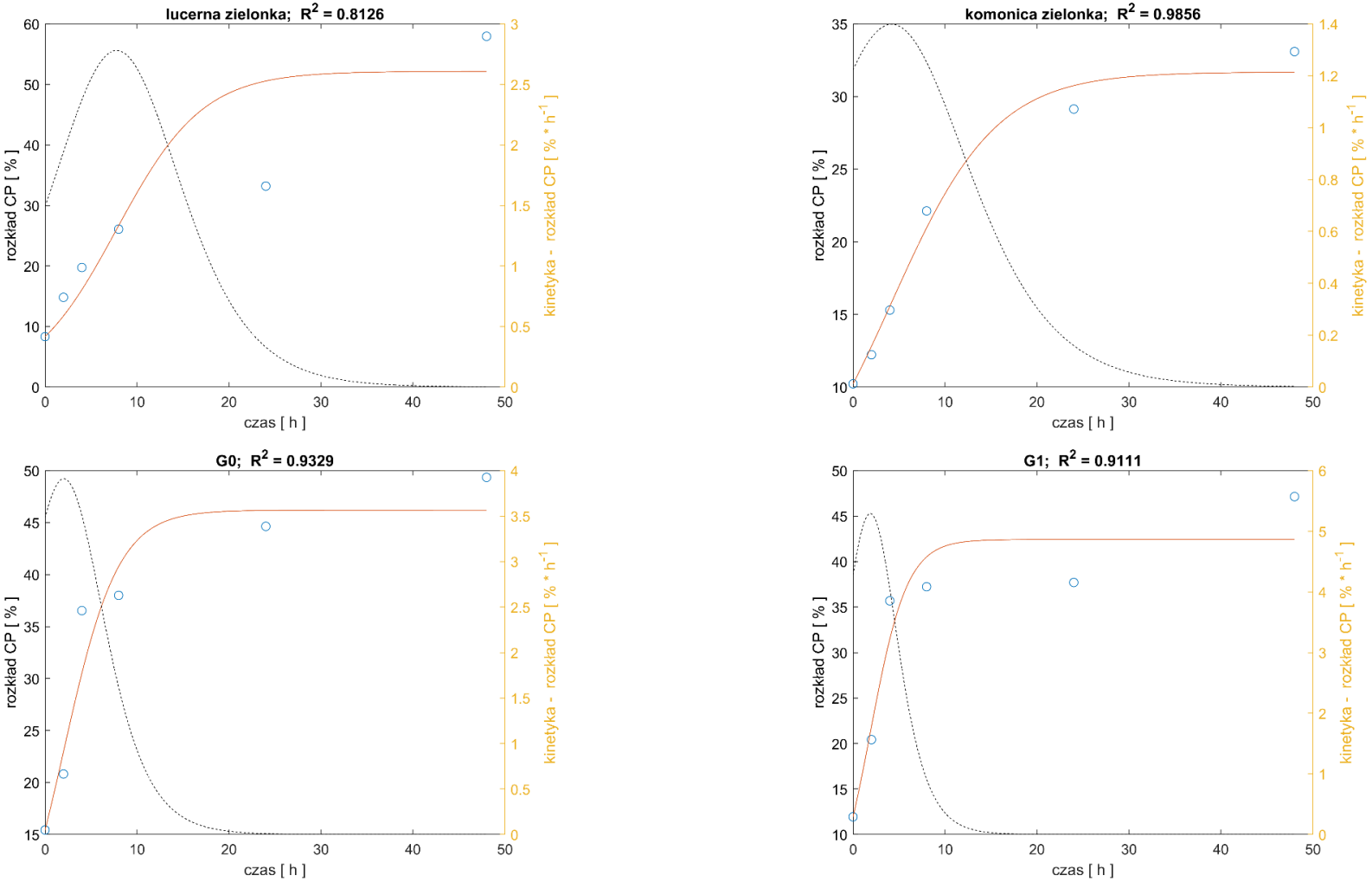




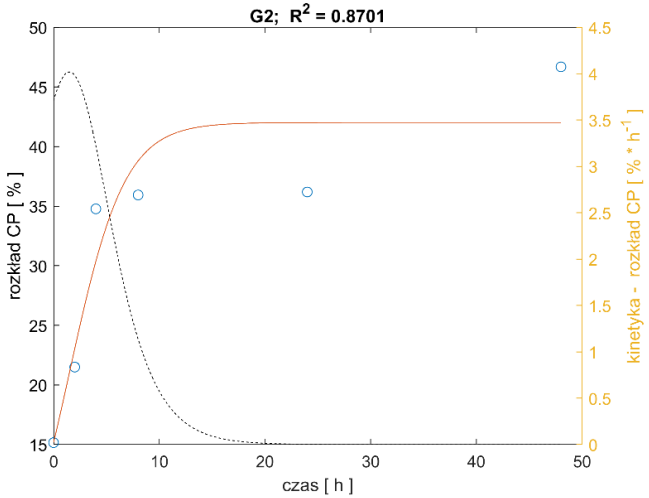


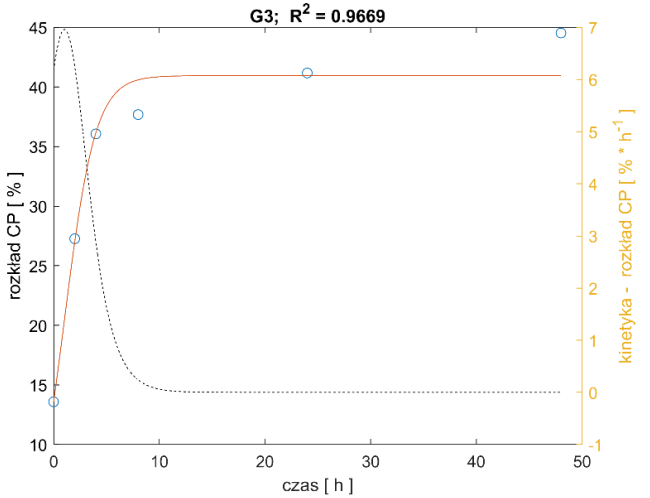


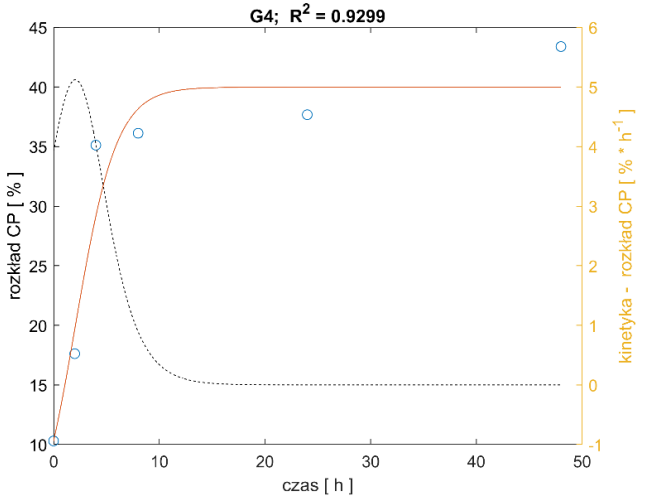
Wykres 2 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej
Kiszonki: G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%; DM – sucha masa; R^2 – współczynnik determinacji.

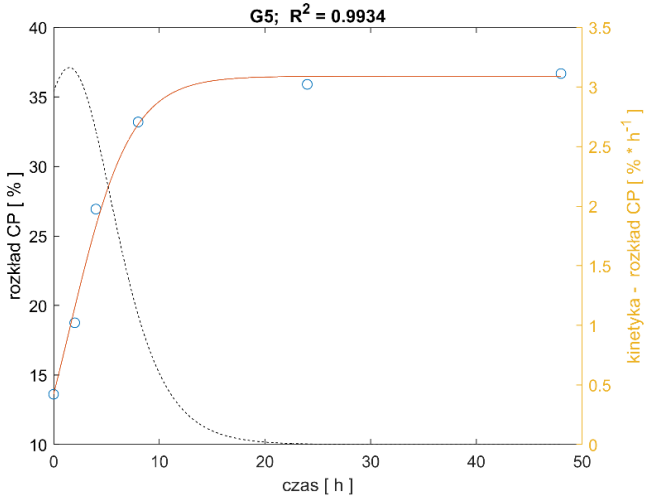


Wykres 3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej
Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; CP – białko ogólne; R^2 – współczynnik determinacji.









Wykres 3 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej
Kiszonki: G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%; CP – białko ogólne; R^2 – współczynnik determinacji.

Tabela 6. Parametry modelu kinetyki rozkładu *in vitro* suchej masy i białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej

Wyszczególnienie	Sucha masa		Białko ogólne	
	r	K	r	K
Zielonki				
Lucerna	0,365	66,93	0,213	52,15
Komonica zwyczajna	0,192	75,12	0,177	31,68
Kiszonki				
G0	0,076	69,10	0,339	46,19
G1	0,048	75,54	0,499	42,42
G2	0,058	76,25	0,383	42,02
G3	0,069	76,06	0,679	40,95
G4	0,081	74,78	0,512	39,99
G5	0,094	74,17	0,347	36,49

Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucern 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%; r – stała wzrostu ($1 \cdot h^{-1}$); K – stałe w modelu.

6.1.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych

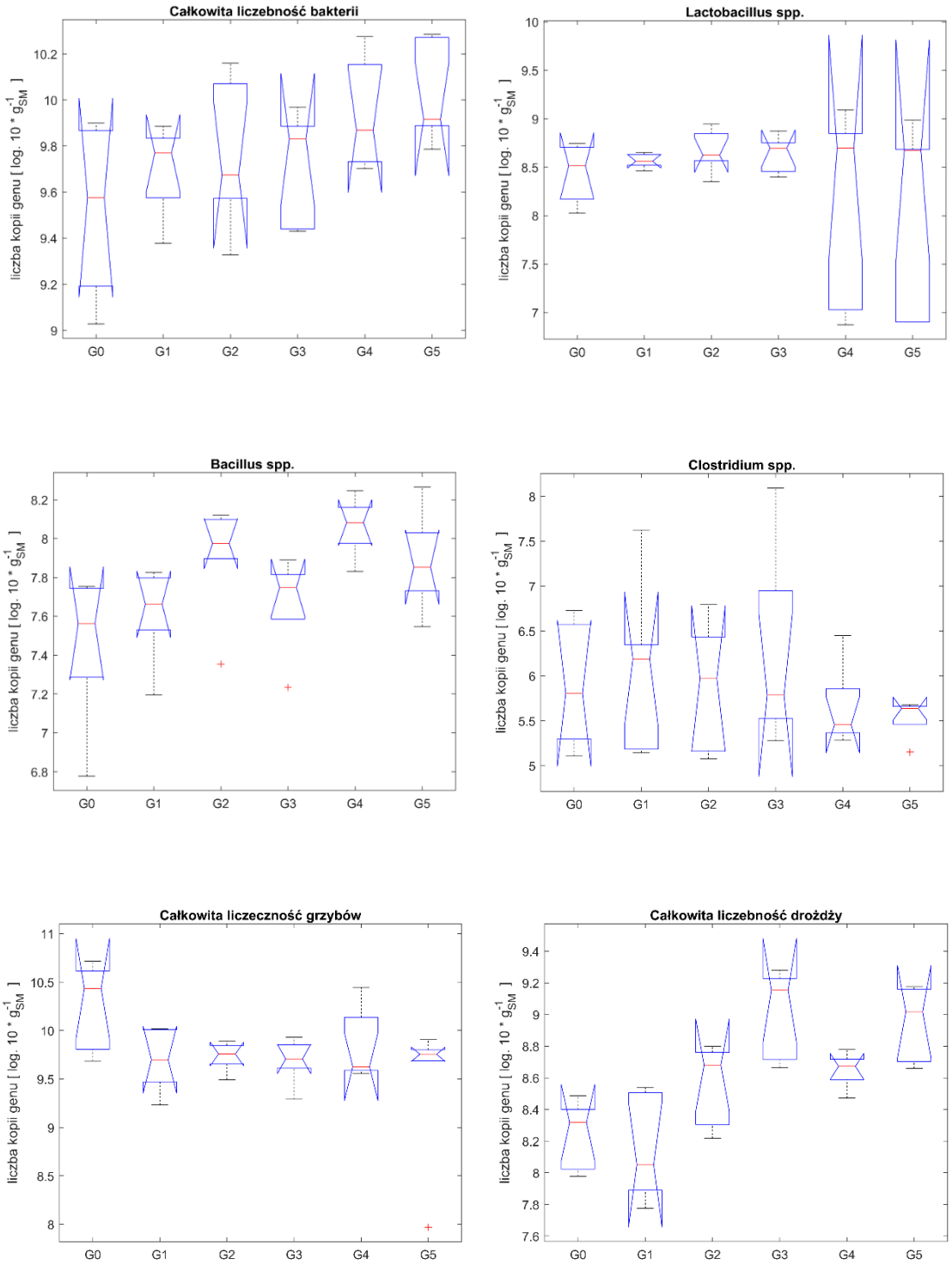
Liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki przedstawiono w Tabeli 7. Całkowity ładunek bakterii we wszystkich grupach był zbliżony (P>0,05), pomimo braku istotnych różnic można było zaobserwować wzrost ogólnej liczby bakterii wraz ze wzrostem udziału komonicy zwyczajnej. Nie stwierdzono wpływu czynnika doświadczalnego na liczebność *Lactobacillus* spp., ani *Clostridium* spp. (Wykres 4) (P>0,05). Najwyższy ładunek *Clostridium* spp. stwierdzono w grupie z 10% udziałem komonicy zwyczajnej, a najniższy w kiszonce z 50% udziałem komonicy zwyczajnej, różnice nie były jednak istotne między tymi grupami (P>0,05). Liczebność *Bacillus* spp. była statystycznie różna tylko pomiędzy grupą kontrolną, a grupą z 40% udziałem komonicy zwyczajnej (P≤0,05), właśnie w tej grupie odnotowano najwyższe wartości liczbowe dla tego rodzaju bakterii (Wykres 4). W całkowitej liczebności grzybów zaobserwowano obniżenie wraz ze wzrostem udziału komonicy zwyczajnej, poza grupą z 40% udziałem komonicy zwyczajnej. Jednak obserwacje te nie zostały uzasadnione statystycznie (P>0,05). Całkowita liczebność drożdży była najwyższa w grupie z 30% udziałem komonicy zwyczajnej i różniła się istotnie z grupą kontrolną oraz kiszonką z 10% udziałem komonicy zwyczajnej (P≤0,01). Całkowita liczebność grzybów w kiszonkach była wyższa od liczebności drożdży (Tabela 7). Najniższym ładunkiem w kiszonkach doświadczalnych odznaczały się bakterie *Clostridium* spp.

Struktura mikrobiomu bakteryjnego wszystkich kiszonek doświadczalnych składała się głównie z bakterii rodzaju *Weissella*, który dominował wśród obecnej społeczności bakteryjnej (Tabela 8). *Weissella* spp. stanowił powyżej 10% ogółu struktury, pełniąc rolę eudominanta, zgodnie z przyjętą metodyką. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w udziale procentowym tego rodzaju bakterii pomiędzy grupą kontrolną oraz kiszonką lucerny z 20% oraz 50% udziałem komonicy zwyczajnej (P≤0,05 i P≤0,001, odpowiednio). Drugim co do procentowego udziału wielkości był rodzaj *Synechococcus* dla grupy kontrolnej, oraz grup z 10% i 20% udziałem komonicy zwyczajnej, natomiast dla grup z 30%, 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej struktura mikrobiomu w drugiej kolejności stanowiona był przez rodzaj *Loigolactobacillus*. Badania wykazały istotne różnice w procentowej wielkości zbiorowisk rodzajów *Loigolactobacillus* (P≤0,001), *Lactiplantibacillus* (P≤0,01) i *Lentilactobacillus* (P≤0,01) dla grupy z najwyższym udziałem komonicy zwyczajnej (50%) w stosunku do grupy kontrolnej.

Tabela 7. Liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny i komonicy zwyczajnej (log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM)

Wyszczególnienie	Kiszonki						SEM	P	R^2
	G0	G1	G2	G3	G4	G5			
Całkowita liczebność bakterii	9,523	9,702	9,747	9,731	8,924	10,01	0,049	ns	0,280
Lactobacillus spp.	8,445	8,564	8,660	8,644	8,206	8,136	0,097	ns	0,371
Bacillus spp.	7,448 ^{b}	7,612 ^{ab}	7,903 ^{ab}	7,670 ^{ab}	8,063 ^{a}	7,880 ^{ab}	0,054	*	0,561
Clostridium spp.	5,888	6,114	5,904	6,238	5,647	5,539	0,120	ns	0,236
Całkowita liczebność grzybów	10,28	9,689	9,734	9,684	9,831	9,427	0,077	ns	0,439
Całkowita liczebność drożdży	8,254 ^{bc}	8,136 ^{c}	8,574 ^{abc}	9,033 ^{a}	8,650 ^{abc}	8,956 ^{ab}	0,067	**	0,701

Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych (P > 0,05); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – c) nie różnią się istotnie na poziomie P ≤ 0,05; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.



Wykres 4. Wykres pudełkowy przedstawiający liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny i komonicy zwyczajnej

Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%.

Tabela 8. Struktura mikrobiomu bakteryjnego zasiedlającego kiszonki z lucerny i komonicy zwyczajnej przedstawiona jako procentowy udział rodzajów w zbiorowości

Wyszczególnienie	Kiszonki					
	G0	G1	G2	G3	G4	G5
Weissella	74,34	67,16	58,04*	79,30	65,46	32,85***
Loigolactobacillus	0,31	1,25	0,59	2,05	4,97	17,65***
Synechococcus	5,00	5,37	7,77	1,92	1,59	1,65
Lactiplantibacillus	0,31	0,62	0,57	0,48	3,22	11,29**
Lentilactobacillus	0,39	1,79	3,18	0,28	1,24	7,86**
Pantoea	0,45	1,63	1,23	0,83	4,74	0,26
Lactobacillus	0,11	1,56	2,79	0,25	2,90	1,15
Pediococcus	1,55	0,62	2,35	0,62	0,87	1,74
Pseudanabaena	1,17	1,48	2,04	0,80	0,32	0,27
Bacillus	0,78	0,54	0,76	0,68	1,04	2,00
Chroococcidiopsis	1,16	1,56	1,63	0,54	0,23	0,49
Levilactobacillus	0,19	0,16	0,51	0,26	0,25	4,20
Latilactobacillus	0,09	0,16	0,14	0,16	0,74	4,07
Brevundimonas	1,03	0,70	1,41	0,33	0,16	0,40
Enterococcus	0,48	0,39	0,58	0,26	0,62	1,46
Ligilactobacillus	0,00	0,16	0,04	0,10	0,05	1,46
Paucilactobacillus	0,03	0,08	0,01	0,12	0,18	1,29
Sphingobium	0,01	1,32	0,03	0,05	0,00	0,00

Wskazane rodzaje <1%; przynajmniej 1 komórka; kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%; różnice statystycznie istotne określono na poziomie $P \leq 0,05$: * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001; różnice statystycznie istotne oznaczono dla grup doświadczalnych (G1, G2, G3, G4, G5) względem grupy kontrolnej (G0); w tabeli naniesiono również kolory klas dominacji rodzajów bakterii zgodnie z przyjętą metodyką.

Ustalono, że najbardziej zróżnicowaną strukturą mikrobiomu wyróżniały się kiszonki lucerny z 20%, 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej pod względem liczby rodzajów bakterii stanowiących główne społeczności. W grupie z 20% udziałem komonicy zwyczajnej dominowały rodzaje *Weissella* i *Synechococcus*, a także mniej licznie zbiorowisko reprezentowali subdominanci rodzajów *Lentilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Pseudanabaena*, których udział wynosił minimum 2,01%. W kiszonce z lucerny z 40% udziałem komonicy zwyczajnej poza dwoma głównymi rodzajami stanowiącymi większość (*Weissella* i *Loigolactobacillus*) licznie stwierdzono obecność rodzajów *Lactiplantibacillus*, *Pantoea* i *Lactobacillus*, jako subdominantów (>2,01%). Jednak największa różnorodność rodzajowa przy jednocześnie wysokiej zawartości procentowej poszczególnych grup została stwierdzona dla grupy z 50% udziałem komonicy zwyczajnej. Wykazano trzy rodzaje eudominantów (*Weissella*, *Loigolactobacillus*, *Lactiplantibacillus*). Grupę dominantów prezentował rodzaj *Lentilactobacillus*, a subdominantami były rodzaje *Levilactobacillus* i *Latilactobacillus*.

6.2. Zadanie badawcze II

6.2.1. Charakterystyka chemiczna zielonki i kiszonek

Skład chemiczny zielonki z lucerny i łuski bobiku został zaprezentowany w Tabeli 9. W łusce bobiku oznaczono 83,14 g BO·kg^{-1} SM, co było 2,4 razy niższą wartością liczbową w stosunku do BO w zielonce z lucerny. Łuska bobiku charakteryzowała się wyższą zawartością frakcji węglowodanów włóknistych, mianowicie było to o 187,20 g NDF, 253,30 g ADF i 12,91 g ADL·kg^{-1} SM więcej w porównaniu do zielonki z lucerny.

Tabela 9. Skład chemiczny i przydatność do zakiszania zielonki z lucerny oraz łuski bobiku

Wyszczególnienie	Zielonka z lucerny	Łuska bobiku
Sucha masa, g·kg^{-1} świeżej masy	315,6	881,8
Skład chemiczny, g·kg^{-1} SM		
Popiół surowy	80,20	51,93
Białko ogólne	197,7	83,14
Tłuszcz surowy	11,39	7,330
Włókno surowe	294,6	448,5
NDF	409,4	596,6
ADF	317,6	570,9
ADL	55,63	68,54
L/NDF	0,136	0,115
Taniny, g·kg^{-1} SM	nd	29,20
Przydatność do zakiszania		
WSC, g·kg^{-1} SM	68,37	nd
BC, g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM	58,42	nd
WSC/BC	1,170	nd
FC	40,92	nd

SM – sucha masa; NDF – włókno neutralno-detergentowe; ADF – włókno kwaśno-detergentowe; ADL – lignina kwaśno-detergentowa; L/NDF – stosunek ligniny do NDF; WSC – węglowodany rozpuszczalne w wodzie; BC – pojemność buforowa; WSC/BC – stosunek węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie do pojemności buforowej; FC – współczynnik fermentacji wg Weissbach, Auerbach (2013); nd – nie dotyczy.

Charakterystykę składu chemicznego sporządzonych kiszonek zamieszczono w Tabeli 10. Wraz ze wzrostem udziału łuski bobiku lub słomy pszennej w zakiszaniu lucerny wzrastał poziom SM (P≤0,001). Stwierdzone w kiszonkach istotne dysproporcje w ilości PS, BO oraz WS (P≤0,001) uwarunkowane były zarówno poziomem, jak i rodzajem dodatku. Najwyższą zawartość BO odnotowano w kiszonce z 12,0% łuski bobiku. Koncentracja TS była statystycznie różna (P≤0,001), co wynikało z rodzaju zastosowanego dodatku. Udział ADF w kiszonkach z różnym poziomem łuski bobiku lub słomy pszennej był istotnie wyższy (P≤0,001) względem kiszonki kontrolnej. Każdy poziom dodatku wpłynął istotnie na wzrost NDF (P≤0,01) i ADF (P≤0,001). Wyższe wartości NDF stwierdzono w wariantach z dodatkiem słomy pszennej niż łuski bobiku.

Tabela 10. Skład chemiczny kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Wyszczególnienie	Skład chemiczny, g·kg^{-1} SM									
	Sucha masa	Popiół surowy	Białko ogólne	Tłuszcz surowy	Włókno surowe	NDF	ADF	ADL	L/NDF	WSC
Kiszonki										
Grupa kontrolna	315,6 ^{e}	99,03 ^{a}	195,5 ^{ab}	19,64 ^{abc}	225,4 ^{e}	374,9 ^{h}	290,3 ^{f}	52,64 ^{c}	0,157 ^{abc}	7,550
Lucerna z dodatkiem:										
1,2% łuski bobiku	328,5 ^{de}	86,63 ^{ab}	190,3 ^{abc}	18,30 ^{abc}	307,5 ^{abcd}	419,9 ^{efg}	361,5 ^{e}	65,03 ^{abc}	0,155 ^{abcd}	9,993
1,2% słomy pszennej	330,2 ^{de}	82,66 ^{abc}	178,9 ^{bcde}	18,85 ^{abc}	333,5 ^{abc}	443,0 ^{cdef}	386,7 ^{abcde}	68,36 ^{abc}	0,154 ^{abcd}	9,491
2,4% łuski bobiku	353,6 ^{bcde}	79,51 ^{abcd}	184,8 ^{abc}	17,57 ^{bc}	312,7 ^{abcd}	417,3 ^{efg}	374,9 ^{cde}	66,95 ^{abc}	0,160 ^{abc}	15,80
2,4% słomy pszennej	345,7 ^{cde}	80,34 ^{abcd}	176,6 ^{bcde}	18,39 ^{abc}	339,2 ^{ab}	452,2 ^{cdef}	392,7 ^{abcde}	68,72 ^{abc}	0,152 ^{abcde}	9,217
3,6% łuski bobiku	400,2 ^{b}	77,00 ^{bcd}	174,9 ^{cde}	17,55 ^{bc}	341,9 ^{ab}	461,3 ^{bcd}	408,7 ^{abc}	72,60 ^{ab}	0,157 ^{abc}	12,41
3,6% słomy pszennej	362,4 ^{bcde}	74,28 ^{bcd}	179,5 ^{abcd}	26,38 ^{a}	301,1 ^{cd}	442,4 ^{def}	368,9 ^{de}	62,82 ^{abc}	0,142 ^{bcde}	14,01
4,8% łuski bobiku	362,9 ^{bcde}	76,81 ^{bcd}	177,9 ^{bcde}	18,47 ^{abc}	315,7 ^{abcd}	420,7 ^{efg}	374,3 ^{cde}	64,84 ^{abc}	0,154 ^{abcd}	13,70
4,8% słomy pszennej	366,4 ^{bcd}	83,78 ^{abc}	164,5 ^{de}	17,38 ^{bc}	345,2 ^{a}	494,9 ^{b}	402,0 ^{abcd}	68,56 ^{abc}	0,138 ^{bcde}	9,172
6,0% łuski bobiku	376,3 ^{bcd}	84,61 ^{abc}	174,2 ^{cde}	17,58 ^{bc}	344,7 ^{a}	450,2 ^{cdef}	419,3 ^{a}	71,93 ^{ab}	0,160 ^{abc}	10,77
6,0% słomy pszennej	366,6 ^{bcd}	91,23 ^{ab}	174,4 ^{cde}	20,02 ^{abc}	313,7 ^{abcd}	453,6 ^{cde}	381,6 ^{abcde}	64,24 ^{abc}	0,142 ^{bcde}	8,166
12,0% łuski bobiku	380,7 ^{bc}	76,60 ^{bcd}	198,9 ^{a}	15,59 ^{bc}	281,9 ^{d}	395,5 ^{g}	375,7 ^{bcde}	62,35 ^{abc}	0,158 ^{abc}	8,078
12,0% słomy pszennej	382,9 ^{bc}	80,95 ^{abcd}	159,1 ^{e}	21,58 ^{ab}	292,6 ^{d}	479,6 ^{bc}	372,5 ^{cde}	60,30 ^{bc}	0,126 ^{cde}	7,361
18,0% łuski bobiku	391,7 ^{bc}	64,43 ^{cd}	184,3 ^{abcd}	16,37 ^{bc}	304,9 ^{bcd}	416,1 ^{fg}	401,1 ^{abcd}	69,51 ^{abc}	0,167 ^{ab}	7,679
18,0% słomy pszennej	395,3 ^{bc}	77,21 ^{bcd}	131,9 ^{f}	22,76 ^{ab}	304,7 ^{bcd}	535,9 ^{a}	404,4 ^{abcd}	61,96 ^{abc}	0,115 ^{e}	7,876
24,0% łuski bobiku	456,8 ^{a}	60,68 ^{d}	176,6 ^{bcde}	12,30 ^{c}	311,5 ^{abcd}	431,7 ^{defg}	413,6 ^{ab}	79,90 ^{a}	0,185 ^{a}	4,720
24,0% słomy pszennej	455,8 ^{a}	81,22 ^{abcd}	132,8 ^{f}	23,52 ^{ab}	308,3 ^{abcd}	558,9 ^{a}	407,8 ^{abc}	66,33 ^{abc}	0,119 ^{de}	5,591
SEM	9,134	2,091	4,338	0,768	6,784	12,18	7,037	1,391	0,004	0,707
$P_{\text{rodzaj dodatku}}$	*	***	***	***	***	***	***	**	***	ns
$P_{\text{dawka dodatku}}$	***	***	*	ns	***	**	***	*	ns	ns
$P_{\text{rodzaj dodatku} \times \text{dawka dodatku}}$	***	***	***	***	***	***	***	**	***	ns
R^2	0,887	0,706	0,918	0,672	0,885	0,962	0,890	0,585	0,745	0,393

SM – sucha masa; NDF – włókno neutralno-detergentowe; ADF – włókno kwaśno-detergentowe; ADL – lignina kwaśno-detergentowa; L/NDF – stosunek ligniny do NDF; WSC – węglowodany rozpuszczalne w wodzie; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – g) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.

Koncentracja ADL jedynie w grupach z dodatkiem łuski bobiku na poziomie 3,6%, 6,0% i 24,0% była istotnie wyższa (P≤0,01) w porównaniu z grupą kontrolną. Wraz ze wzrostem udziału łuski bobiku wzrastała wartość wskaźnika L/NDF, a w przypadku dodatku słomy pszennej zaobserwowano tendencję odwrotną (P≤0,001).

Analizowane parametry fermentacji kiszonek doświadczalnych zamieszczono w Tabeli 11. W porównaniu do grupy kontrolnej wartości pH były istotnie różne (P≤0,001) jedynie dla wariantów o najniższych udziałach łuski bobiku (1,2% i 2,4%) oraz z dodatkiem 1,2% słomy pszennej. Pozostałe kiszonki miały zbieżne wartości pH. Koncentracja kwasu mlekowego była różna (P≤0,01) wyłącznie między kiszonką z grupy 3,6% słomy pszennej o najwyższej wartości, a wariantami zakiszonej lucerny z 24,0% łuski bobiku i 24,0% słomy pszennej, dla których stwierdzono wartości najniższe. Pomimo braku istotnych rozbieżności wśród pozostałych wariantów doświadczalnych z grupą kontrolną należało zwrócić uwagę na zmniejszającą się ilość kwasu wraz ze wzrostem dawki dodatku absorbującego, niezależnie od jego rodzaju. Najniższą zawartość kwasu octowego stwierdzono w kiszonkach z 24,0% łuski bobiku i 24,0% słomy pszennej (P≤0,001). Wyższą wartość stosunku kwasu mlekowego do octowego (P≤0,01) stwierdzono w kiszonce z 2,4% łuski bobiku względem grupy kontrolnej i grup z 3,6% i 6,0% łuski bobiku oraz 2,4%, 4,8%, 6,0%, 18,0% i 24,0% słomy pszennej.

Najwyższa koncentracja kwasu propionowego została stwierdzona w kiszonce z lucerny z dodatkiem 1,2% słomy pszennej (Tabela 11). Kiszonka ta uzyskała istotnie wyższą wartość dla kwasu względem grup z 4,8%, 12,0%, 18,0% i 24,0% łuski bobiku lub słomy pszennej (P≤0,001). Kwas masłowy występował w śladowych ilościach, najwyższą zawartość odnotowano w grupie z 24,0% słomy pszennej (>0,5 $g \cdot kg^{-1}$ SM) (P≤0,001). Niezależnie od rodzaju dodatku wszystkie grupy o dawce absorbentu do poziomu 6,0% włącznie uzyskały niższe zawartości kwasu masłowego.

Kiszonki z 18,0% i 24,0% łuski bobiku miały niższą koncentrację LKT (P≤0,001) (Tabela 11). W kiszonkach z 12,0% i 24,0% łuski bobiku, 3,6% i 4,8% słomy pszennej nie odnotowano obecności etanolu, a jego koncentracja w pozostałych wariantach łącznie z grupą kontrolną była niska (P>0,05). Najwyższą koncentracją $N\text{-}NH_3$ charakteryzowała się grupa z 12,0% słomy pszennej (P≤0,001). Istotne dysproporcje w ilości $N\text{-}NH_3$ odnotowano dla grup z 12,0% łuski bobiku i 12,0% słomy pszennej (P≤0,05). Grupy o niższym poziomie dodatku łuski bobiku, jak i słomy pszennej od 1,2% do 4,8%, miały istotnie niższą zawartość $N\text{-}NH_3$ względem grupy z 12,0% słomy pszennej (P≤0,01).

Tabela 11. Wybrane parametry fermentacji kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Wyszczególnienie	Produkty fermentacji, g·kg^{-1} SM								
	pH	N-NH_3, g·kg^{-1} $N_{ogólny}$	Kwas mlekowy	Kwas octowy	Kwas propionowy	Kwas masłowy	LKT	Kwas mlekowy : kwas octowy	Etanol
Kiszonki									
Grupa kontrolna	5,15 ^{a}	73,41 ^{abc}	32,28 ^{abc}	6,999 ^{a}	0,189 ^{abc}	0,243 ^{ab}	7,452 ^{a}	4,628 ^{b}	0,168
Lucerna z dodatkiem:									
1,2% łuski bobiku	4,83 ^{d}	55,31 ^{c}	25,86 ^{abc}	4,936 ^{abc}	0,180 ^{abc}	0,004 ^{b}	5,141 ^{abc}	5,383 ^{ab}	0,073
1,2% słomy pszennej	4,92 ^{bcd}	61,90 ^{c}	34,65 ^{ab}	6,885 ^{a}	0,266 ^{a}	0,013 ^{b}	7,181 ^{ab}	5,051 ^{ab}	0,968
2,4% łuski bobiku	4,87 ^{cd}	56,60 ^{c}	35,12 ^{ab}	4,828 ^{abc}	0,155 ^{abc}	0,004 ^{b}	5,000 ^{abc}	7,158 ^{a}	1,696
2,4% słomy pszennej	5,00 ^{abcd}	62,82 ^{c}	26,40 ^{abc}	6,006 ^{abc}	0,211 ^{ab}	0,004 ^{b}	6,237 ^{abc}	4,409 ^{b}	2,234
3,6% łuski bobiku	4,99 ^{abcd}	62,87 ^{c}	28,33 ^{abc}	6,166 ^{abc}	0,199 ^{abc}	0,004 ^{b}	6,382 ^{abc}	4,630 ^{b}	1,164
3,6% słomy pszennej	4,98 ^{abcd}	67,69 ^{bc}	36,16 ^{a}	6,849 ^{a}	0,184 ^{abc}	0,005 ^{b}	7,055 ^{ab}	5,328 ^{ab}	0,000
4,8% łuski bobiku	4,93 ^{abcd}	60,99 ^{c}	29,50 ^{abc}	5,773 ^{abc}	0,115 ^{bc}	0,004 ^{b}	5,912 ^{abc}	5,201 ^{ab}	1,304
4,8% słomy pszennej	4,94 ^{abcd}	66,21 ^{bc}	26,37 ^{abc}	6,814 ^{a}	0,122 ^{bc}	0,004 ^{b}	6,961 ^{ab}	3,955 ^{b}	0,000
6,0% łuski bobiku	4,99 ^{abcd}	69,39 ^{abc}	25,15 ^{abc}	6,641 ^{ab}	0,151 ^{bc}	0,004 ^{b}	6,814 ^{abc}	3,825 ^{b}	0,243
6,0% słomy pszennej	4,95 ^{abcd}	76,38 ^{abc}	27,25 ^{abc}	6,640 ^{ab}	0,194 ^{abc}	0,004 ^{b}	6,856 ^{abc}	4,135 ^{b}	0,607
12,0% łuski bobiku	5,08 ^{abc}	66,63 ^{bc}	23,85 ^{abc}	4,420 ^{abc}	0,116 ^{bc}	0,281 ^{ab}	4,836 ^{abc}	5,400 ^{ab}	0,000
12,0% słomy pszennej	5,07 ^{abc}	90,40 ^{a}	26,20 ^{abc}	4,887 ^{abc}	0,118 ^{bc}	0,435 ^{a}	5,452 ^{abc}	5,363 ^{ab}	0,560
18,0% łuski bobiku	4,93 ^{abcd}	68,45 ^{bc}	21,05 ^{abc}	4,038 ^{abc}	0,116 ^{bc}	0,047 ^{b}	4,211 ^{bc}	5,246 ^{ab}	0,017
18,0% słomy pszennej	5,14 ^{ab}	85,07 ^{ab}	22,67 ^{abc}	4,869 ^{abc}	0,085 ^{bc}	0,234 ^{ab}	5,206 ^{abc}	4,667 ^{b}	0,084
24,0% łuski bobiku	5,01 ^{abcd}	74,13 ^{abc}	19,84 ^{bc}	3,661 ^{c}	0,090 ^{bc}	0,053 ^{b}	3,814 ^{c}	5,449 ^{ab}	0,000
24,0% słomy pszennej	5,07 ^{abc}	73,61 ^{abc}	17,31 ^{c}	3,834 ^{bc}	0,066 ^{c}	0,504 ^{a}	4,410 ^{abc}	4,512 ^{b}	0,409
SEM	0,021	2,189	1,261	0,276	0,013	0,039	0,270	0,182	0,161
$P_{rodzaj\ dodatku}$	**	*	ns	*	ns	ns	**	ns	ns
$P_{dawka\ dodatku}$	***	**	**	***	***	***	***	ns	ns
$P_{rodzaj\ dodatku \times dawka\ dodatku}$	***	***	**	***	***	***	**	**	ns
R^2	0,673	0,711	0,601	0,672	0,660	0,781	0,642	0,621	0,296

SM – sucha masa; N-NH_3 – azot amoniakalny, g·kg^{-1} $N_{ogólny}$; LKT – suma lotnych kwasów tłuszczowych tj. kwasu octowego, propionowego, izomasłowego, masłowego, izowalerianowego, walerianowego; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych (P > 0,05); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – d) nie różnią się istotnie na poziomie P ≤ 0,05; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.

6.2.2. Związki azotowe zielonki i kiszonek

W składzie BO zielonki z lucerny przed zakiszeniem TP stanowiło 68,13% BO, a SCP było równe 9,73% BO (Tabela 12). W kiszonce kontrolnej podczas zakiszania 55,42% TP zostało zdegradowane do prostszych form. W porównaniu do zielonki z lucerny w kiszonce kontrolnej stwierdzono wzrost frakcji SCP o 25,27 pkt. % oraz ADICP o 0,13 pkt. % i obniżenie zawartości NDICP o 4,16 pkt. %.

Wszystkie odnotowane różnice w analizowanych frakcjach BO sporządzonych kiszonek zostały potwierdzone statystycznie ($P \leq 0,001$) (Tabela 12). Najwyższe i jednocześnie istotnie różne zawartości TP miały kiszonki z 18,0% i 24,0% łuski bobiku oraz 18,0% słomy pszennej w stosunku do grupy kontrolnej. Kiszonki te uzyskały odpowiednio o 11,82 pkt. %, 10,51 pkt. % i 13,38 pkt. % wyższą zawartość TP w stosunku do kiszonki grupy kontrolnej. Łuska bobiku lub słoma pszenna w dawce do 12,0% włącznie nie wpłynęła na poprawę jakości BO kiszonek, a różnice w ilości TP i SCP między wariantami niezależnie od rodzaju dodatku nie były istotne statystycznie. Zastosowanie 18,0% lub 24,0% łuski bobiku bądź słomy pszennej obniżyło poziom frakcji SCP w kiszonkach. Kiszonka z 2,4% łuski bobiku uzyskała najniższe wartości NDICP, a wyższe poziomy słomy pszennej (18,0% i 24,0%) spowodowały, że kiszonki miały najwyższą koncentrację tejże frakcji w stosunku do grupy kontrolnej (o 4,94 pkt. % i 4,77 pkt. %, odpowiednio). Frakcja ADICP wzrastała przy wyższych poziomach łuski bobiku (12,0%, 18,0% i 24,0%) i słomy pszennej (18,0% i 24,0%).

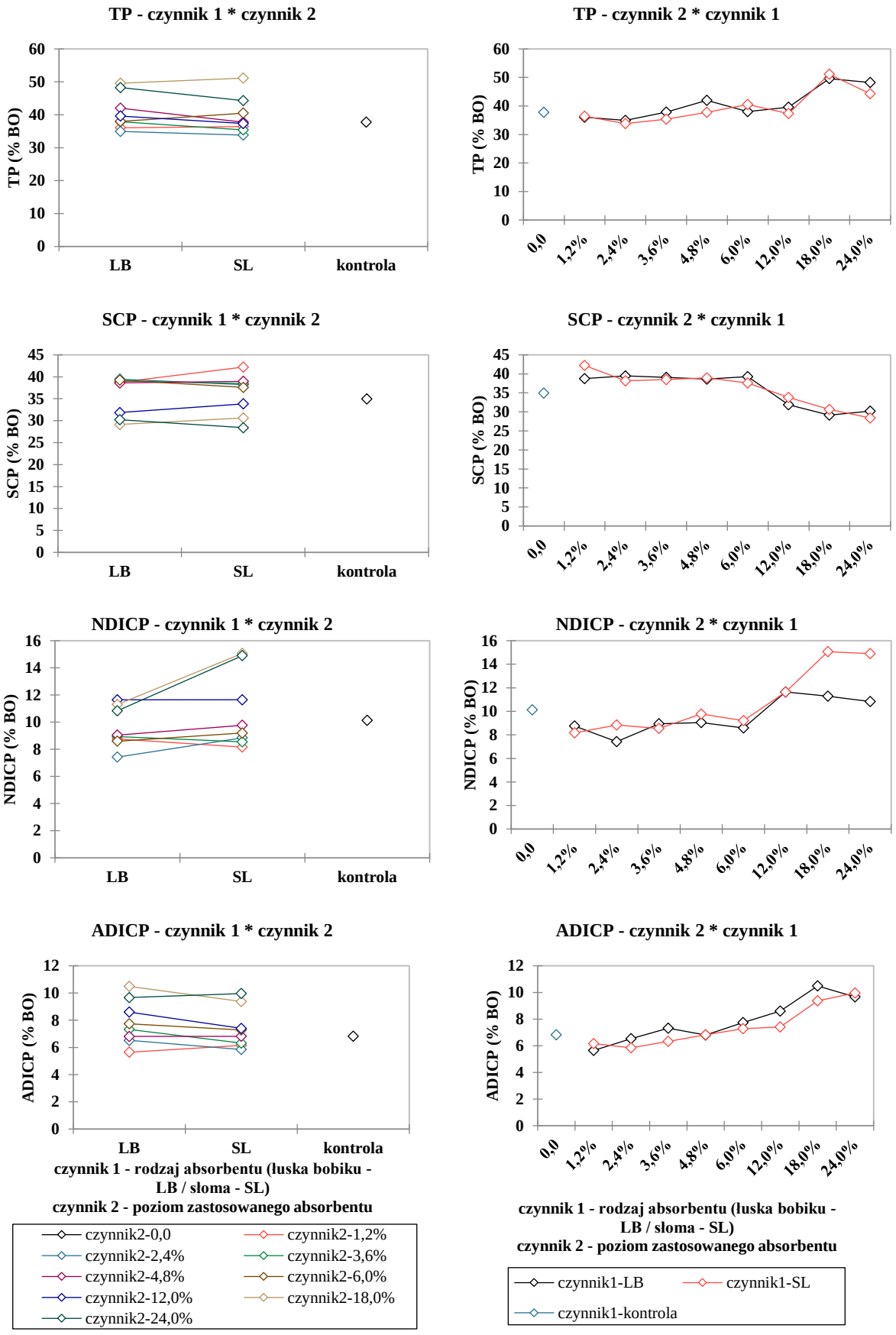
Na podstawie przeprowadzonych analiz statystycznych w badaniach własnych wykazano, że rodzaj absorbentu istotnie wpływał tylko i wyłącznie na koncentrację frakcji TP, co sugeruje aktywność tanin zawartych w łusce bobiku (Wykres 5). Poziom zastosowanego dodatku, nie zależnie od rodzaju miał istotny wpływ na wszystkie omówione powyżej frakcje BO. Analiza interakcji wykazała, że pomiędzy czynnikami niezależnie od stopnia indywidualnego wpływu wystąpił istotny efekt interakcji, który wpływał na zmienną zależną TP, SCP, NDICP i ADICP (Wykres 5).

W Tabeli 13 zaprezentowano frakcje białkowe zielonki z lucerny i kiszonek doświadczalnych według systemu CNCPS v 6.5. Zielonka z lucerny charakteryzowała się bardzo niską koncentracją rozpuszczalnej frakcji PA1. Głównym składnikiem BO zielonki była frakcja PB1 stanowiąca 51,42% BO. Podczas zakiszania BO lucerny istotnie zmieniło swój skład. Odnotowano wzrost udziału frakcji PA1 w kiszonkach względem zielonki z lucerny, był to średnio 20-krotny wzrost wartości liczbowej.

Tabela 12. Frakcje białkowe zielonki i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Wyszczególnienie	Frakcje białkowe, % białka ogólnego			
	Białko właściwe	Białko rozpuszczalne w buforze	Białko nierozpuszczalne w neutralnym detergencie	Białko nierozpuszczalne w kwaśnym detergencie
Zielonka z lucerny	68,13	9,73	14,29	6,69
Kiszonki				
Grupa kontrolna	37,76 ^{ef}	35,00 ^{bcd}	10,13 ^{bcde}	6,82 ^{defg}
Lucerna z dodatkiem:				
1,2% łuski bobiku	36,05 ^{ef}	38,75 ^{ab}	8,76 ^{efg}	5,64 ^{g}
1,2% słomy pszennej	36,42 ^{ef}	42,22 ^{a}	8,16 ^{fg}	6,15 ^{fg}
2,4% łuski bobiku	34,95 ^{ef}	39,48 ^{ab}	7,42 ^{g}	6,52 ^{efg}
2,4% słomy pszennej	33,83 ^{f}	38,21 ^{ab}	8,84 ^{efg}	5,84 ^{g}
3,6% łuski bobiku	37,89 ^{ef}	39,05 ^{ab}	8,93 ^{efg}	7,32 ^{def}
3,6% słomy pszennej	35,40 ^{ef}	38,47 ^{ab}	8,55 ^{efg}	6,32 ^{efg}
4,8% łuski bobiku	42,01 ^{cdef}	38,62 ^{ab}	9,04 ^{defg}	6,81 ^{defg}
4,8% słomy pszennej	37,74 ^{ef}	38,96 ^{ab}	9,77 ^{cdef}	6,81 ^{defg}
6,0% łuski bobiku	37,99 ^{ef}	39,26 ^{ab}	8,59 ^{efg}	7,74 ^{cd}
6,0% słomy pszennej	40,48 ^{cdef}	37,59 ^{abc}	9,20 ^{defg}	7,28 ^{def}
12,0% łuski bobiku	39,61 ^{def}	31,86 ^{cde}	11,65 ^{b}	8,60 ^{bc}
12,0% słomy pszennej	37,36 ^{ef}	33,83 ^{bcde}	11,65 ^{b}	7,40 ^{cde}
18,0% łuski bobiku	49,58 ^{abc}	29,15 ^{de}	11,29 ^{bc}	10,49 ^{a}
18,0% słomy pszennej	51,14 ^{a}	30,63 ^{de}	15,07 ^{a}	9,38 ^{ab}
24,0% łuski bobiku	48,27 ^{bcd}	30,22 ^{de}	10,84 ^{bcd}	9,67 ^{ab}
24,0% słomy pszennej	44,30 ^{cde}	28,42 ^{e}	14,90 ^{a}	9,96 ^{a}
SEM	2,226	1,013	0,515	0,354
$P_{\text{rodzaj dodatku}}$	**	ns	ns	ns
$P_{\text{dawka dodatku}}$	***	***	***	***
$P_{\text{rodzaj dodatku} \times \text{dawka dodatku}}$	***	***	***	***
R^2	0,560	0,662	0,806	0,415

SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – g) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.



Wykres 5. Analiza interakcji dla frakcji białkowych kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Tabela 13. Frakcje białkowe zielonki i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej według CNCPS v 6.5

Wyszczególnienie	Frakcje białkowe według CNCPS v 6.5, % białka ogólnego				
	Frakcja PA1	Frakcja PA2	Frakcja PB1	Frakcja PB2	Frakcja PC
Zielonka z lucerny	0,35	33,94	51,42	7,60	6,69
Kiszonki					
Grupa kontrolna	7,34 ^{abc}	54,87 ^{abcd}	27,66 ^{bcde}	3,31 ^{bcd}	6,82 ^{defg}
Lucerna z dodatkiem:					
1,2% łuski bobiku	5,53 ^{c}	56,68 ^{abc}	29,03 ^{abc}	3,12 ^{bcd}	5,64 ^{g}
1,2% słomy pszennej	6,19 ^{c}	58,94 ^{ab}	26,71 ^{de}	2,01 ^{def}	6,15 ^{fg}
2,4% łuski bobiku	5,66 ^{c}	54,30 ^{abcd}	32,62 ^{abc}	0,90 ^{ef}	6,52 ^{efg}
2,4% słomy pszennej	6,28 ^{c}	59,56 ^{a}	25,32 ^{b}	3,00 ^{bcdef}	5,84 ^{g}
3,6% łuski bobiku	6,29 ^{c}	54,52 ^{abcd}	30,26 ^{abc}	1,61 ^{def}	7,32 ^{def}
3,6% słomy pszennej	6,77 ^{bc}	56,49 ^{abc}	28,19 ^{de}	2,23 ^{cdef}	6,32 ^{efg}
4,8% łuski bobiku	6,10 ^{c}	53,21 ^{bcd}	31,65 ^{ab}	2,23 ^{cdef}	6,81 ^{defg}
4,8% słomy pszennej	6,62 ^{bc}	52,15 ^{cd}	31,46 ^{ab}	2,96 ^{bcdef}	6,81 ^{defg}
6,0% łuski bobiku	6,94 ^{abc}	51,28 ^{cd}	33,19 ^{a}	0,85 ^{ef}	7,74 ^{cd}
6,0% słomy pszennej	7,64 ^{abc}	52,34 ^{cd}	30,82 ^{abc}	1,92 ^{def}	7,28 ^{def}
12,0% łuski bobiku	6,66 ^{bc}	52,98 ^{cd}	28,71 ^{abc}	3,05 ^{bcde}	8,60 ^{bc}
12,0% słomy pszennej	9,04 ^{a}	52,01 ^{cd}	27,30 ^{ab}	4,25 ^{abc}	7,40 ^{cde}
18,0% łuski bobiku	6,85 ^{bc}	52,95 ^{cd}	28,90 ^{abc}	0,81 ^{f}	10,49 ^{a}
18,0% słomy pszennej	8,51 ^{ab}	53,10 ^{cd}	23,32 ^{f}	5,69 ^{a}	9,38 ^{ab}
24,0% łuski bobiku	7,41 ^{abc}	49,62 ^{d}	32,13 ^{a}	1,17 ^{def}	9,67 ^{ab}
24,0% słomy pszennej	7,36 ^{abc}	52,49 ^{cd}	25,25 ^{b}	4,94 ^{ab}	9,96 ^{a}
SEM	2,189	0,624	0,990	0,334	0,354
$P_{\text{rodzaj dodatku}}$	*	ns	ns	***	ns
$P_{\text{dawka dodatku}}$	**	***	***	ns	***
$P_{\text{rodzaj dodatku} \times \text{dawka dodatku}}$	***	***	***	***	***
R^2	0,711	0,665	0,656	0,137	0,415

PA1 – azot amoniakalny; PA2 – białko rozpuszczalne w buforze; PB1 – białko nierozpuszczalne w buforze; PB2 – białko związane z włóknem; PC – białko niestrawne; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – g) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$.

Niezależnie od rodzaju i dawki zastosowanego dodatku główną frakcję BO w kiszonkach stanowiła wówczas frakcja PA2 w zakresie od 49,62% do 59,56% BO. Drugą co do ilości była frakcja PB1 w kiszonkach, której udział zmniejszył się w wyniku zakiszenia lucerny niezależnie od rodzaju i poziomu dodatku.

Warianty doświadczalne kiszonek nie różniły się istotnie od grupy kontrolnej zawartością frakcji PA1 (Tabela 13). Kiszonki z dodatkiem łuski bobiku lub słomy pszennej na poziomie od 1,2% do 4,8% włącznie oraz kiszonka z 12,0% i 18,0% łuski bobiku miały istotnie niższą zawartość frakcji PA1 względem kiszonki z 12,0% słomy pszennej, dla której stwierdzono wartość najwyższą tejże frakcji. Frakcja PA2 stanowiła główny składnik BO wszystkich kiszonek, którego zawartość nie była różna statystycznie względem grupy kontrolnej dla żadnego ze sporządzonych wariantów doświadczalnych. Najwyższą zawartość frakcji PA2 stwierdzono w kiszonce z 2,4% słomy pszennej. Grupa z 24,0% łuski bobiku uzyskała istotnie najniższą wartość frakcji PA2 i jeden z najwyższych udziałów frakcji PB1 (32,13% BO), istotnie wyższy od grupy kontrolnej, obok kiszonki z 6,0% łuski bobiku (PB1 = 33,19% BO). Najmniej frakcji PB1 stwierdzono w kiszonce z 18,0% słomy pszennej. W grupach o tych samych poziomach absorbentu, lecz przy wykorzystaniu słomy pszennej kiszonki uzyskiwały zwykle niższe wartości PB1, które nie zostały potwierdzone statystycznie. Porównując skład BO kiszonek w badaniach własnych stwierdzono istotnie wzrastający udział frakcji PC wraz ze wzrostem udziału dodatku, niezależnie od jego rodzaju.

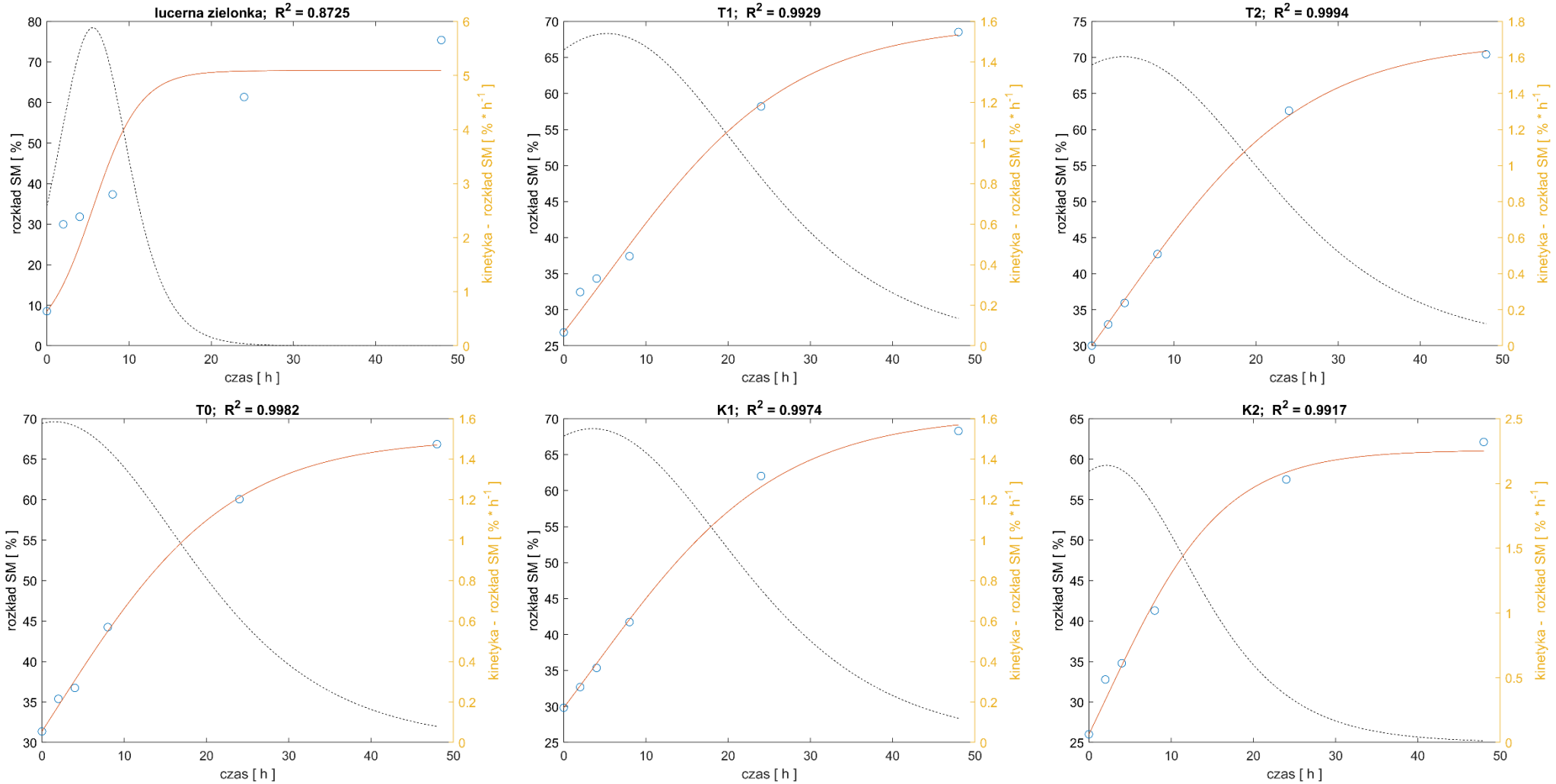
Rodzaj dodatku istotnie wpływał na frakcje PA1 ($P \leq 0,05$) i PB2 ($P \leq 0,001$), natomiast dawka dodatku miała potwierdzony statystycznie wpływ na udział frakcji PA1 ($P \leq 0,01$), PA2, PB1, i PC ($P \leq 0,001$). Wpływ istotnej interakcji obu czynników doświadczalnych, zaobserwowano dla wszystkich frakcji BO przedstawionych w systemie CNCPS v 6.5. Najbardziej korzystny skład BO uzyskała lucerna zakiszona z łuską bobiku na poziomie 24,0%, aczkolwiek analiza wariancji potwierdziła jedynie wpływ łuski bobiku jako źródła tanin dla frakcji PA1 i PB2. Niższe udziały łuski bobiku w zakiszaniu lucerny w dawce od 1,2% do 18,0% włącznie nie dawały oczekiwanego efektu ograniczenia przemian proteolitycznych.

6.2.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonki i kiszonek

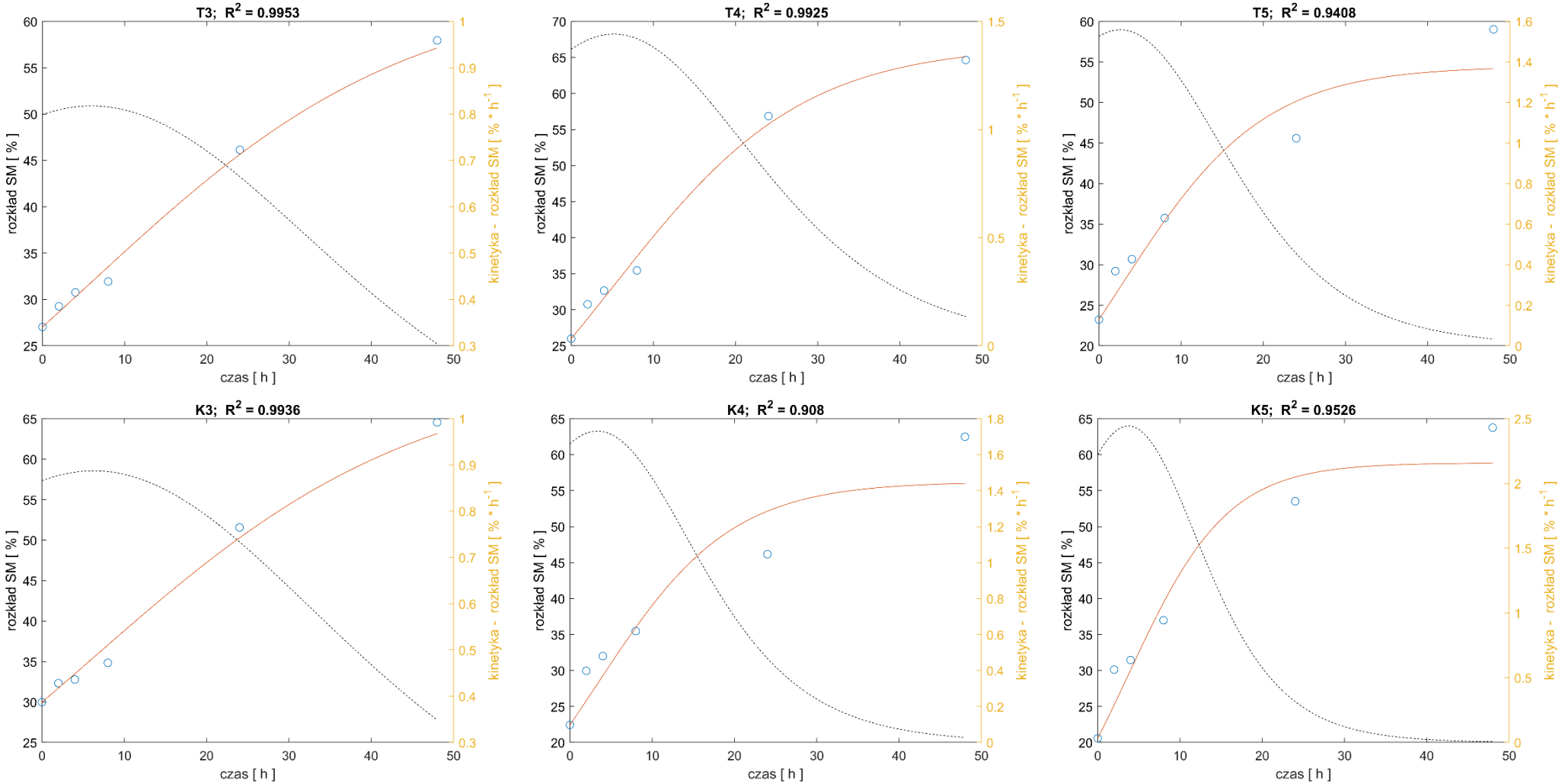
Rozkładalność *in vitro* SM oraz kinetyka rozkładu dla kiszonek znacznie się różniła względem zielonki (Wykres 6). Wszystkie kiszonki doświadczalne niezależnie od poziomu i rodzaju absorbentu uzyskały wyższą początkową degradację SM dla czasu 0 h w porównaniu z zielonką. Wraz ze wzrostem zawartości łuski bobiku lub słomy pszennej rozkładalność SM w czasie 0 h malała. Zielonka charakteryzowała się szybszym tempem rozkładu SM w czasie pierwszych 2 h inkubacji w porównaniu do kiszonek. Ilość SM rozłożonej *in vitro* dla kiszonek oraz zielonki znacznie wzrastała w kolejnych godzinach inkubacji. Kiszonki doświadczalne z grupy 1,2% oraz 2,4% łuski bobiku lub słomy pszennej od 2 h do 24 h inkubacji miały zbliżone ilości rozkładu SM zarówno względem zielonki, jak i kiszonki kontrolnej. Między 8 h, a 24 h inkubacji zaobserwowano najwyższy rozkład SM dla kiszonek niezależnie od rodzaju i dawki dodatku. Sporządzone kiszonki z lucerny z łuską bobiku lub słomą pszenną na poziomie 12,0%, 18,0% i 24,0% charakteryzowały się najwolniejszym rozkładem SM *in vitro* do 48h inkubacji włącznie.

Zielonka z lucerny, a także sporządzone kiszonki miały wysokie wartości współczynnika R^2, co wskazywało na dobre dopasowanie przyjętego modelu. W kiszonkach z 6,0%, 18,0% i 24,0% łuski bobiku, gdzie wzrosło tempo rozkładu SM względem grupy kontrolnej (Wykres 6). Pod względem ilości zastosowanego dodatku tempo rozkładu dla wariantów 2,4% i 4,8% było wyższe po zastosowaniu słomy pszennej w porównaniu do łuski bobiku, co wykazano na podstawie wyższych wartości stałej wzrostu (r) (Tabela 14). W oparciu o wyznaczony model kinetyki rozkładu stwierdzono wzrost rozkładu SM *in vitro* dla kiszonek z 18,0% i 24,0% łuski bobiku (Wykres 6).

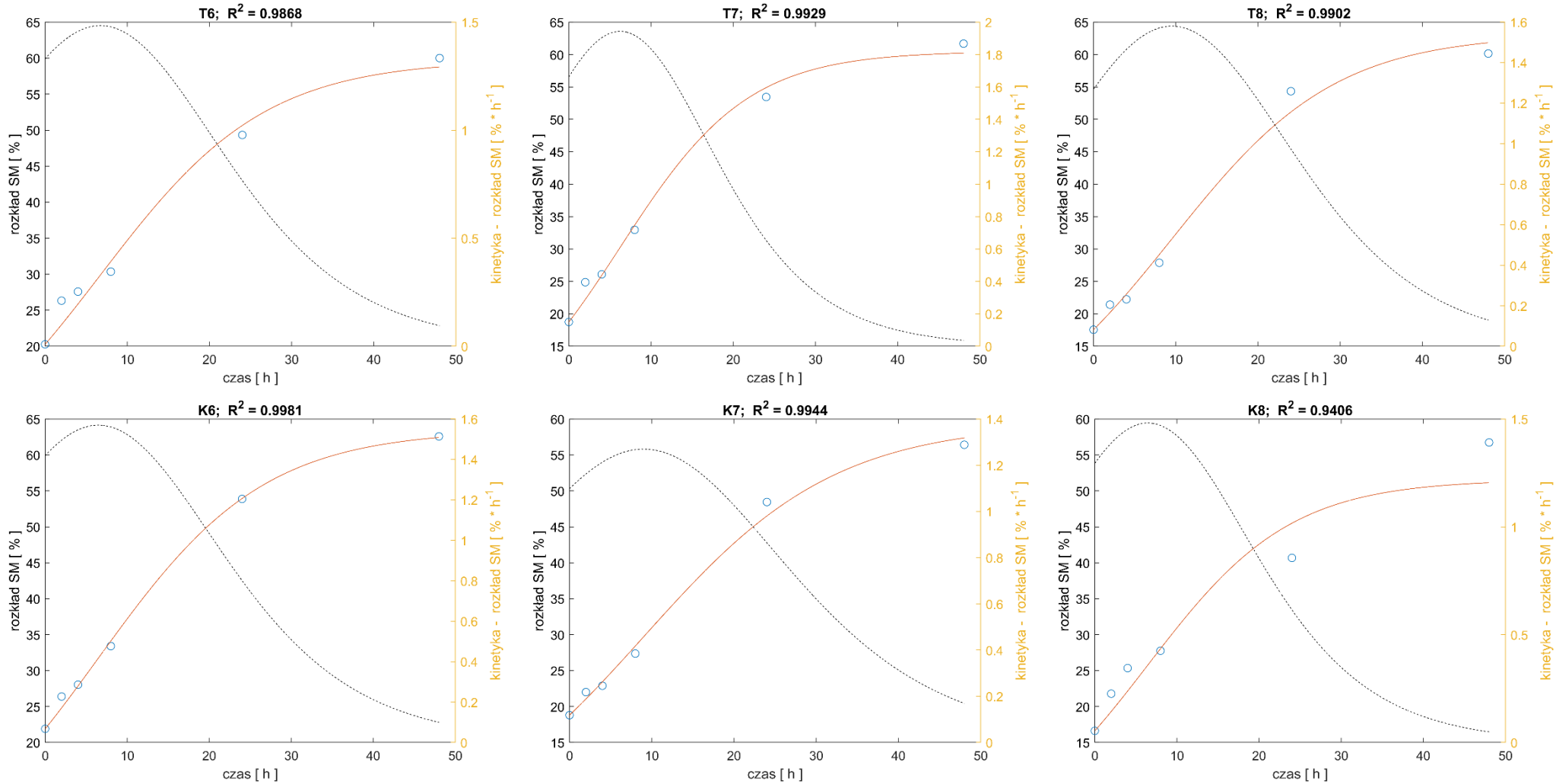
Rozkładalność BO *in vitro* zarówno zielonki z lucerny, jak i kiszonek doświadczalnych była odmienna względem degradacji SM (Wykres 7). Stwierdzono znaczne dysproporcje w degradacji BO w kiszonkach w stosunku do zielonki. Ilość BO rozłożonego w czasie 0 h dla kiszonek była średnio 3 – 4 razy wyższa w porównaniu do zielonki z lucerny. Tempo rozkładu BO dla wybranych wariantów po zakiszeniu lucerny było wolniejsze niezależnie od poziomu i rodzaju zastosowanego dodatku względem zielonki. W grupie z dodatkiem łuski bobiku od 4,8% do 24,0% stwierdzono niższą ilość BO rozłożonego dla czasu 0 h i 2 h inkubacji. Natomiast dla pozostałych godzin inkubacji kiszonki z 12,0%, 18,0% i 24,0% łuski bobiku wykazywały zmniejszoną ilość rozłożonego BO do czasu 48 h włącznie. Warianty z dodatkiem słomy pszennej miały wyższą rozkładalnością BO *in vitro*, łącznie z wynikiem końcowym, dla 48 h inkubacji.



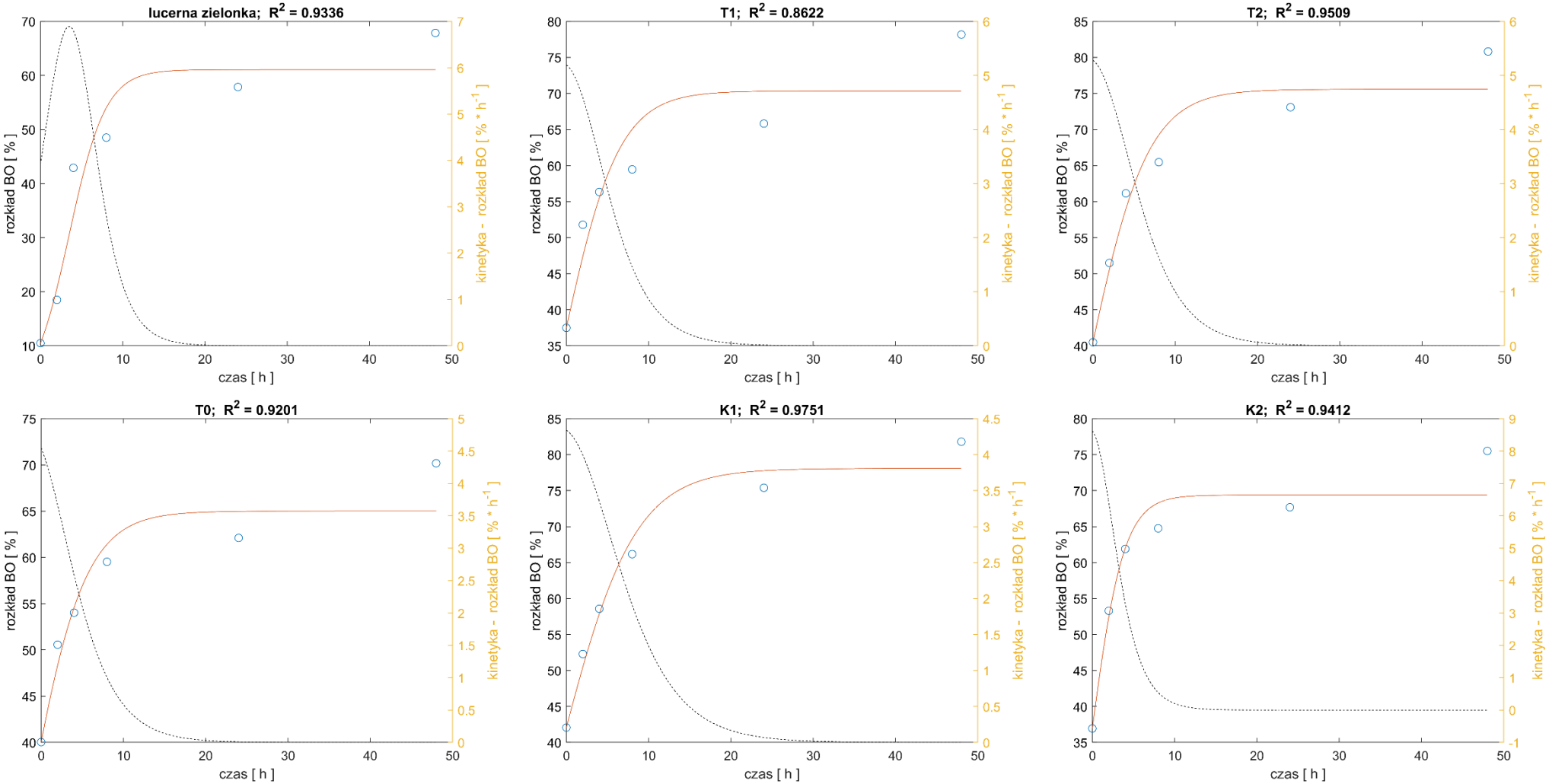
Wykres 6. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy zielonki z lucerny i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej



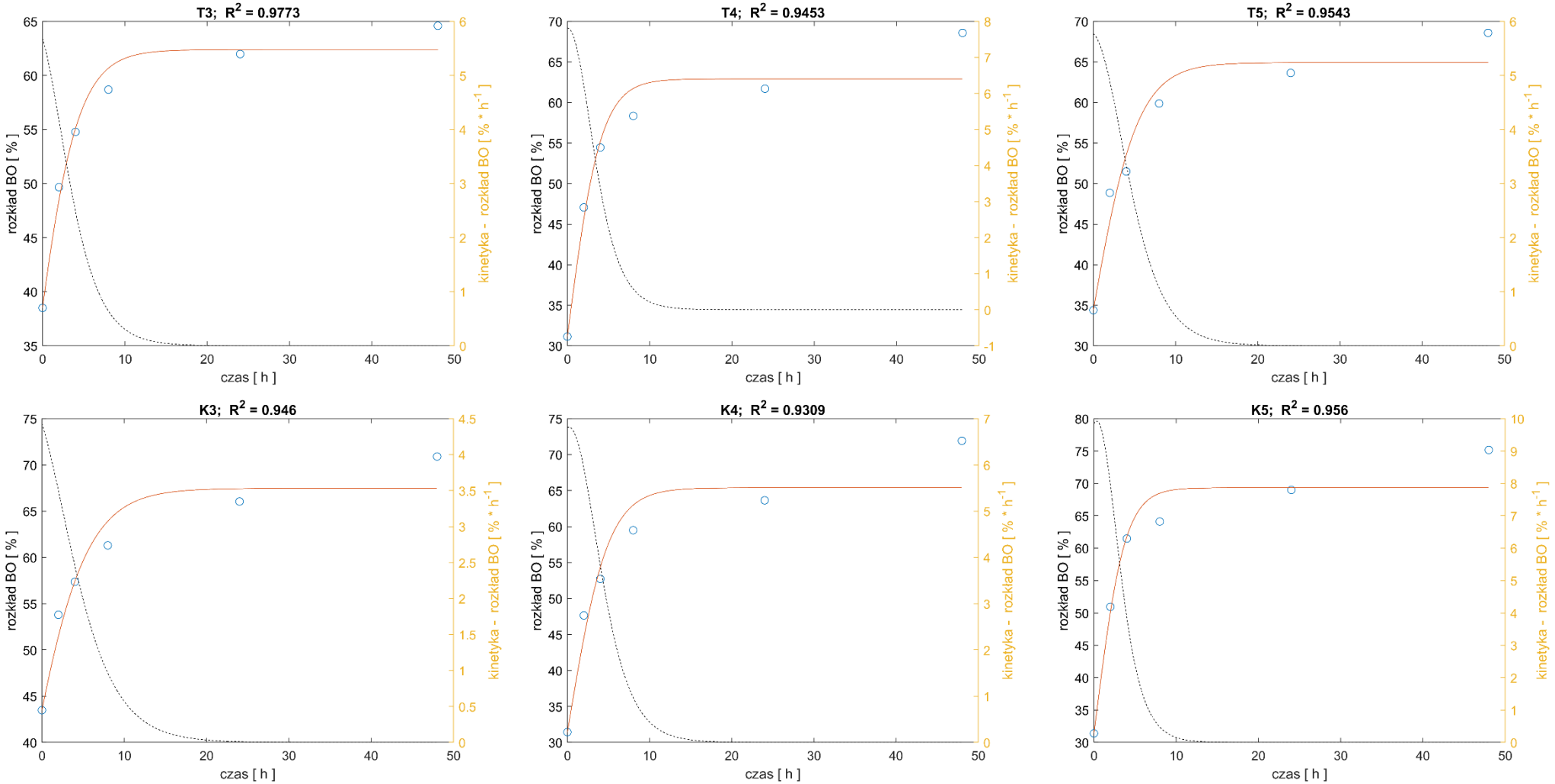
Wykres 6 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy zielonki z lucerny i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej



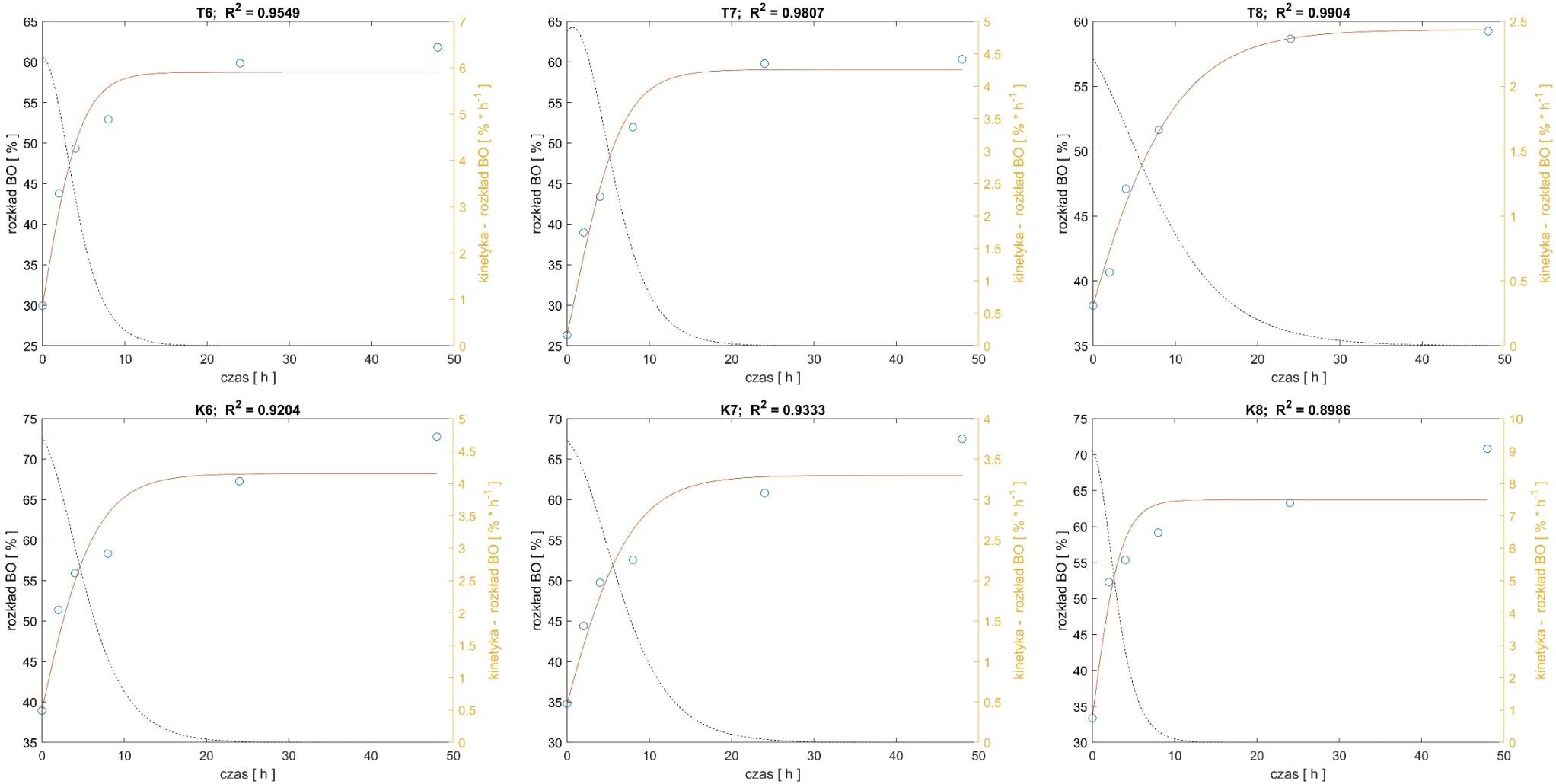
Wykres 6 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy zielonki z lucerny i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej



Wykres 7. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu białka ogólnego zielonki z lucerny i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku i słomy pszennej



Wykres 7 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu białka ogólnego zielonki z lucerny i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku i słomy pszennej



Wykres 7 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu białka ogólnego zielonki z lucerny i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku i słomy pszennej

Miarą tempa zachodzących zmian w degradacji BO *in vitro* była stała wzrostu (r) podana w Tabeli 14, której niższe wartości względem grupy kontrolnej uzyskały warianty z 24,0% łuski bobiku i 1,2%, 3,6%, 12,0% oraz 18,0% słomy pszennej. Kinetyka rozkładu BO *in vitro* była zróżnicowana dla poszczególnych poziomów zastosowania dodatku, nie wykazano żadnej tendencji o charakterze liniowym. Szybszą degradację BO *in vitro* odnotowano na poziomie 1,2%, 3,6%, 4,8%, 12,0% oraz 18,0% dodatku łuski bobiku, w pozostałych wariantach szybsze tempo rozkładu BO było obserwowane dla wariantów z dodatkiem słomy pszennej. Wartości współczynnika R^2 były wysokie dla wszystkich wariantów doświadczalnych kiszonek, jak i dla zielonki z lucerny (Wykres 7).

Tabela 14. Parametry modelu kinetyki rozkładu suchej masy i białka ogólnego zielonki i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Wyszczególnienie		Sucha masa		Białko ogólne	
		r	K	r	K
Zielonka z lucerny		0,347	67,87	0,451	61,08
Kiszonki					
T0	grupa kontrolna	0,094	67,60	0,296	65,01
T1	lucerna z 1,2% łuski bobiku	0,088	69,69	0,297	70,36
K1	lucerna z 1,2% słomy pszennej	0,088	70,53	0,224	78,08
T2	lucerna z 2,4% łuski bobiku	0,089	72,27	0,281	75,58
K2	lucerna z 2,4% słomy pszennej	0,140	61,11	0,499	69,39
T3	lucerna z 3,6% łuski bobiku	0,051	63,75	0,386	62,39
K3	lucerna z 3,6% słomy pszennej	0,050	70,99	0,287	67,47
T4	lucerna z 4,8% łuski bobiku	0,086	66,70	0,497	62,91
K4	lucerna z 4,8% słomy pszennej	0,123	56,24	0,417	65,40
T5	lucerna z 6,0% łuski bobiku	0,115	54,47	0,357	64,92
K5	lucerna z 6,0% słomy pszennej	0,166	58,85	0,573	69,33
T6	lucerna z 12,0% łuski bobiku	0,099	59,76	0,424	58,75
K6	lucerna z 12,0% słomy pszennej	0,099	63,46	0,283	68,20
T7	lucerna z 18,0% łuski bobiku	0,129	60,51	0,332	59,06
K7	lucerna z 18,0% słomy pszennej	0,086	59,43	0,239	62,99
T8	lucerna z 24,0% łuski bobiku	0,100	63,14	0,162	59,36
K8	lucerna z 24,0% słomy pszennej	0,115	51,57	0,568	63,73

r – stała wzrostu ($1 \cdot h^{-1}$); K – stałe w modelu.

6.2.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych

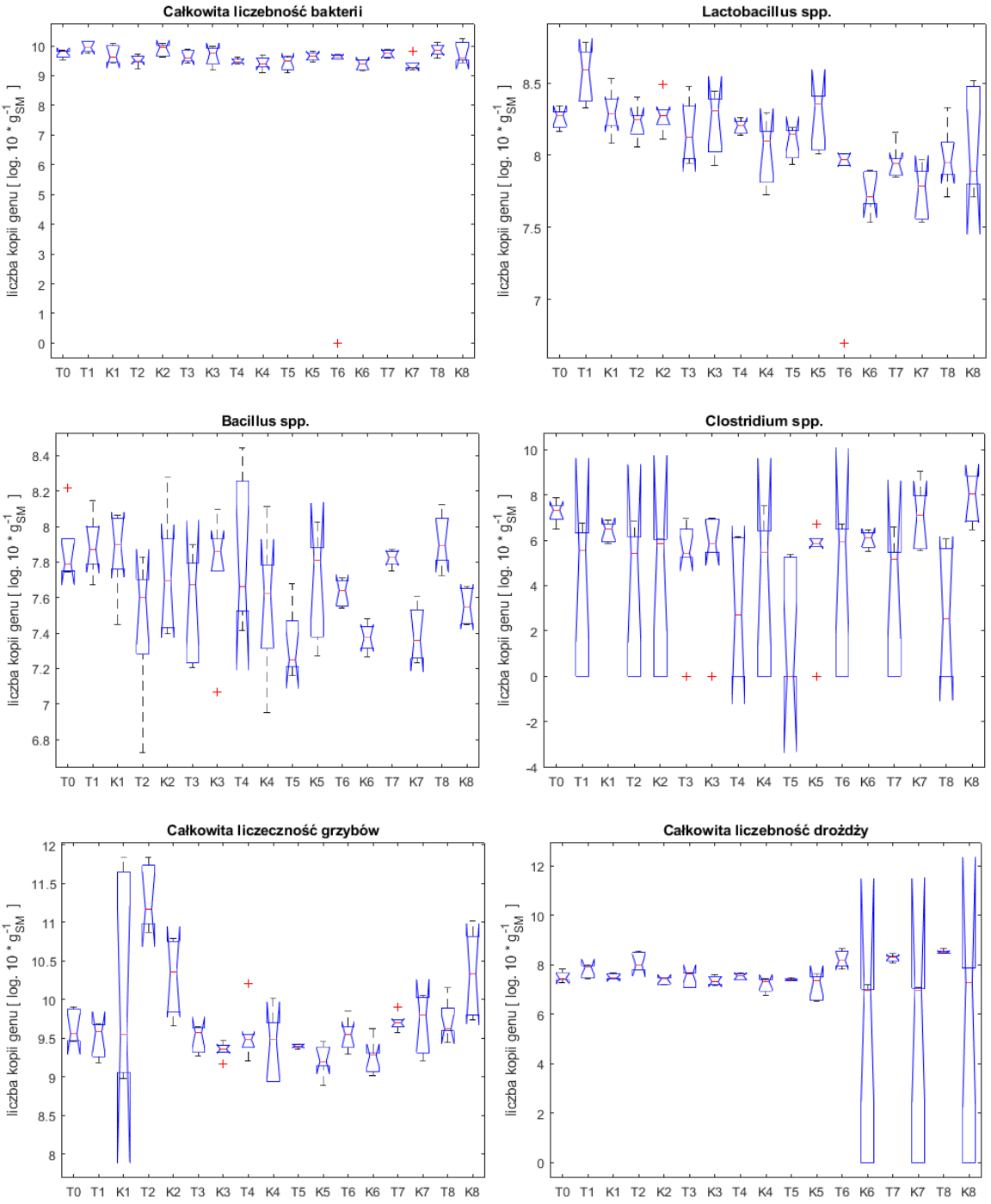
Wybrane grupy mikroorganizmów zasiedlających kiszonki doświadczalne zostały przedstawione w Tabeli 15. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wariantami niezależnie od rodzaju, ani dawki zastosowanego dodatku na całkowitą liczebność bakterii i ładunek *Bacillus* spp. ($P>0,05$). Najwyższą liczebnością *Lactobacillus* spp. charakteryzowała się kiszonka z 1,2% łuski bobiku w stosunku do kiszonek z 12,0%, 18,0% i 24,0% łuski bobiku, a także 12,0% i 18,0% słomy pszennej ($P\leq0,001$). Największe dysproporcje w kiszonkach zostały zaobserwowane dla liczebności *Clostridium* spp. (Wykres 8). Kiszonka z 24,0% słomy pszennej miała najwyższą liczebność *Clostridium* spp., jednak nie różniła się istotnie od grupy kontrolnej. Najniższy ładunek *Clostridium* spp. zarówno względem kiszonki kontrolnej, jak i pozostałych grup uzyskała kiszonka z 6,0% łuski bobiku. Porównywalnie niskie liczebności tego rodzaju odnotowano dla kiszonek z 2,4% i 24,0% łuski bobiku oraz 4,8% słomy pszennej. Całkowita liczebność grzybów była najwyższa w grupie z 2,4% łuski bobiku, zarówno względem określonych wariantów doświadczalnych, jak i grupy kontrolnej. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono najwyższy ładunek drożdży dla kiszonek z dodatkiem łuski bobiku na poziomie 1,2%, 2,4%, 12,0%, 18,0% i 24,0%.

Struktura mikrobiomu bakteryjnego kiszonek wskazywała na dużą różnorodność pomiędzy wariantami doświadczalnymi (Tabela 16). Wykazano, że najliczniejszym rodzajem był *Weissella*, będący eudominantem (>10%) w grupie kontrolnej, a także w kiszonkach z 1,2%, 2,4%, 3,6%, 4,8%, 6,0%, 18,0% łuski bobiku i 1,2%, 2,4%, 3,6%, 4,8%, 6,0%, 24,0% słomy pszennej. Do pozostałych eudominantów należały rodzaje *Lactiplantibacillus* (4,8%, 6,0% łuski bobiku), *Pantoea* (12,0%, 18,0% łuski bobiku; 6,0%, 12,0% słomy pszennej), *Loigolactobacillus* (grupa kontrolna) oraz *Klebsiella* (2,4% słomy pszennej). W grupie dominantów znalazły się rodzaje *Weissella* (12,0% łuski bobiku; 12,0%, 18,0% słomy pszennej), *Lactiplantibacillus* (grupa kontrolna; 1,2%, 3,6%, 18,0% łuski bobiku; 1,2%, 3,6%, 4,8% słomy pszennej), *Pantoea* (24,0% łuski bobiku), *Loigolactobacillus* (1,2%, 2,4%, 3,6%, 4,8%, 18,0% łuski bobiku; 1,2%, 3,6%, 18,0% słomy pszennej), *Klebsiella* (12,0%, 18,0%, 24,0% łuski bobiku; 6,0%, 12,0%, 18,0% słomy pszennej), *Latilactobacillus* (1,2%, 2,4% łuski bobiku; 6,0%, 24,0% słomy pszennej), *Escherichia* (12,0%, 18,0% łuska bobiku; 2,4%, 12,0% słomy pszennej), *Levilactobacillus* (18,0% łuski bobiku; 6,0% słomy pszennej), *Enterobacter* (2,4% słomy pszennej), *Pedicoccus* (4,8% słomy pszennej), *Lactococcus* (24,0% łuski bobiku).

Tabela 15. Liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej (log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM)

Wyszczególnienie	Całkowita liczebność bakterii	*Lactobacillus* spp.	*Bacillus* spp.	*Clostridium* spp.	Całkowita liczebność grzybów	Całkowita liczebność drożdży
Kiszonki						
Grupa kontrolna	9,740	8,260 ^{ab}	7,871	7,251 ^{ab}	9,637 ^{b}	7,513 ^{ab}
Lucerna z dodatkiem						
1,2% łuski bobiku	9,957	8,564 ^{a}	7,892	6,294 ^{ab}	9,494 ^{b}	7,782 ^{a}
1,2% słomy pszennej	9,698	8,295 ^{ab}	7,852	6,402 ^{ab}	10,11 ^{ab}	7,521 ^{ab}
2,4% łuski bobiku	9,509	8,229 ^{ab}	7,458	3,964 ^{bc}	11,30 ^{ab}	8,105 ^{a}
2,4% słomy pszennej	9,875	8,279 ^{ab}	7,738	5,948 ^{abc}	10,29 ^{ab}	7,374 ^{ab}
3,6% łuski bobiku	9,645	8,165 ^{ab}	7,580	4,935 ^{abc}	9,500 ^{b}	7,464 ^{ab}
3,6% słomy pszennej	9,661	8,235 ^{ab}	7,762	5,172 ^{abc}	9,347 ^{b}	7,354 ^{ab}
4,8% łuski bobiku	9,491	8,200 ^{ab}	7,827	4,424 ^{abc}	9,550 ^{b}	7,534 ^{ab}
4,8% słomy pszennej	9,413	8,031 ^{ab}	7,569	4,152 ^{bc}	9,427 ^{b}	7,197 ^{abc}
6,0% łuski bobiku	9,425	8,096 ^{ab}	7,337	2,662 ^{c}	9,397 ^{b}	7,405 ^{ab}
6,0% słomy pszennej	9,652	8,262 ^{ab}	7,697	5,048 ^{abc}	9,212 ^{b}	7,156 ^{abc}
12,0% łuski bobiku	8,040	7,764 ^{b}	7,630	6,257 ^{abc}	9,546 ^{b}	8,223 ^{a}
12,0% słomy pszennej	9,367	7,734 ^{b}	7,374	6,038 ^{abc}	9,260 ^{b}	5,465 ^{c}
18,0% łuski bobiku	9,736	7,955 ^{b}	7,820	5,627 ^{abc}	9,711 ^{b}	8,280 ^{a}
18,0% słomy pszennej	9,379	7,755 ^{b}	7,392	7,063 ^{ab}	9,699 ^{b}	5,450 ^{c}
24,0% łuski bobiku	9,859	7,983 ^{b}	7,916	4,178 ^{bc}	9,720 ^{b}	8,540 ^{a}
24,0% słomy pszennej	9,754	8,046 ^{ab}	7,551	7,851 ^{a}	10,34 ^{ab}	5,829 ^{bc}
SEM	0,100	0,052	0,046	0,319	0,122	0,215
$P_{\text{rodzaj dodatku}}$	ns	ns	ns	**	ns	***
$P_{\text{dawka dodatku}}$	ns	***	ns	***	***	ns
$P_{\text{rodzaj dodatku} \times \text{dawka dodatku}}$	ns	***	**	***	***	***
R^2	0,337	0,668	0,578	0,649	0,647	0,765

SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – c) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$.



Wykres 8. Wykres pudełkowy przedstawiający liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Kiszonki: T0 – grupa kontrolna, lucerna bez dodatku łuski bobiku lub słomy pszennej; T1 – lucerna z 1,2% łuski bobiku; K1 – lucerna z 1,2% słomy pszennej; T2 – lucerna z 2,4% łuski bobiku; K2 – lucerna z 2,4% słomy pszennej; T3 – lucerna z 3,6% łuski bobiku; K3 – lucerna z 3,6% słomy pszennej; T4 – lucerna z 4,8% łuski bobiku; K4 – lucerna z 4,8% słomy pszennej; T5 – lucerna z 6,0% łuski bobiku; K5 – lucerna z 6,0% słomy pszennej; T6 – lucerna z 12,0% łuski bobiku; K6 – lucerna z 12,0% słomy pszennej; T7 – lucerna z 18,0% łuski bobiku; K7 – lucerna z 18,0% słomy pszennej; T8 – lucerna z 24,0% łuski bobiku; K8 – lucerna z 24,0% słomy pszennej.

Tabela 16. Struktura mikrobiomu bakteryjnego zasiedlającego kiszonki z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej przedstawiona jako procentowy udział rodzajów w zbiorowości

Wyszczególnienie	T0	T1	K1	T2	K2	T3	K3	T4	K4	T5	K5	T6	K6	T7	K7	T8	K8
Weissella	41,61	43,41	44,97	38,70	25,44	46,06	40,66	40,63	41,12	40,34	14,62	7,20	7,03	10,20	6,47	4,44	50,37
Lactiplantibacillus	6,19	6,51	7,34	4,30	3,33	5,69	7,19	13,56	9,33	23,76	4,87	1,76	3,89	5,53	4,69	2,45	4,29
Pantoea	1,86	1,20	2,48	2,39	3,46	1,10	3,58	1,43	2,55	0,38	20,21	29,82	15,09	11,84	4,06	8,35	0,24
Loigolactobacillus	12,16	5,73	9,87	6,02	4,49	7,66	7,08	5,76	2,64	3,47	3,31	2,89	1,65	6,92	6,54	3,37	1,71
Klebsiella	0,55	0,87	2,11	2,91	10,29	1,20	2,92	2,39	2,68	0,40	6,69	8,81	8,58	8,07	9,27	5,89	0,26
Latilactobacillus	1,19	7,07	1,50	5,21	1,75	3,51	1,47	1,15	1,31	0,56	5,13	1,87	2,58	4,03	4,72	4,22	9,99
Escherichia	0,56	0,73	1,70	2,91	6,55	0,86	1,83	2,56	1,91	0,54	4,74	6,50	5,66	5,42	4,93	4,22	0,21
Levilactobacillus	3,26	1,37	1,15	0,72	0,49	1,73	0,65	2,52	1,14	3,18	6,37	2,14	1,59	6,06	4,54	3,74	2,79
Enterobacter	0,43	0,45	1,17	1,48	6,20	0,69	1,88	2,01	1,47	0,47	3,05	4,13	3,64	4,24	3,74	3,66	0,11
Pediococcus	1,42	2,79	2,17	2,34	2,07	2,66	2,88	2,25	6,57	1,77	0,91	1,00	1,24	0,84	0,90	0,77	1,93
Lactobacillus	4,86	4,11	2,11	4,44	2,30	2,92	2,42	1,31	2,86	1,99	0,32	0,31	0,28	0,69	0,31	0,53	1,19
Companilactobacillus	2,31	2,40	2,68	3,58	1,58	2,84	2,75	1,49	2,22	4,12	0,84	0,47	0,19	0,70	0,32	0,71	0,58
Lactococcus	0,16	2,29	0,26	0,81	0,48	0,32	0,34	0,14	1,00	0,16	1,56	2,03	7,31	2,58	4,06	5,83	0,41
Enterococcus	1,09	1,55	1,36	2,01	0,81	2,20	1,61	1,77	1,36	1,43	1,69	0,54	1,99	0,88	1,13	3,65	2,97
Bacillus	0,98	1,90	1,68	1,19	0,92	1,75	1,72	2,24	2,10	3,18	1,56	0,72	1,06	1,52	1,21	1,80	1,50
Salmonella	0,31	0,51	0,77	0,72	2,84	0,38	0,98	0,88	1,15	0,31	2,53	3,10	2,71	2,60	2,34	2,40	0,07
Stenotrophomonas	0,18	0,58	1,46	1,15	1,25	2,22	1,12	0,32	0,64	0,36	0,39	1,61	4,42	0,82	2,07	2,72	0,01
Lentilactobacillus	2,84	0,43	0,50	0,14	0,81	0,52	1,50	2,73	0,35	1,03	0,19	0,06	0,06	0,15	0,18	0,13	9,21
Leuconostoc	0,13	0,37	0,16	0,29	0,13	0,24	0,20	0,14	0,51	0,11	1,10	0,86	3,55	2,63	4,15	4,25	0,35
Serratia	0,10	0,33	0,46	0,24	2,10	0,23	0,47	0,26	0,39	0,00	1,69	2,13	1,65	2,04	2,85	2,58	0,03
Erwinia	0,10	0,28	0,05	1,24	2,40	0,18	0,15	0,16	0,40	0,00	3,18	2,99	0,78	0,76	0,59	0,49	0,07

Wskazane rodzaje <1%; przynajmniej 1 komórka; w tabeli naniesiono również kolory klas dominacji rodzajów bakterii zgodnie z przyjętą metodyką.

Tabela 16 ciąg dalszy. Struktura mikrobiomu bakteryjnego zasiedlającego kiszonki z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej przedstawiona jako procentowy udział rodzajów w zbiorowości

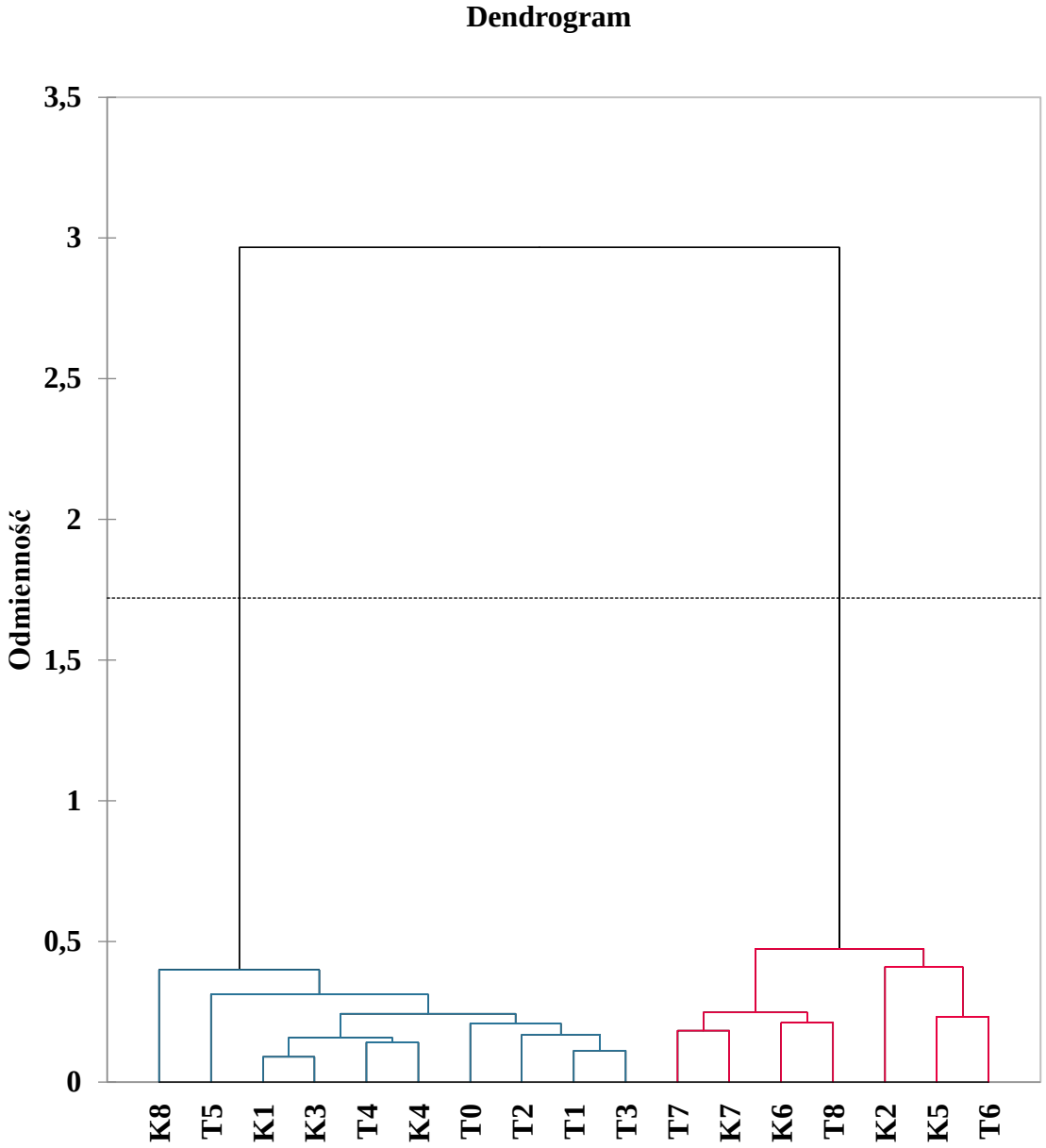
Wyszczególnienie	T0	T1	K1	T2	K2	T3	K3	T4	K4	T5	K5	T6	K6	T7	K7	T8	K8
Paucilactobacillus	1,33	1,15	0,76	1,39	0,62	1,10	0,85	0,63	0,62	0,69	0,06	0,16	0,44	0,28	1,09	0,39	1,19
Ligilactobacillus	2,15	1,50	0,32	0,67	0,43	0,23	1,09	0,21	0,52	0,67	0,26	0,04	0,06	0,15	0,07	0,07	3,35
Hafnia	0,00	0,03	0,00	0,00	0,05	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,19	0,37	2,55	1,64	2,68	4,09	0,00
Kluyvera	0,00	0,05	0,02	0,10	0,20	0,02	0,07	0,01	0,05	0,00	0,91	0,98	1,74	1,68	4,68	0,65	0,00
Synechococcus	2,10	0,84	1,26	0,96	0,47	0,99	0,93	0,39	0,44	0,45	0,00	0,19	0,68	0,06	0,20	0,72	0,40
Leclercia	0,08	0,24	0,19	0,38	2,63	0,10	0,46	0,32	0,32	0,04	0,58	0,87	1,15	0,91	1,10	0,98	0,03
Edwardsiella	0,01	0,27	0,22	0,33	1,01	0,13	0,32	0,32	0,36	0,09	0,71	1,06	0,56	1,00	1,13	1,10	0,02
Lacticaseibacillus	0,26	0,69	0,62	0,24	0,28	0,41	0,82	0,78	0,50	1,57	0,13	0,13	0,44	0,28	0,37	0,25	0,80
Staphylococcus	0,58	0,91	0,45	0,67	0,25	0,54	0,49	0,55	0,46	0,96	0,58	0,24	0,12	0,37	0,27	0,30	0,49
Proteus	0,07	0,17	0,14	0,29	0,54	0,09	0,25	0,10	0,11	0,04	0,45	0,99	1,09	1,16	0,91	1,29	0,01
Pectobacterium	0,05	0,18	0,15	0,38	0,74	0,06	0,20	0,11	0,15	0,09	0,65	0,80	1,21	0,79	0,72	1,31	0,01
Streptococcus	0,31	0,67	0,40	0,72	0,32	0,36	0,36	0,37	0,43	0,67	0,32	0,23	0,53	0,40	0,26	0,74	0,21
Yersinia	0,03	0,05	0,11	0,00	0,60	0,08	0,18	0,15	0,23	0,02	0,78	0,80	0,87	0,86	1,04	1,07	0,02
Raoultella	0,06	0,17	0,05	0,24	0,81	0,10	0,36	0,14	0,21	0,00	0,26	0,63	0,56	0,65	0,70	1,74	0,02
Neorhizobium	0,22	0,16	0,28	0,33	0,23	0,65	0,32	0,67	1,14	0,07	0,13	0,49	0,22	0,05	0,51	0,74	0,02
Vibrio	0,09	0,14	0,17	0,33	0,80	0,15	0,27	0,27	0,21	0,09	0,65	0,83	0,53	0,48	0,62	0,56	0,02
Citrobacter	0,06	0,09	0,18	0,67	0,76	0,06	0,20	0,31	0,17	0,02	0,52	0,54	0,40	0,54	0,57	0,53	0,03
Sphingomonas	0,02	0,18	0,00	0,05	0,04	0,10	0,04	0,24	0,05	0,04	0,06	0,32	0,81	0,20	1,80	1,40	0,01

Wskazane rodzaje <1%; przynajmniej 1 komórka; w tabeli naniesiono również kolory klas dominacji rodzajów bakterii zgodnie z przyjętą metodyką. Kiszonki: T0 – grupa kontrolna, lucerna bez dodatku łuski bobiku lub słomy pszennej; T1 – lucerna z 1,2% łuski bobiku; K1 – lucerna z 1,2% słomy pszennej; T2 – lucerna z 2,4% łuski bobiku; K2 – lucerna z 2,4% słomy pszennej; T3 – lucerna z 3,6% łuski bobiku; K3 – lucerna z 3,6% słomy pszennej; T4 – lucerna z 4,8% łuski bobiku; K4 – lucerna z 4,8% słomy pszennej; T5 – lucerna z 6,0% łuski bobiku; K5 – lucerna z 6,0% słomy pszennej; T6 – lucerna z 12,0% łuski bobiku; K6 – lucerna z 12,0% słomy pszennej; T7 – lucerna z 18,0% łuski bobiku; K7 – lucerna z 18,0% słomy pszennej; T8 – lucerna z 24,0% łuski bobiku; K8 – lucerna z 24,0% słomy pszennej.

Na podstawie zaprezentowanych wyników stwierdzono niższe udziały rodzaju *Weissella* w grupach o wyższej dawce łuski bobiku (12,0%, 18,0%, 24,0%). Spośród wyraźnych tendencji zaobserwowano większy udział rodzajów *Pantoea*, *Escherichia*, *Levilactobacillus*, *Enterobacter*, *Lactococcus*, *Salmonella*, *Leuconostoc* i *Serratia* w wariantach o wyższym poziomie łuski bobiku (12,0%, 18,0%, 24,0%).

Przeprowadzona analiza sekwencjonowania nanoporowego wykazała, że największym zróżnicowaniem charakteryzował się mikrobiom bakteryjny kiszonki z 24,0% łuski bobiku lub 2,4% i 18,0% słomy pszennej. W tych grupach odnotowano największą ilość rodzajów bakterii stanowiących powyżej 2,01% ogółu społeczności. W kiszonkach z 18,0% słomy pszennej i 24,0% łuski bobiku nie stwierdzono obecności żadnego rodzaju o charakterze eudominanta. Największe dysproporcje miały miejsce na poziomie dawki 24,0%, w tej grupie lucerna zakiszona z łuską bobiku charakteryzowała się bardzo zróżnicowanym mikrobiomem, dla którego jednak nie stwierdzono obecności rodzaju o charakterze eudominanta. Natomiast w wariancie z 24,0% słomy pszennej stwierdzono jedną z najniższych różnorodności na poziomie rodzaju bakterii zasiedlających kiszonkę, a rodzaj *Weissella* będący jedynym eudominantem stanowił powyżej 50%. W tej grupie doświadczalnej stwierdzono również obecność jednego dominanta, którym był rodzaj *Latilactobacillus*, a także cztery rodzaje subdominujące (*Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Enterococcus*, *Ligilactobacillus*).

Skonstruowanie dendrogramu AHC na podstawie macierzy Bray-Curtisa umożliwiło ustalenie odmienności struktury społeczności bakterii pomiędzy wariantami kiszonek doświadczalnych (Wykres 9). Zaobserwowano utworzenie dwóch wysoce odmiennych od siebie grup, o wysokim podobieństwie wewnątrzgrupowym. Do pierwszej grupy reprezentującej niższe poziomy dodatku należały warianty od 1,2% – 6,0% łuski bobiku oraz 1,2%, 3,6% i 4,8% słomy pszennej. Pozostałe kiszonki tworzyły drugą grupę o wyższych udziałach dodatków. Kiszonka kontrolna należała do grupy pierwszej, była zbieżna z grupami o niskich udziałach łuski bobiku lub słomy pszennej.



Wykres 9. Dendrogram AHC zróżnicowania mikrobiomu dla poszczególnych wariantów doświadczalnych kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej utworzony na podstawie charakterystyki mikrobiomu; linia odciętych i jednakowy kolor linii wskazuje na brak istotnego zróżnicowania w obrębie grup doświadczalnych

Kiszonki: T0 – grupa kontrolna, lucerna bez dodatku łuski bobiku lub słomy pszennej; T1 – lucerna z 1,2 % łuski bobiku; K1 – lucerna z 1,2 % słomy pszennej; T2 – lucerna z 2,4 % łuski bobiku; K2 – lucerna z 2,4 % słomy pszennej; T3 – lucerna z 3,6 % łuski bobiku; K3 – lucerna z 3,6 % słomy pszennej; T4 – lucerna z 4,8 % łuski bobiku; K4 – lucerna z 4,8 % słomy pszennej; T5 – lucerna z 6,0% łuski bobiku; K5 – lucerna z 6,0 % słomy pszennej; T6 – lucerna z 12,0 % łuski bobiku; K6 – lucerna z 12,0 % słomy pszennej; T7 – lucerna z 18,0 % łuski bobiku; K7 – lucerna z 18,0 % słomy pszennej; T8 – lucerna z 24,0 % łuski bobiku; K8 – lucerna z 24,0 % słomy pszennej.

6.3. Zadanie badawcze III

6.3.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek

W Tabeli 17 zamieszczono skład chemiczny i przydatność do zakiszania zielonek o różnym stopniu przewiędnięcia (0 h, 12 h, 24 h). Świeża lucerna (0 h) miała SM równą 232,3 g·kg^{-1} FM, po 12 h więdnięcia – 356,9 g·kg^{-1} FM, a po 24 h – 480,4 g·kg^{-1} FM. Wraz ze wzrostem SM zielonki zaobserwowano nieznaczny wzrost zawartości BO z 213,8 g (0 h) do 219,5 g (12 h) i 225,1 g·kg^{-1} SM (24 h). Zawartość TS, WS, NDF, ADF oraz ADL również wzrosła w skutek więdnięcia, a wartości L/NDF pomiędzy zielonkami były wyrównane. Więdnięcie wpłynęło na poprawę wskaźników przydatność do zakiszenia zielonki. Mimo, że obniżeniu uległa zawartość WSC z 72,81 g (0 h) do 67,31 g (12 h) i 57,93 g·kg^{-1} SM (dla 24 h) oraz pojemność buforowa z 69,71 g (0 h) do 63,18 g (12 h) i 58,09 g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM (24h), wartość wskaźnika FC wzrosła z 31,59 dla lucerny świeżej (0 h) do 44,21 i 56,02 dla zielonki po 12 h i 24 h więdnięcia.

Skład chemiczny kiszonek różnił się istotnie dla wszystkich cech za wyjątkiem BO (Tabela 18). Dodatek suchego lodu nie wpłynął na skład chemiczny i frakcje cukrowców kiszonek (P>0,05). Wartość współczynnika R^2 dla BO była najniższa, co dodatkowo potwierdziło brak wpływu efektu więdnięcia i/lub dodatku suchego lodu. Zawartość WS w kiszonkach była różna statystycznie (P≤0,001), jednak nie zaobserwowano tendencji liniowej. W wartościach frakcji NDF, ADF i ADL stwierdzono istotny wpływ przewiędnięcia surowca oraz obu czynników doświadczalnych (P≤0,001), co potwierdzono wysokimi wartościami współczynnika R^2 (0,966, 0,939, 0,973, odpowiednio). W grupie kiszonek z lucerny 0 h zawartość NDF była wyrównana, a także jednocześnie najniższa względem pozostałych prób, a grupa kiszonek z lucerny 12 h uzyskała wartości najwyższe dla wariantu z 2 g suchego lodu. Znaczny udział frakcji ADF stwierdzono w kiszonce z lucerny 12 h, natomiast w kiszonce tej grupy z dodatkiem 2 g suchego lodu odnotowano wynik najwyższy. Kiszonki z lucerny 12 h i 24 h uzyskały istotnie wyższą koncentrację ADL w porównaniu do kiszonki z lucerny 0 h (P≤0,001). Rozkład frakcji cukrów strukturalnych w kiszonkach pomimo różnic statystycznych był zbliżony do wartości podanych dla zielonek przed zakiszeniem (Tabela 17). Wartość L/NDF była wyższa (P≤0,001) w kiszonkach z lucerny 12 h i 24 h, w porównaniu do kiszonek 0 h. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że resztkowa zawartość WSC w kiszonkach była uwarunkowana wpływem więdnięcia i wspólnym efektem więdnięcia oraz dodatkiem suchego lodu (P≤0,001) (Tabela 18).

Tabela 17. Skład chemiczny i przydatność do zakiszania zielonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia

Wyszczególnienie	Zielonki		
	Lucerna przewiędnięta 0 h	Lucerna przewiędnięta 12 h	Lucerna przewiędnięta 24 h
Sucha masa, g·kg^{-1} świeżej masy	232,3	356,9	480,4
Skład chemiczny, g·kg^{-1} SM			
Popiół surowy	92,11	85,48	91,22
Białko ogólne	213,8	219,5	225,1
Tłuszcz surowy	12,14	17,53	17,56
Włókno surowe	117,9	219,5	226,3
NDF	310,9	337,7	362,6
ADF	173,9	263,2	275,6
ADL	34,57	60,68	62,85
L/NDF	0,160	0,180	0,170
Przydatność do zakiszania			
WSC, g·kg^{-1} SM	72,81	67,31	57,93
BC, g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM	69,71	63,18	58,09
WSC/BC	1,050	1,070	0,997
FC	31,59	44,21	56,02

SM – sucha masa; NDF – włókno neutralno-detergentowe; ADF – włókno kwaśno-detergentowe; ADL – lignina kwaśno-detergentowa; L/NDF – stosunek ligniny do NDF; WSC – węglowodany rozpuszczalne w wodzie; BC – pojemność buforowa; WSC/BC – stosunek węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie do pojemności buforowej; FC – współczynnik fermentacji wg Weissbach, Auerbach (2013).

Tabela 18. Skład chemiczny kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

Wyszczególnienie		Skład chemiczny, g·kg^{-1} SM									
		Sucha masa	Popiół surowy	Białko ogólne	Tłuszcz surowy	Włókno surowe	NDF	ADF	ADL	L/NDF	WSC
stopień przewiędnięcia	dodatek suchego lodu										
0 h	0 g	229,9 ^{c}	99,50 ^{b}	225,8	32,21 ^{ab}	201,6 ^{e}	294,1 ^{d}	259,9 ^{e}	31,39 ^{c}	0,107 ^{b}	9,126 ^{e}
	0,5 g	229,7 ^{c}	103,2 ^{ab}	225,0	33,62 ^{a}	201,7 ^{e}	291,3 ^{d}	266,8 ^{de}	29,97 ^{c}	0,103 ^{b}	9,073 ^{e}
	1 g	230,8 ^{c}	103,6 ^{ab}	225,0	25,98 ^{cd}	178,4 ^{f}	289,3 ^{d}	253,3 ^{e}	29,79 ^{c}	0,103 ^{b}	10,69 ^{e}
	2 g	231,1 ^{c}	103,2 ^{ab}	231,9	27,08 ^{bc}	182,5 ^{f}	286,4 ^{d}	253,9 ^{e}	24,40 ^{c}	0,085 ^{b}	9,989 ^{e}
12 h	0 g	351,4 ^{b}	108,2 ^{a}	221,7	22,07 ^{cdef}	249,2 ^{bc}	364,8 ^{abc}	305,0 ^{bc}	57,10 ^{ab}	0,156 ^{a}	5,543 ^{f}
	0,5 g	334,6 ^{b}	102,5 ^{ab}	222,1	24,54 ^{cd}	239,5 ^{c}	356,5 ^{bc}	302,9 ^{bc}	57,50 ^{ab}	0,161 ^{a}	4,929 ^{f}
	1 g	337,5 ^{b}	102,1 ^{ab}	215,9	18,77 ^{ef}	261,9 ^{ab}	374,2 ^{ab}	310,0 ^{b}	61,30 ^{a}	0,164 ^{a}	19,43 ^{d}
	2 g	350,7 ^{b}	102,7 ^{ab}	218,1	23,22 ^{cde}	266,3 ^{a}	380,9 ^{a}	332,5 ^{a}	62,44 ^{a}	0,164 ^{a}	18,30 ^{d}
24 h	0 g	460,8 ^{a}	104,2 ^{ab}	224,8	17,30 ^{f}	225,0 ^{d}	349,5 ^{c}	285,1 ^{cd}	52,63 ^{b}	0,151 ^{a}	29,61 ^{c}
	0,5 g	467,5 ^{a}	98,90 ^{b}	224,2	17,46 ^{f}	244,8 ^{c}	356,9 ^{bc}	296,9 ^{bc}	60,23 ^{ab}	0,169 ^{a}	47,40 ^{a}
	1 g	473,6 ^{a}	99,10 ^{b}	222,7	17,65 ^{ef}	260,9 ^{ab}	368,9 ^{abc}	301,2 ^{bc}	58,02 ^{ab}	0,157 ^{a}	46,44 ^{ab}
	2 g	474,1 ^{a}	99,70 ^{b}	224,9	21,36 ^{def}	239,6 ^{c}	361,3 ^{abc}	289,9 ^{bc}	56,73 ^{ab}	0,157 ^{a}	44,81 ^{b}
SEM		28,17	0,738	1,115	1,529	8,586	10,32	6,898	4,077	0,008	4,570
P $_{\text{suchy lód}}$		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P $_{\text{przewiędnięcie}}$		***	*	ns	***	***	***	***	***	***	***
P $_{\text{suchy lód × przewiędnięcie}}$		***	**	ns	***	***	***	***	***	***	***
R^2		0,992	0,622	0,284	0,920	0,985	0,966	0,939	0,973	0,948	0,999

SM – sucha masa; NDF – włókno neutralno-detergentowe; ADF – włókno kwaśno-detergentowe; ADL – lignina kwaśno-detergentowa; L/NDF – stosunek ligniny do NDF; WSC – węglowodany rozpuszczalne w wodzie; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych (P > 0,05); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – f) nie różnią się istotnie na poziomie
P ≤ 0,05; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.

Wybrane parametry fermentacji zostały przedstawione w Tabeli 19. Kwas mlekowy, stanowił powyżej 90% sumy kwasów w kiszonkach z lucerny 0 h (91 – 94%) i 24 h (94 – 95%), a w grupie kiszonek z lucerny 12 h stanowił 76 – 83%. Zawartość kwasu mlekowego była różna zarówno dla efektu więdnięcia (P≤0,001), jak i efektu obu czynników (P≤0,001). Najwyższą liczbowo koncentrację kwasu mlekowego stwierdzono w kiszonkach z lucerny 0 h (86,69 – 96,43 $g \cdot kg^{-1}$ SM). Drugim co do ilości był kwas octowy, którego zawartość była istotnie różna między wariantami doświadczalnymi (P≤0,001), obejmując zakres od 0,86 do 8,80 $g \cdot kg^{-1}$ SM. W grupie kiszonek z lucerny 0 h, warianty z 1 g i 2 g suchego lodu charakteryzowały się istotnie niższą koncentracją tego kwasu, porównywalną z grupą kiszonek z lucerny 12 h niezależnie od dawki suchego lodu. W kiszonkach z lucerny 24 h ilość powstałego kwasu octowego była najniższa, podobnie jak w przypadku kwasu mlekowego. Poziom dodatku suchego lodu nie wpłynął na koncentracje omawianych kwasów (P>0,05).

Różnice w ilości kwasu propionowego między wariantami wynikały z efektu więdnięcia (P≤0,001), a także wpływu obu czynników (P≤0,001). Grupy kiszonek z lucerny 12 h i 24 h nie różniły się statystycznie zawartością kwasu, a analizowane wartości były najniższe. W kiszonkach z lucerny 0 h zawartości kwasu były wyższe ponad dwukrotnie względem kiszonek 12 h i ponad ośmiokrotnie w stosunku do kiszonek z lucerny 24 h (P≤0,001).

Kwas masłowy charakteryzował się najniższą koncentracją wśród oznaczonych kwasów, którego obecność stwierdzono we wszystkich analizowanych wariantach doświadczalnych, na poziomie 0,02 g do 1,53 $g \cdot kg^{-1}$ SM. Zawartość kwasu masłowego nie była uwarunkowana stopniem przewiędnięcia, ani dodatkiem suchego lodu (P>0,05).

Proces więdnięcia miał potwierdzony statystycznie wpływ na sumę LKT, podobnie jak efekt obu czynników doświadczalnych (P≤0,001) (Tabela 19). Znaczne dysproporcje stwierdzono także w stosunku kwasu mlekowego do kwasu octowego (P≤0,001), na które nie miał wpływu poziom dawki suchego lodu, a jedynie proces więdnięcia i efekt obu czynników doświadczalnych (P≤0,001). Nie zaobserwowano zależności liniowej w obrębie grup na danym poziomie więdnięcia przed zakiszeniem. Najwyższą wartość stosunku kwasu mlekowego do kwasu octowego odnotowano w kiszonce 24 h z 2 g suchego lodu (21,28), zbieżny z wartością wariantu po 12 h więdnięcia z 0,5 g suchego lodu (20,28). Najniższe wartości dla omawianego wskaźnika stwierdzono na poziomie 4,32 w kiszonce z lucerny 24 h z dodatkiem 1 g suchego lodu.

Tabela 19. Wybrane parametry fermentacji kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

Wyszczególnienie		Produkty fermentacji, g·kg^{-1} SM								
		pH	N-NH_3, g·kg^{-1} $N_{ogólny}$	Kwas mlekowy	Kwas octowy	Kwas propionowy	Kwas masłowy	LKT	Kwas mlekowy : kwas octowy	Etanol
stopień przewiędnięcia	dodatek suchego lodu									
0 h	0 g	4,58 ^{bc}	105,6 ^{abc}	91,12 ^{a}	7,323 ^{b}	0,360 ^{abc}	0,067	7,793 ^{a}	12,45 ^{b}	0,000
	0,5 g	4,71 ^{b}	103,8 ^{abc}	90,00 ^{a}	8,797 ^{a}	0,484 ^{a}	0,033	9,343 ^{a}	10,23 ^{b}	0,181
	1 g	4,74 ^{b}	90,15 ^{bcd}	86,69 ^{a}	6,700 ^{bc}	0,382 ^{ab}	0,387	7,510 ^{a}	12,94 ^{b}	0,753
	2 g	4,45 ^{c}	74,84 ^{cde}	96,43 ^{a}	5,947 ^{c}	0,276 ^{abcd}	0,048	6,312 ^{a}	16,21 ^{b}	0,070
12 h	0 g	5,14 ^{a}	134,0 ^{a}	37,55 ^{b}	6,472 ^{bc}	0,202 ^{bcd}	1,368	8,058 ^{a}	5,802 ^{c}	0,880
	0,5 g	5,11 ^{a}	120,8 ^{ab}	30,15 ^{bc}	6,323 ^{c}	0,130 ^{cd}	0,941	7,412 ^{a}	4,768 ^{c}	0,405
	1 g	5,16 ^{a}	129,5 ^{a}	36,66 ^{b}	6,330 ^{c}	0,140 ^{bcd}	1,098	7,594 ^{a}	5,791 ^{c}	0,242
	2 g	5,25 ^{a}	113,7 ^{ab}	24,62 ^{bcd}	5,739 ^{c}	0,209 ^{bcd}	1,532	7,516 ^{a}	4,290 ^{c}	1,308
24 h	0 g	5,16 ^{a}	46,67 ^{e}	16,74 ^{cd}	1,120 ^{d}	0,033 ^{d}	0,015	1,186 ^{b}	14,95 ^{b}	1,151
	0,5 g	5,25 ^{a}	50,09 ^{e}	17,03 ^{cd}	0,862 ^{d}	0,037 ^{d}	0,015	0,952 ^{b}	19,76 ^{ab}	2,574
	1 g	5,23 ^{a}	57,28 ^{de}	14,55 ^{d}	1,108 ^{d}	0,061 ^{d}	0,015	1,249 ^{b}	13,13 ^{bc}	0,203
	2 g	5,10 ^{a}	46,10 ^{e}	26,12 ^{bcd}	1,227 ^{d}	0,052 ^{d}	0,018	1,375 ^{b}	21,28 ^{a}	0,000
SEM		0,079	9,181	9,165	0,795	0,042	0,165	0,904	1,611	0,208
$P_{suchy\ lód}$		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
$P_{przewiędnięcie}$		***	***	***	***	***	ns	***	***	ns
$P_{suchy\ lód \times przewiędnięcie}$		***	***	***	***	***	ns	***	***	ns
R^2		0,939	0,921	0,986	0,990	0,813	0,618	0,546	0,608	0,138

SM – sucha masa; N-NH_3 – azot amoniakalnym, g·kg^{-1} $N_{ogólny}$; $N_{ogólny}$ – azot ogólny; LKT – suma lotnych kwasów tłuszczowych tj. kwasu octowego, propionowego, izomasłowego, masłowego, izowalerianowego, walerianowego; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych (P > 0,05); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – e) nie różnią się istotnie na poziomie P ≤ 0,05; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.

Kwasowość kiszonek wynosiła od 4,45 (kiszonka z lucerny 0 h z dodatkiem 2 g suchego lodu) do 5,25 (kiszonka z lucerny 12 h z dodatkiem 2 g suchego lodu; kiszonka z lucerny 24 h z dodatkiem 0,5 g suchego lodu). Wartość pH kiszonek z surowca przewiędniętego przez 12 h i 24 h była wyrównana i nie zależna od dawki suchego lodu. Niższe wartości pH uzyskały kiszonki z lucerny 0 h ($P \leq 0,001$). W przeprowadzonej analizie statystycznej nie stwierdzono wpływu żadnego z czynników doświadczalnych ani samodzielnie, ani jako efektu wspólnego ($P > 0,05$) na zawartość etanolu.

Nie stwierdzono wpływu dodatku suchego lodu na różnice w ilości $N\text{-}NH_3$ ($P > 0,05$), a jedynie wpływ więdnięcia ($P \leq 0,001$) i efekt obu czynników doświadczalnych ($P \leq 0,001$) (Tabela 19). Najwyższą koncentracją $N\text{-}NH_3$ charakteryzowała się grupa kiszonek z lucerny przewiędniętej przez 12 h (113,7 – 134,0 $g \cdot kg^{-1}$ $N_{ogólny}$). Istotnie niższe wartości określono w grupie kiszonek z lucerny 0 h (74,84 – 105,6 $g \cdot kg^{-1}$ $N_{ogólny}$). Kiszonki z lucerny 24 h uzyskały wartości najniższe $N\text{-}NH_3$ (46,10 – 57,28 $g \cdot kg^{-1}$ $N_{ogólny}$).

6.3.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek

W składzie BO zielonek największy udział miała frakcja TP (Tabela 20), która zmniejszała się wraz ze wzrostem SM. W świeżej lucernie (0 h) bezpośrednio po ścięciu frakcja ta stanowiła 79,04% BO, a po 12 h więdnięcia 26,70% frakcji TP zostało zdegradowane, natomiast po 24 h zostało zdegradowane 43,74% TP. Drugą co do ilości była frakcja SCP, dla której zaobserwowano tendencję odwrotną, gdyż wraz z wydłużającym się czasem więdnięcia jej udział wzrastał z poziomu wartości 4,63% BO (0 h) do 11,92% BO (12 h) i 28,35% BO (24 h). W pierwszych 12 h więdnięcia wzrost był wolniejszy (o 7,29 pkt. %) niż w następnych 12 h (o 16,4 pkt. %). Podobnie wraz ze wzrostem SM wzrosła zawartość frakcji NDICP oraz ADICP.

Stwierdzono wpływ poziomu dodatku suchego lodu jedynie na zawartość TP ($P \leq 0,01$). Najwyższą koncentrację TP uzyskano w kiszonkach z lucerny po 24 h więdnięcia ($P \leq 0,001$). W każdej grupie kiszonek niezależnie od stopnia przewiędnięcia dodatek 1 g oraz 2 g suchego lodu istotnie wpłynął na wzrost koncentracji TP względem prób z dawką 0 g i 0,5 g suchego lodu. Kiszonki z lucerny 0 h uzyskały najniższe zawartości TP, było to 24,01 – 32,55% BO. Wraz ze wzrostem SM i ilości dodatku suchego lodu koncentracja TP w kiszonkach doświadczalnych zwiększała się, natomiast zawartość frakcji SCP malała ($P \leq 0,001$). W kiszonce z lucerny 0 h odnotowano prawie 10-krotny wzrost SCP po zakiszeniu. Najmniej frakcji SCP stwierdzono w kiszonkach z lucerny 24 h, niezależnie od zastosowanej dawki suchego lodu.

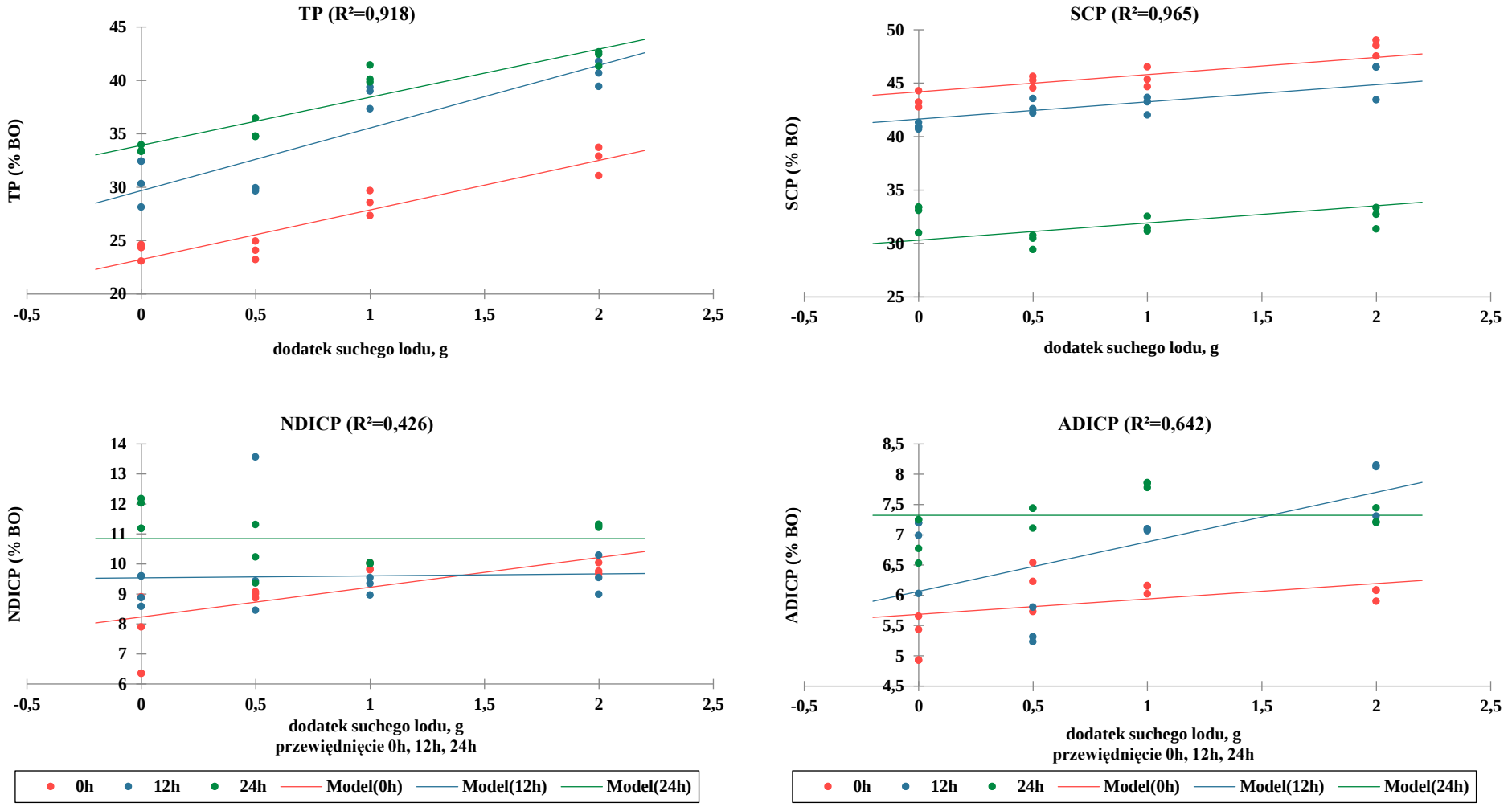
Tabela 20. Frakcje białkowe zielonek i kiszonek lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

Wyszczególnienie		Frakcje białkowe, % białka ogólnego			
		Białko właściwe	Białko rozpuszczalne w buforze	Białko nierozpuszczalne w neutralnym detergencie	Białko nierozpuszczalne w kwaśnym detergencie
Zielonki					
przewiędnięcie 0h		79,04	4,63	3,80	1,29
przewiędnięcie 12h		57,93	11,92	6,68	2,69
przewiędnięcie 24h		44,47	28,35	13,38	6,87
Kiszonki					
stopień przewiędnięcia	dodatek suchego lodu				
0 h	0 g	24,01 ^{f}	43,41 ^{bcd}	7,71 ^{b}	5,34 ^{e}
	0,5 g	24,08 ^{f}	45,14 ^{bc}	8,98 ^{ab}	6,17 ^{cde}
	1 g	28,53 ^{e}	45,50 ^{b}	9,89 ^{ab}	6,11 ^{de}
	2 g	32,55 ^{cd}	48,36 ^{a}	9,82 ^{ab}	6,02 ^{de}
12 h	0 g	30,29 ^{de}	40,97 ^{d}	9,02 ^{ab}	6,74 ^{bcd}
	0,5 g	29,80 ^{de}	42,78 ^{cd}	10,48 ^{ab}	5,45 ^{e}
	1 g	38,55 ^{b}	42,97 ^{bcd}	9,28 ^{ab}	7,08 ^{abc}
	2 g	40,62 ^{ab}	45,32 ^{bc}	9,60 ^{ab}	7,86 ^{a}
24 h	0 g	33,55 ^{c}	32,48 ^{e}	11,79 ^{a}	6,85 ^{bcd}
	0,5 g	35,33 ^{c}	30,21 ^{e}	10,30 ^{ab}	7,33 ^{ab}
	1 g	40,45 ^{ab}	31,71 ^{e}	10,02 ^{ab}	7,83 ^{a}
	2 g	42,14 ^{a}	32,47 ^{e}	11,27 ^{a}	7,29 ^{ab}
SEM		1,729	1,790	0,298	0,236
$P_{\text{suchy lód}}$		**	ns	ns	ns
$P_{\text{przewiędnięcie}}$		***	***	**	***
$P_{\text{suchy lód} \times \text{przewiędnięcie}}$		***	***	**	***

SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – f) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.

Dodatek suchego lodu nie wpłynął na zawartość frakcji NDCIP i ADICP podczas zakiszania ($P>0,05$). Zarówno dla frakcji NDICP ($P\leq0,01$), jak i ADICP ($P\leq0,001$) zaobserwowano tendencję wzrostową wraz ze wzrostem SM kiszonek. Kiszonki z grupy 24 h charakteryzowały się najmniejszym wzrostem ADICP podczas fermentacji.

Na podstawie regresji liniowej analizy kowariancji dla frakcji BO kiszonek (Wykres 10), wykazano liniowy wzrost TP wraz ze wzrostem SM, a także zwiększającym się udziałem suchego lodu. Wartość współczynnika R^2 wynosiła 0,918, co potwierdziło wpływ suchego lodu na ograniczenie proteolizy i poprawę jakości BO kiszonek. Dla grupy kiszonek doświadczalnych 24 h więdnięcia linia ciągła odznaczała się najlepszym dopasowaniem do rzeczywiście uzyskanych wyników w stosunku do pozostałych grup.



Wykres 10. Regresja liniowa analizy kowariancji dla frakcji białkowych kiszonek lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

Rozkład linii ciągłych dla wartości frakcji SCP w grupie kiszonek z lucerny 0 h i 12 h był do siebie bardziej zbliżony niż z grupą kiszonek z lucerny 24 h. Dłuższy czas więdnięcia skuteczniej zmniejszył ilość SCP. Więdnięcie wywierało istotny, lecz średni wpływ na uzyskane wyniki frakcji NDICP (R^2 = 0,426). Największe dysproporcje w zawartości ADICP zaobserwowano w grupie kiszonki z lucerny 12 h, na co wskazywało ułożenie punktów na wykresie odpowiadających uzyskanym wynikom. Najmniejsze rozbieżności w ilości ADICP zaobserwowano w grupie kiszonki z lucerny 24 h.

Ocena jakości BO zielonek w systemie CNCPS v 6.5 na podstawie analizowanych frakcji białkowych (Tabela 21) wykazała wzrost frakcji PA1, PA2, PB2 i PC podczas więdnięcia. Natomiast koncentracja frakcji PB1 uległa obniżeniu. W składzie BO zielonek dominowała frakcja PB1, stanowiąc 91,57% BO, 57,86% BO i 47,68% BO odpowiednio dla czasu więdnięcia 0 h, 12 h i 24 h. Drugą co do ilości w zielonkach z lucerny była frakcja PA2.

Udział frakcji rozpuszczalnych PA1 i PA2 w kiszonkach nie był zależny od dodatku suchego lodu, a istotne różnice wynikały z wpływu więdnięcia oraz wspólnego efektu czynników doświadczalnych (P≤0,001) (Tabela 21). Najwyższe wartości PA1 stwierdzono w grupie kiszonki z lucerny po 12 h więdnięcia, natomiast najniższe uzyskano w grupie kiszonek z lucerny 24 h. Dla BO frakcji PA2 zaobserwowano tendencję spadkową wraz z wydłużającym się czasem więdnięcia, niezależnie od dawki suchego lodu. W próbach kiszonek z lucerny 12 h i 24 h stwierdzono zbliżone udziały, poza wariantem 24 h z dodatkiem 2 g suchego lodu, w którym stwierdzono najniższą wartość tej frakcji. Wzrost PA2 w stosunku do zielonki był najwyższy w kiszonkach z lucerny 0 h. Proces więdnięcia wpłynął istotnie na wzrost frakcji PB1, dla którego najwyższe wyniki stwierdzono w grupie kiszonek z lucerny 24 h (P≤0,001). W odniesieniu do koncentracji frakcji PB2 stwierdzono istotną interakcję obu czynników. Ponadto wpływ czynników był bardzo niski, o czym świadczył współczynnik R^2 (0,102). Czynnik więdnięcia miał istotny wpływ na wyniki rzeczywiste uzyskane dla frakcji PC (R^2 = 0,642). W pierwszej grupie kiszonek z lucerny 0 h wszystkie warianty dodatku suchego lodu miały wartości zbieżne, nie istotne statystycznie. Najwyższy wzrost frakcji PC odnotowano w kiszonkach z lucerny 12 h z dawką 1 g i 2 g suchego lodu, gdzie uzyskane wartości były porównywalne z kiszonkami z grupy 24 h z dodatkiem 0,5 g, 1 g i 2 g suchego lodu.

Tabela 21. Frakcje białkowe zielonek i kiszonek lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu według CNCPS v 6.5

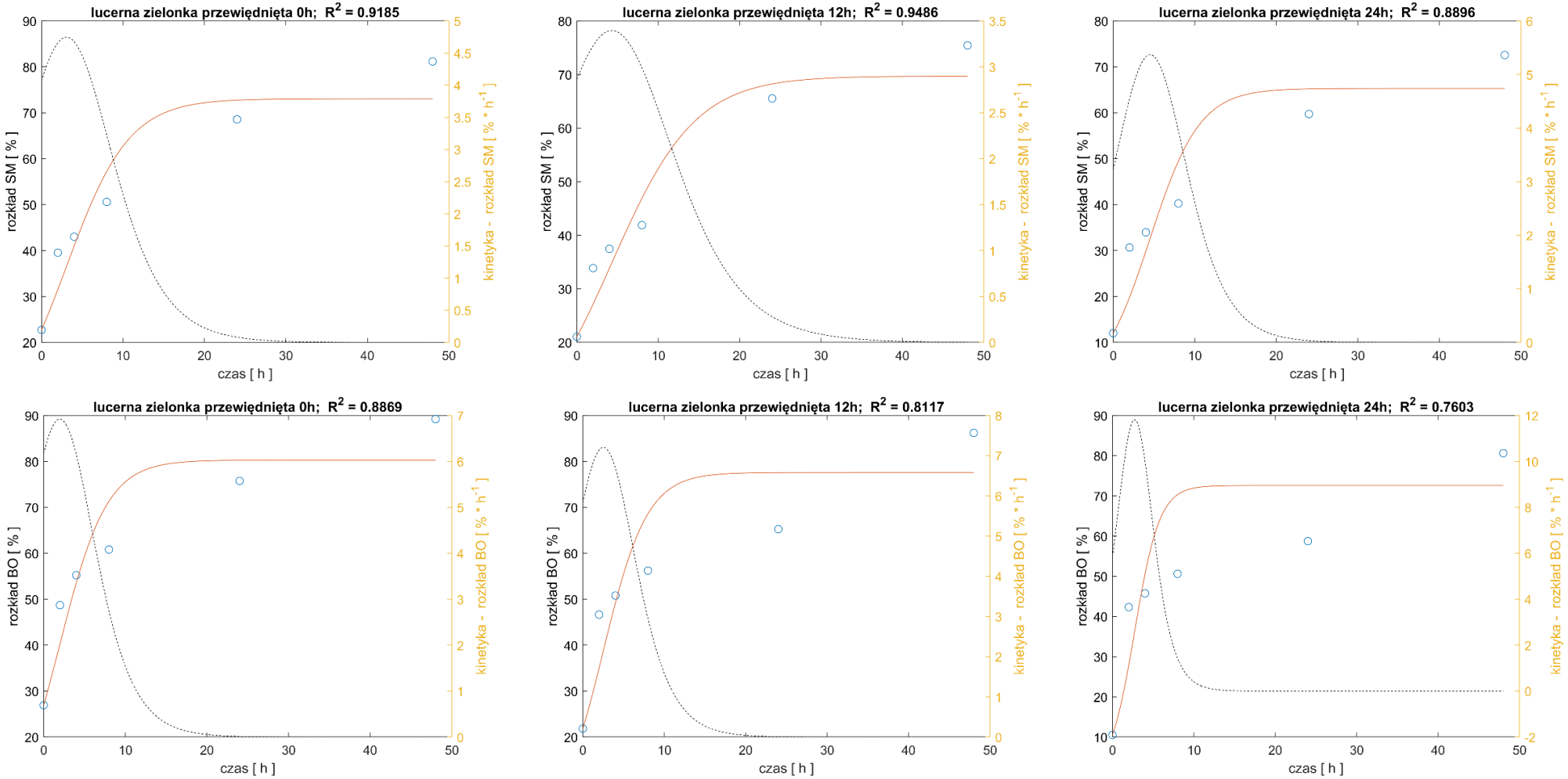
Wyszczególnienie		Frakcje białkowe wg CNCPS v 6.5, % białka ogólnego				
		PA1	PA2	PB1	PB2	PC
Zielonki						
przewiędnięcie 0h		0,43	31,62	64,15	2,51	1,29
przewiędnięcie 12h		0,58	34,88	57,86	3,99	2,69
przewiędnięcie 24h		0,72	38,23	47,68	6,50	6,87
Kiszonki						
stopień przewiędnięcia	dodatek suchego lodu					
0 h	0 g	10,56 ^{abc}	59,80 ^{a}	21,92 ^{bcd}	2,38 ^{ab}	5,34 ^{e}
	0,5 g	10,38 ^{abc}	61,81 ^{a}	18,83 ^{cd}	2,81 ^{ab}	6,17 ^{cde}
	1 g	9,02 ^{bcd}	59,06 ^{a}	22,03 ^{bcd}	3,78 ^{ab}	6,11 ^{de}
	2 g	7,48 ^{cde}	59,70 ^{a}	23,00 ^{bcd}	3,80 ^{ab}	6,02 ^{de}
12 h	0 g	13,40 ^{a}	47,35 ^{b}	30,23 ^{ab}	2,28 ^{ab}	6,74 ^{bcd}
	0,5 g	12,08 ^{ab}	45,74 ^{b}	31,70 ^{ab}	5,03 ^{a}	5,45 ^{e}
	1 g	12,95 ^{a}	48,09 ^{b}	29,68 ^{abc}	2,20 ^{ab}	7,08 ^{abc}
	2 g	11,37 ^{ab}	46,91 ^{b}	32,12 ^{ab}	1,74 ^{b}	7,86 ^{a}
24 h	0 g	4,67 ^{e}	43,13 ^{bc}	40,40 ^{a}	4,95 ^{a}	6,85 ^{bcd}
	0,5 g	5,01 ^{e}	43,23 ^{bc}	41,45 ^{a}	2,98 ^{ab}	7,33 ^{ab}
	1 g	5,73 ^{de}	45,15 ^{bc}	39,10 ^{a}	2,19 ^{ab}	7,83 ^{a}
	2 g	4,61 ^{e}	40,38 ^{c}	43,74 ^{a}	3,98 ^{ab}	7,29 ^{ab}
SEM		9,181	2,140	2,206	0,307	0,236
$P_{\text{suchy lód}}$		ns	ns	ns	ns	ns
$P_{\text{przewiędnięcie}}$		***	***	***	ns	***
$P_{\text{suchy lód} \times \text{przewiędnięcie}}$		***	***	***	**	***
R^2		0,921	0,939	0,846	0,102	0,642

PA1 – azot amoniakalny; PA2 – białko rozpuszczalne w buforze; PB1 – białko nierozpuszczalne w buforze; PB2 – białko związane z włóknem; PC – białko niestrawne; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a – e) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.

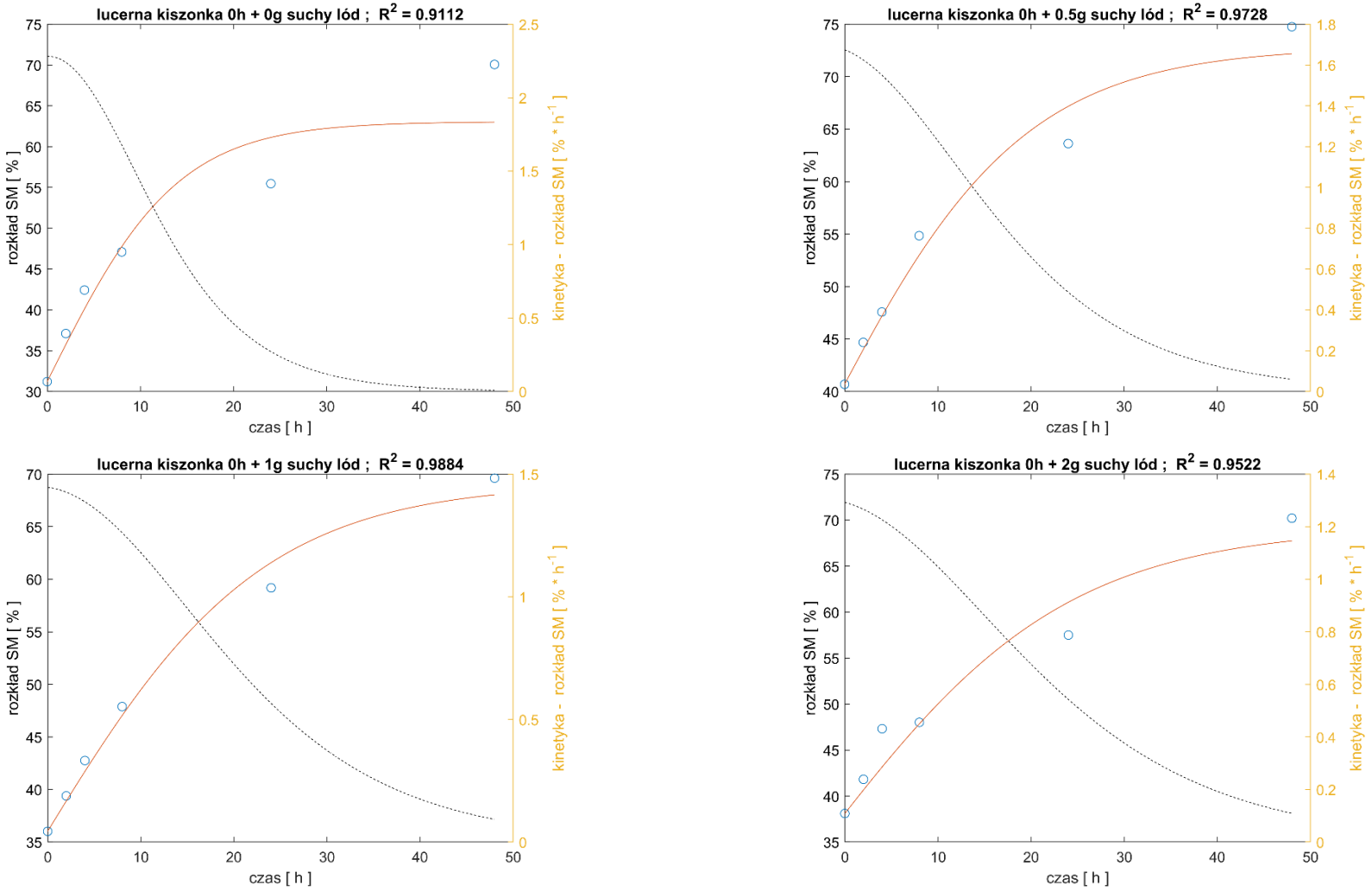
6.3.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek

Dla rozkładalności żwaczowej SM *in vitro* zielonek z lucerny zaobserwowano tendencję malejącą wraz ze wzrostem stopnia przewiędnięcia (Wykres 11). Zielonka z lucerny 0 h charakteryzowała się najwyższą ilością SM rozłożonej w każdym przedziale czasowym. Dla zielonek po 12 h i 24 h więdnięcia zaobserwowano największe różnice w ilości rozłożonej SM. Natomiast obie zielonki 12 h i 24 h miały skrajnie odmienne tempa rozkładu SM. Zielonka z lucerny po 12 h więdnięcia uzyskała najniższe tempo rozkładu SM *in vitro*, a zielonka z lucerny 24 h charakteryzowała się najwyższym tempem rozkładu SM *in vitro*. Jednak po 48 h inkubacji najwyższą ilość zdegradowanej SM stwierdzono w zielonce nieprzewiędniętej (0 h).

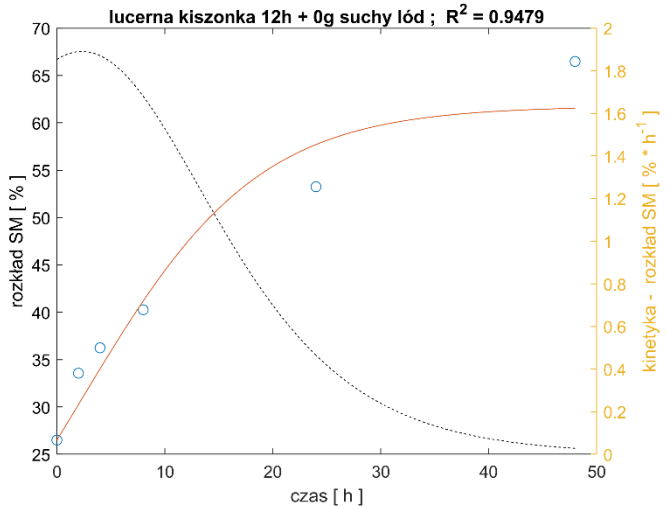
Zakiszenie lucerny wpłynęło na wzrost ilości SM rozłożonej *in vitro* jedynie dla czasu 0 h dla kiszonek niezależnie od stopnia przewiędnięcia i poziomu dodatku suchego lodu (Wykres 12). W porównaniu do zielonek mniejszą ilość rozłożonej SM *in vitro* wykazano po 24 h i 48 h inkubacji dla wszystkich kiszonek niezależnie od zawartość SM i dodatku suchego lodu. W pozostałych czasookresach degradacja SM kiszonek była porównywalna do zielonek. Na poziomie tego samego stopnia przewiędnięcia lucerny w grupie 0 h, warianty z dodatkiem 0,5 g, 1 g i 2 g suchego lodu charakteryzowały się wyższą ilością zdegradowanej żwaczowo SM w porównaniu z grupą kontrolną (0 g suchego lodu) do 24 h inkubacji. W grupie tej tempo rozkładu wraz ze wzrostem dodatku suchego lodu malało. W grupie kiszonek z lucerny po 12 h więdnięcia warianty z dodatkiem 0,5 g, 1 g i 2 g suchego lodu wyróżniały się wyższą ilością rozłożonej *in vitro* SM dla czasu inkubacji 0 h, 2 h i 4 h w porównaniu z grupą kontrolną (dodatek 0 g suchego lodu). W kolejnych czasookresach w kiszonkach z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu stwierdzono wyższy rozkład SM, a kiszonki z dodatkiem 2 g suchego lodu charakteryzowały się podobną ilością zdegradowanej SM do wariantów bez dodatku suchego lodu. W grupie kiszonek z lucerny po 12 h więdnięcia, grupa kontrolna (0 g suchego lodu) uzyskała najwyższe tempo rozkładu, a warianty z dodatkiem suchego lodu charakteryzowały się porównywalnymi wartościami. Ostatnia grupa kiszonek sporządzonych z lucerny po 24 h więdnięcia uzyskała niższą rozkładalność SM *in vitro* po zastosowaniu 0,5 g, 1 g oraz 2 g suchego lodu w pierwszych 4 h inkubacji względem grupy kontrolnej z dodatkiem 0 g suchego lodu. W 8 h i 24 h inkubacji próby wariantu z dodatkiem 1 g suchego lodu wyróżniały się wyższą ilości rozłożonej SM.

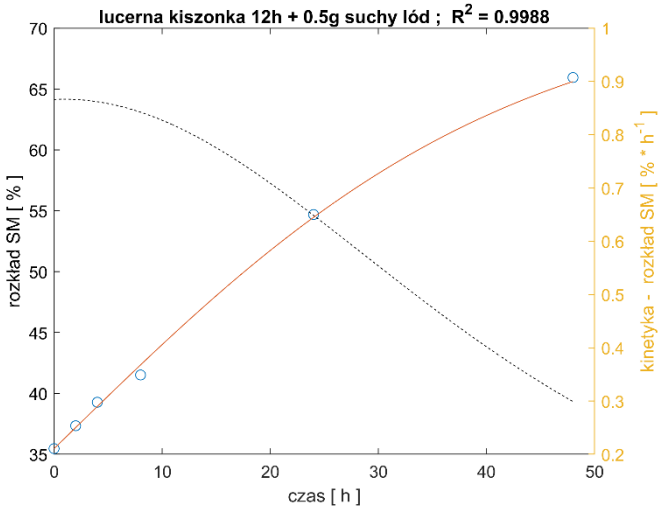


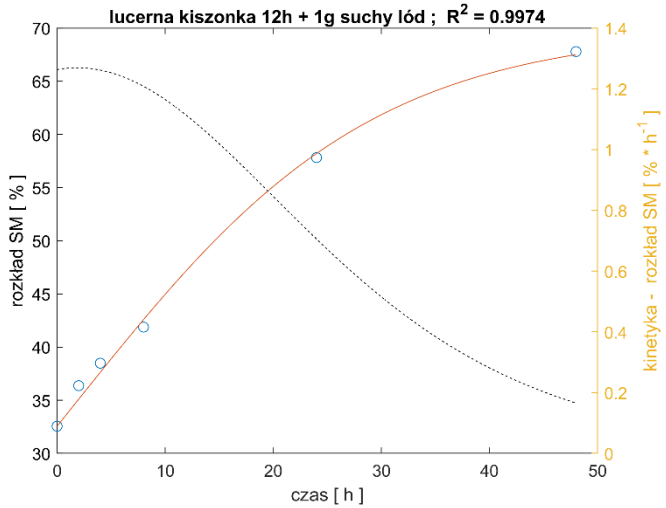
Wykres 11. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy i białka ogólnego zielonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia
*SM – sucha masa; BO – białka ogólne; R^2 – współczynnik determinacji.

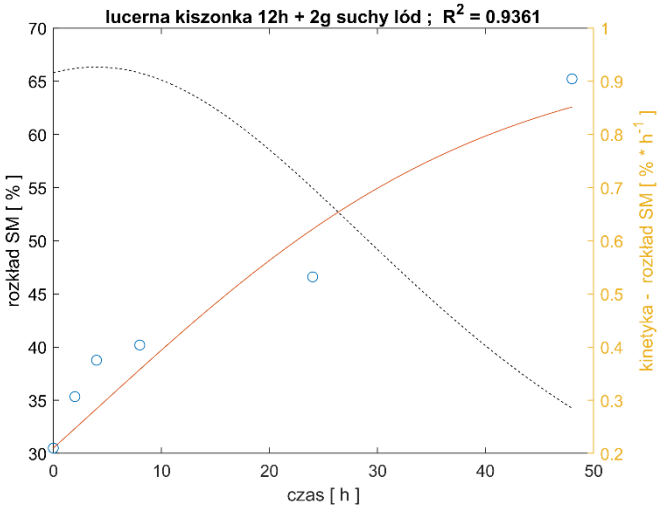


Wykres 12. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

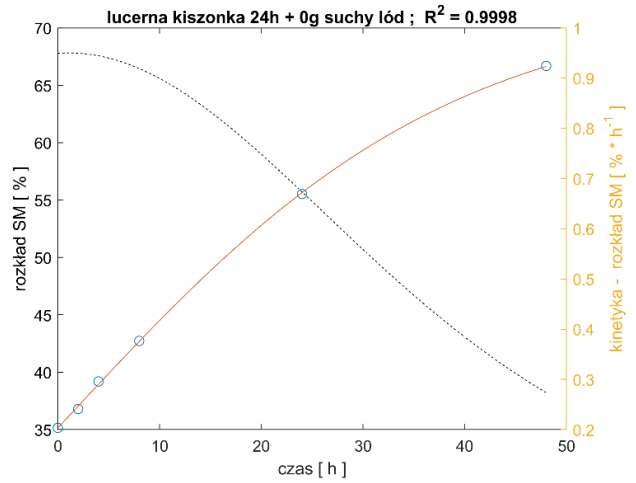


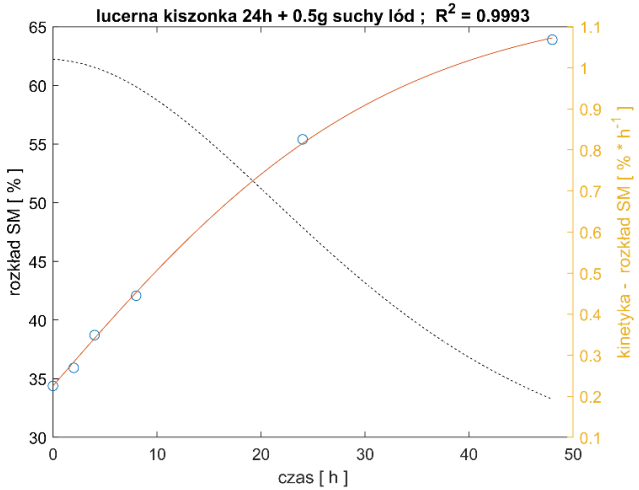


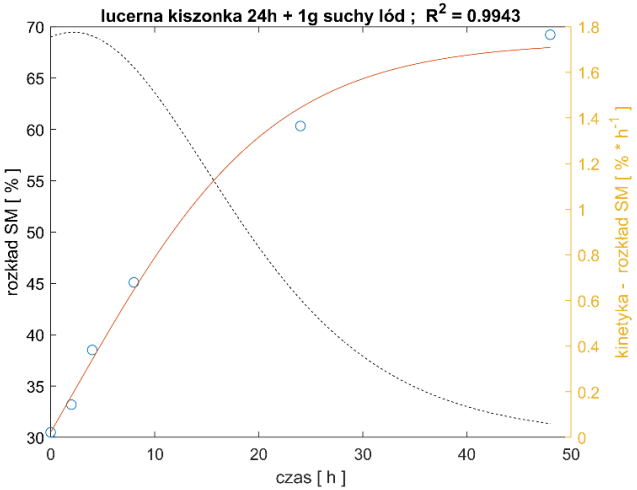


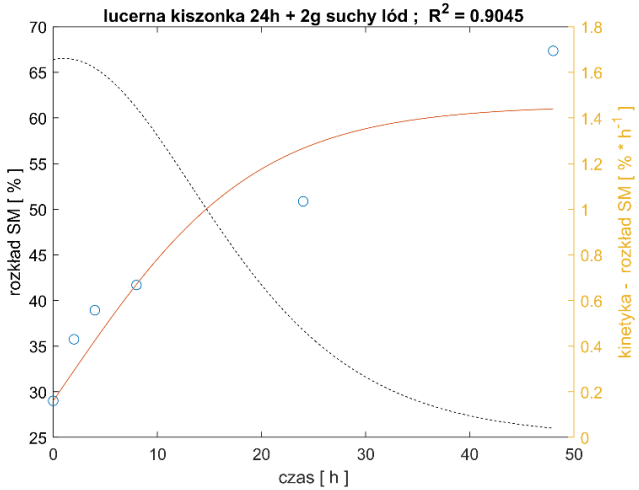


Wykres 12 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu









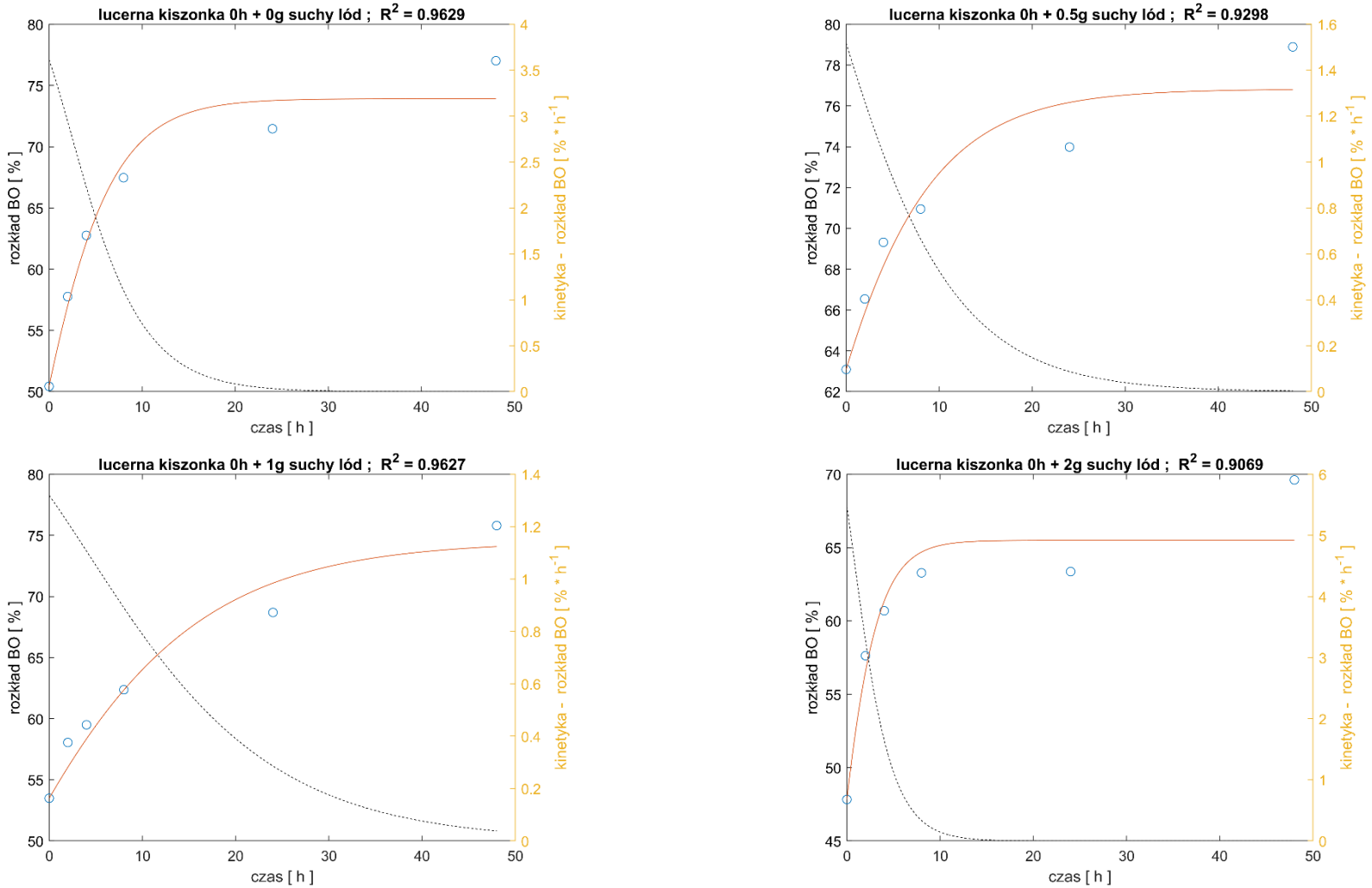
Wykres 12 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu suchej masy kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

*SM – sucha masa; R^2 – współczynnik determinacji.

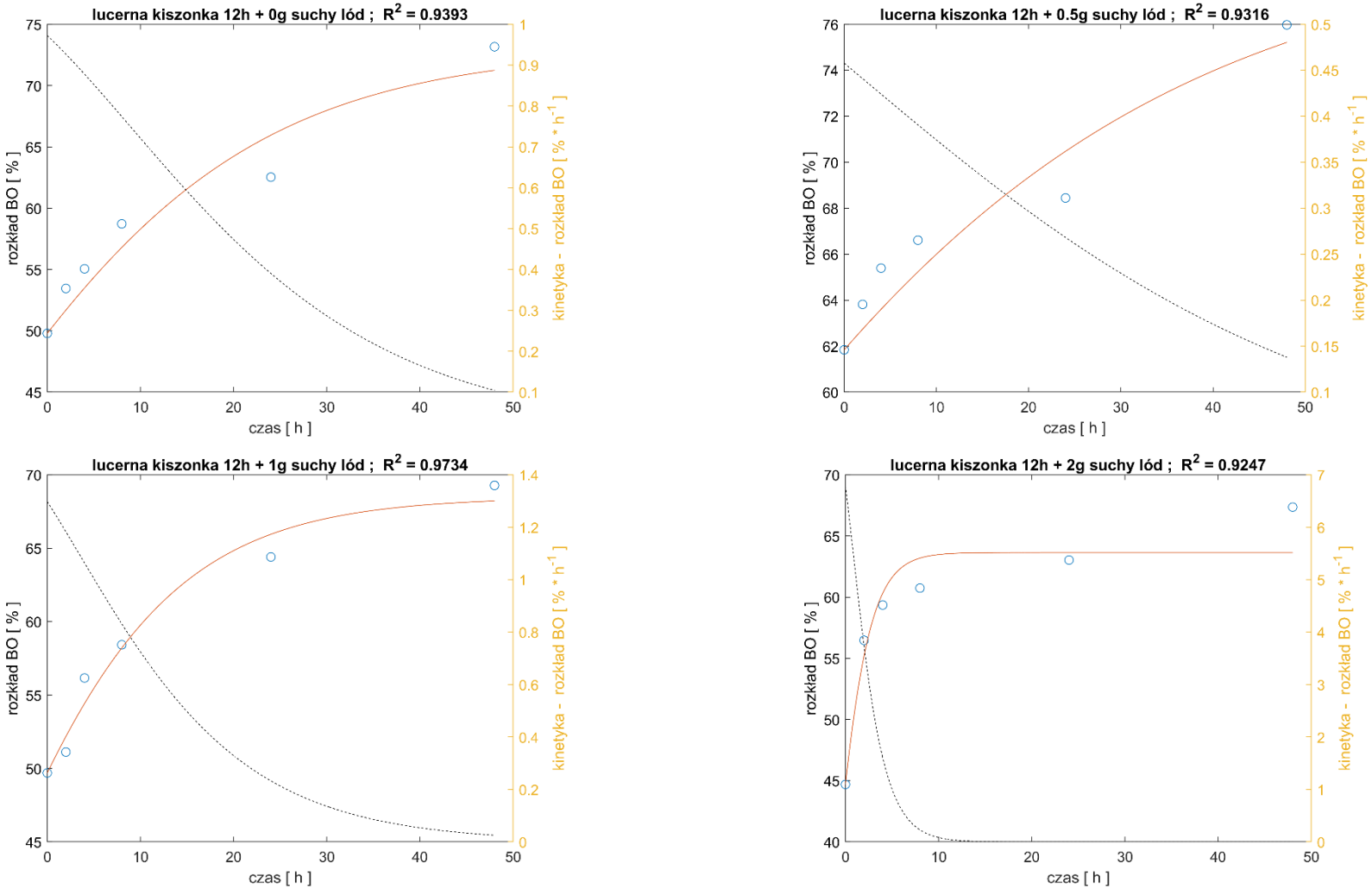
Po 48 h inkubowania kiszonek, warianty doświadczalne z dodatkiem 1 g i 2 g suchego lodu miały porównywalne i najwyższe ilości rozłożonej *in vitro* SM, a najniższe wartości stwierdzono w grupie z dodatkiem 0,5 g suchego lodu. Tempo rozkładu dla kiszonek z lucerny po 24 h więdnięcia z dodatkiem 0 g i 0,5 g suchego lodu było zbliżone. Wyższym tempem rozkładu do wspominanych wariantów odznaczały się kiszonki z dodatkiem 1 g i 2 g suchego lodu, które również były zbieżne ze sobą.

Rozkładalność żwaczowa *in vitro* BO zielonek wraz ze wzrostem SM obniżała się, niezależnie od godziny inkubacji (Wykres 11). Największe dysproporcje stwierdzono między zielonką po 12 h więdnięcia, a zielonką po 24 h więdnięcia w pierwszych 8 h i następnie w 48 h inkubacji. Na podstawie przyjętego modelu kinetyki rozkładu BO wykazano, że 12 h więdnięcia zielonki z lucerny nie wpłynęło na zmiany w tempie degradacji, a przewiędnięcie do 24 h skutkowało wyższym tempem rozkładu (Tabela 22).

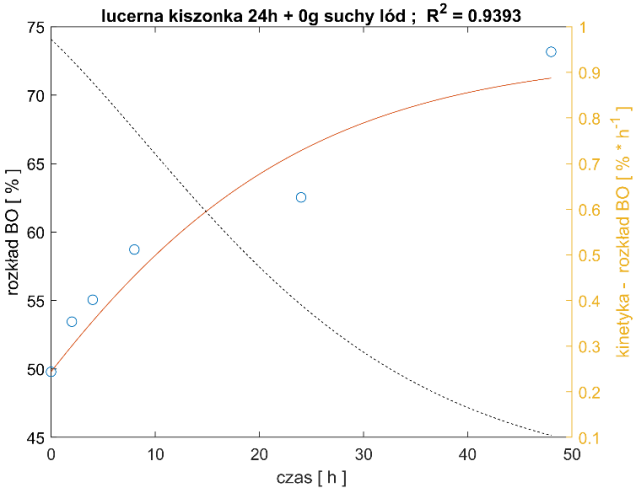
Kiszonki nie zależnie od stopnia więdnięcia i dodatku suchego lodu charakteryzowały się znacznie wyższą ilością rozłożonego *in vitro* BO w czasie 0 h inkubacji (Wykres 13), wartości te uplasowały się na poziomie powyżej 47,00% BO dla grupy kiszonek po 0 h więdnięcia, powyżej 44,00% BO dla grupy kiszonek sporządzonych z lucerny po 12 h więdnięcia i powyżej 35,00% BO dla grupy kiszonek z lucerny po 24 h więdnięcia. Najniższe wartości w czasie 0 h inkubacji zanotowano dla wariantów z dodatkiem 2 g suchego lodu, niezależnie od zawartości SM kiszonek. W kiszonce z lucerny 0 h więdnięcia z dodatkiem 2 g suchego lodu stwierdzono niższą ilością rozłożonego BO w czasie od 4 h do 48 h inkubacji. Tendencja ta nie została zaobserwowana w kiszonkach sporządzonych z lucerny po 12 h więdnięcia, w tej grupie stwierdzono niższą rozkładalność BO dla wariantu z dodatkiem 2 g suchego lodu tylko w czasie pierwszych 2 h inkubacji. Inne wyniki uzyskano w kiszonkach sporządzonych z lucerny po 24 h więdnięcia, gdzie dodatek 1 g i/lub 2 g suchego lodu wpłynął na niższą rozkładalność *in vitro* BO w całym okresie inkubacji. Najniższą rozkładalnością końcową BO odznaczały się kiszonki z lucerny po 12 h i 24 h więdnięcia względem kiszonek z lucerny nieprzwiędniętej (0 h) i zielonek z lucerny (0 h, 12 h, 24 h). Na podstawie stałej wzrostu (r) (Tabela 22) niezależnie od stopnia przewiędnięcia najwyższym tempem rozkładu BO charakteryzowały się kiszonki z dodatkiem 2 g suchego lodu. W grupie kiszonek z lucerny po 12 h i 24 h więdnięcia z dodatkiem 0 g suchego lodu miały zbliżone tempo rozkładu BO, które nie zmieniło się pod wpływem dodatku 0,5 g suchego lodu, a większe różnice można było zaobserwować przy zastosowaniu 1 g i/lub 2 g suchego lodu.

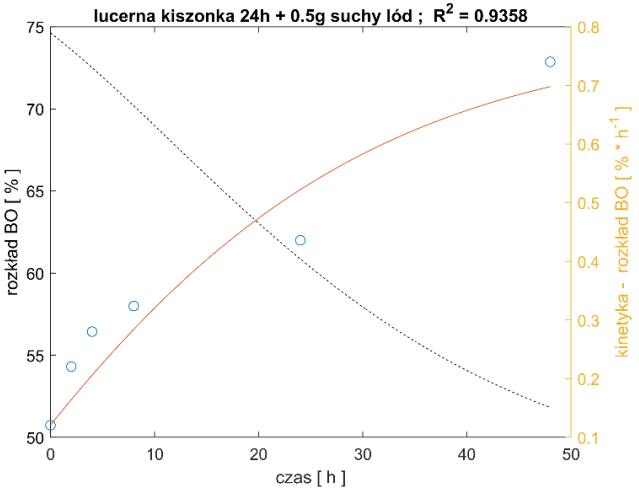


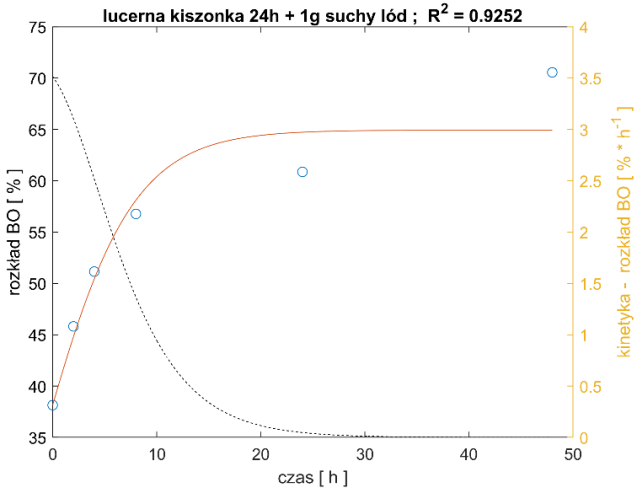
Wykres 13. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu białka ogólnego kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

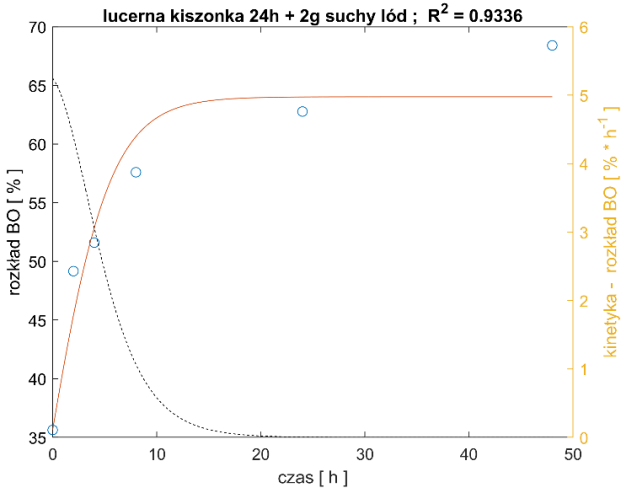


Wykres 13 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu białka ogólnego kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu









Wykres 13 ciąg dalszy. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* i kinetyka rozkładu białka ogólnego kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

BO – białka ogólne; R^2 – współczynnik determinacji.

Tabela 22. Parametry modelu kinetyki rozkładu suchej masy i białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

Wyszczególnienie	Sucha masa		Białko ogólne	
	r	K	r	K
Zielonki				
Przewiędnięcie 0 h	0,253	73,07	0,345	80,30
Przewiędnięcie 12 h	0,195	69,71	0,372	77,60
Przewiędnięcie 24 h	0,329	65,31	0,651	72,58
Kiszonki				
Lucerna przewiędnięta 0 h + 0 g suchy lód	0,145	63,07	0,226	73,92
Lucerna przewiędnięta 0 h + 0,5 g suchy lód	0,093	72,83	0,135	76,83
Lucerna przewiędnięta 0 h + 1 g suchy lód	0,084	69,16	0,087	74,52
Lucerna przewiędnięta 0 h + 2 g suchy lód	0,076	69,22	0,425	65,49
Lucerna przewiędnięta 12 h + 0 g suchy lód	0,122	61,77	0,062	72,98
Lucerna przewiędnięta 12 h + 0,5 g suchy lód	0,048	72,54	0,033	79,62
Lucerna przewiędnięta 12 h + 1 g suchy lód	0,073	69,86	0,095	68,49
Lucerna przewiędnięta 12 h + 2 g suchy lód	0,054	68,31	0,510	63,64
Lucerna przewiędnięta 24 h + 0 g suchy lód	0,052	72,28	0,062	72,98
Lucerna przewiędnięta 24 h + 0,5 g suchy lód	0,061	67,40	0,049	74,60
Lucerna przewiędnięta 24 h + 1 g suchy lód	0,104	68,56	0,223	64,94
Lucerna przewiędnięta 24 h + 2 g suchy lód	0,108	61,38	0,332	64,03

r – stała wzrostu ($1 \cdot h^{-1}$); K – stałe w modelu.

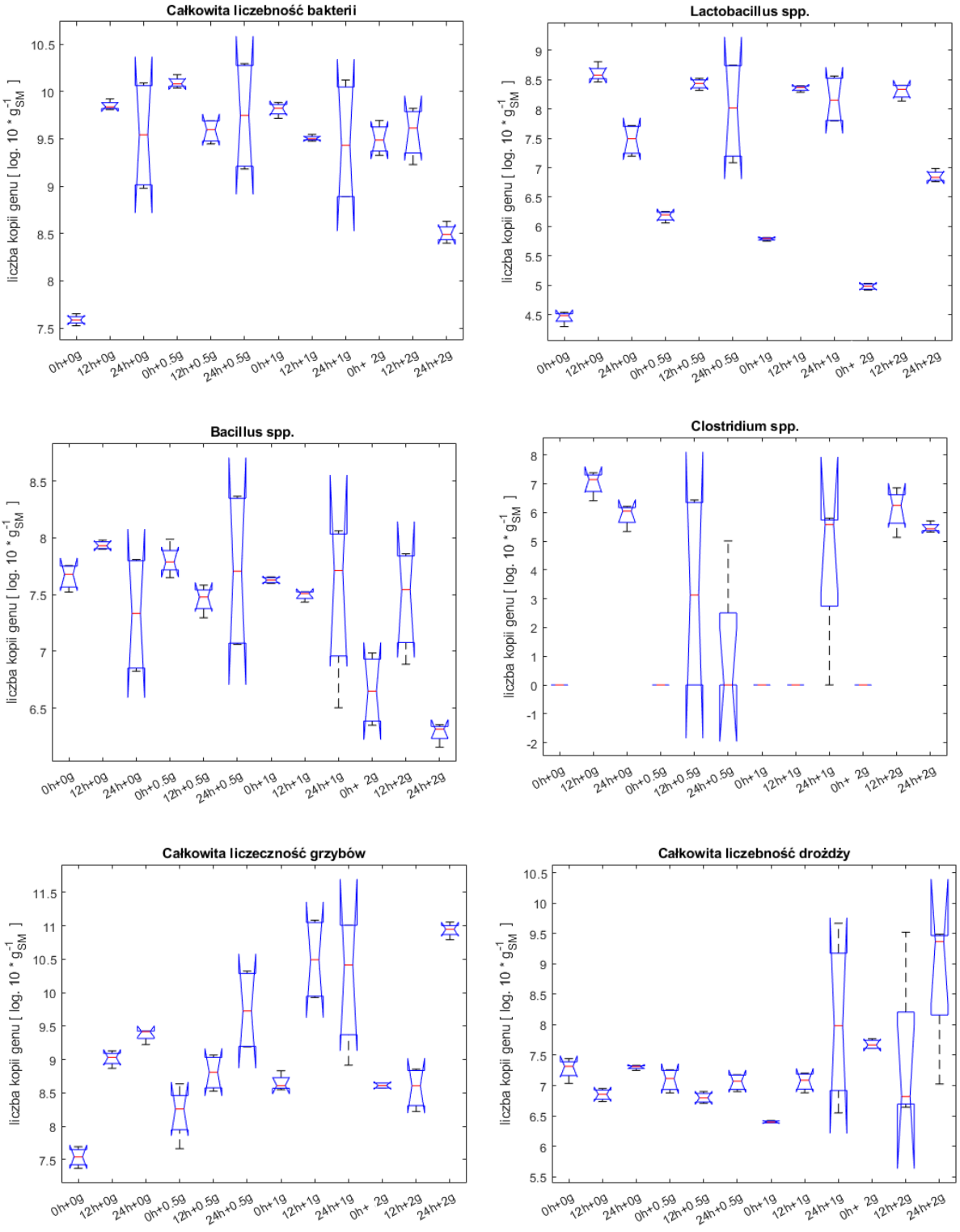
6.3.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych

W Tabeli 23 zamieszczono liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że dodatek suchego lodu wpłynął istotnie na całkowitą liczebność bakterii, grzybów ($P \leq 0,01$) oraz drożdży ($P \leq 0,05$), a także *Bacillus* spp. ($P \leq 0,001$) i *Clostridium* spp. ($P \leq 0,05$). Nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowania dodatku suchego lodu na liczebność bakterii *Lactobacillus* spp. ($P > 0,05$). Drugi czynnik doświadczalny, mianowicie stopień przewiędnięcia wpłynął istotnie na całkowitą liczebność grzybów, *Latocbacillus* spp. i *Clostridium* spp. ($P \leq 0,001$). Najwyższą liczebność całkowitą bakterii uzyskano w kiszonkach z lucerny 0 h więdnięcia z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu, w grupie kiszonek z lucerny 12 h w wariancie z dodatkiem 0 g i 2 g suchego lodu, a w grupie kiszonek z lucerny 24 h były to warianty z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu. Wraz ze wzrostem dodatku suchego lodu całkowity liczba bakterii nie zmieniała się (Wykres 14). Najwyższą liczebność *Lactobacillus* spp. odnotowano w grupie kiszonek z lucerny po 12 h więdnięcia niezależnie od dawki suchego lodu, jak i w wariancie kiszonek z lucerny 24 h z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu. Najniższą liczebnością bakterii rodzaju *Lactobacillus* charakteryzowały się warianty kiszonki z lucerny 0 h z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu. W liczebności bakterii *Bacillus* spp. zaobserwowano, że warianty kiszonki z lucerny po 0 h i 24 h więdnięcia z dodatkiem 2 g suchego lodu uzyskały najniższe wartości, potwierdzone statystycznie ($P \leq 0,001$). W kiszonkach sporządzonych z lucerny 0 h, niezależnie od dawki suchego lodu, jak i również w kiszonkach z lucerny 12 h z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu oraz kiszonce z lucerny 24 h z dodatkiem 0,5 g suchego lodu stwierdzono najniższy ładunek *Clostridium* spp., na poziomie 2,11 – 2,76 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM. Pozostałe warianty doświadczalne kiszonek uzyskały ponad dwukrotnie wyższą liczebność omawianej grupy mikroorganizmów (Tabela 23). Całkowita liczebność grzybów w sporządzonych kiszonkach mieściła się w zakresie 7,61 – 10,90 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM, gdzie wartości najwyższe zostały odnotowane w kiszonce z lucerny po 24 h więdnięcia z dodatkiem 1 g i 2 g suchego lodu oraz w grupie kiszonek z lucerny po 12 h więdnięcia z dodatkiem 1 g suchego lodu. Istotnie najniższy ładunek grzybów w badaniach własnych stwierdzono w kiszonkach z lucerny 0 h więdnięcia. W grupie kiszonek z lucerny 24 h zaobserwowano, że wyższe dawki suchego lodu mogły wpłynąć na wzrost całkowitej liczebność grzybów ($P \leq 0,01$).

Tabela 23. Liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu (log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM)

Wyszczególnienie		Całkowita liczebność bakterii	*Lactobacillus* spp.	*Bacillus* spp.	*Clostridium* spp.	Całkowita liczebność grzybów	Całkowita liczebność drożdży
stopień przewiędnięcia	dodatek suchego lodu						
0 h	0 g	7,589 ^{e}	4,431 ^{e}	7,746 ^{ab}	2,140 ^{b}	7,613 ^{f}	7,250 ^{ab}
	0,5 g	10,10 ^{a}	6,165 ^{c}	7,785 ^{ab}	2,110 ^{b}	8,168 ^{ef}	6,986 ^{ab}
	1 g	9,805 ^{ab}	5,783 ^{c}	7,646 ^{ab}	2,181 ^{b}	8,676 ^{cde}	6,403 ^{b}
	2 g	9,513 ^{bc}	4,977 ^{d}	6,876 ^{de}	2,183 ^{b}	8,586 ^{de}	7,722 ^{ab}
12 h	0 g	9,873 ^{ab}	8,622 ^{a}	7,954 ^{ab}	6,941 ^{a}	9,005 ^{bcd}	6,799 ^{ab}
	0,5 g	9,513 ^{bc}	8,381 ^{a}	7,407 ^{bcd}	2,625 ^{b}	8,652 ^{de}	6,753 ^{ab}
	1 g	9,518 ^{bc}	8,338 ^{a}	7,503 ^{bc}	2,380 ^{b}	10,87 ^{a}	7,148 ^{ab}
	2 g	9,715 ^{ab}c	8,367 ^{a}	7,712 ^{ab}	6,455 ^{a}	8,748 ^{bcde}	7,907 ^{ab}
24 h	0 g	9,188 ^{c}	7,322 ^{b}	7,009 ^{cd}	6,036 ^{a}	9,334 ^{bc}	7,315 ^{ab}
	0,5 g	10,10 ^{a}	8,479 ^{a}	8,134 ^{a}	2,755 ^{b}	9,378 ^{b}	7,133 ^{ab}
	1 g	9,855 ^{ab}	8,403 ^{a}	7,854 ^{ab}	5,137 ^{a}	10,77 ^{a}	8,334 ^{ab}
	2 g	8,510 ^{d}	6,868 ^{b}	6,315 ^{e}	5,545 ^{a}	10,90 ^{a}	8,428 ^{a}
SEM		0,201	0,416	0,144	0,540	0,300	0,174
$P_{\text{suchy lód}}$		**	ns	***	*	**	*
$P_{\text{przewiędnięcie}}$		ns	***	ns	***	***	ns
$P_{\text{suchy lód} \times \text{przewiędnięcie}}$		***	***	***	***	***	*
R^2		0,957	0,991	0,892	0,923	0,969	0,557

SM – sucha masa; SEM – błąd standardowy średniej; R^2 – współczynnik determinacji; ns – nie stwierdzono różnic statystycznych ($P > 0,05$); wartości oznaczone tymi samymi literami (a, b) nie różnią się istotnie na poziomie $P \leq 0,05$; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001.



Wykres 14. Wykres pudełkowy prezentujący liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia (0 h, 12 h, 24 h) z dodatkiem suchego lodu (0 g, 0,5 g, 1 g, 2 g)

W pozostałych grupach kiszonek z lucerny 0 h i 12 h nie zaobserwowane tendencji liniowej dla wartości omawianej cechy (Wykres 14). Całkowita liczebność drożdży w kiszonkach doświadczalnych była istotne różna tylko pomiędzy dwoma wariantami, najniższą wartość uzyskała kiszonka sporządzona z lucerny 0 h z dodatkiem 1 g suchego lodu, a najwyższą kiszonka z lucerny 24 h z dodatkiem 2 g suchego lodu. Pozostałe warianty kiszonek nie różniły się od siebie, ani od wcześniej wymienionych prób, co świadczyło o niskim zróżnicowaniu ładunku drożdży w badaniach własnych (Tabela 23).

Struktura mikrobiomu bakteryjnego zasiedlającego kiszonki z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu została przedstawiona w Tabeli 24. Rodzaj *Lactobacillus* był eudominantem (>10%) obecnej społeczności bakteryjnej we wszystkich kiszonkach za wyjątkiem kiszonek sporządzonych z lucerny po 24 h więdnięcia z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu. Grupa kiszonek z lucerny 0 h niezależnie od zastosowanego dodatku suchego lodu wyróżniała się bardzo wysokim udziałem bakterii rodzaju *Lactobacillus* w ogólnej społeczności bakteryjnej, na poziomie od 83,71% do 94,54%. Kiszonki z lucerny po 24 h więdnięcia z dodatkiem 0 g i 2 g suchego lodu również wyróżniały się wysokim udziałem wyżej wymienionego rodzaju bakterii (80,09% i 76,84%, odpowiednio). W próbach kiszonek o niższym udziale bakterii rodzaju *Lactobacillus*, drugim eduominantem był rodzaj *Weissella*, dla wariantu kiszonki z lucerny po 12 h więdnięcia niezależnie od dawki suchego lodu (21,48 – 39,33%) i w grupie kiszonek z lucerny po 24 h więdnięcia z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu (86,20% i 95,52%, odpowiednio). Trzecim rodzajem, który również był eudominantem w grupie kiszonek z lucerny po 24 h więdnięcia w wariantach z dodatkiem 0 g, 0,5 g, 1 g i 2 g suchego lodu był rodzaj bakterii *Enterococcus*. Na podstawie procentowego udziału bakterie rodzaju *Pediococcus* zostały zaliczone do grupy eudominantów tylko w jednym wariancie doświadczalnym kiszonki z lucerny 0 h z dodatkiem 2 g suchego lodu. W grupie dominantów znalazły się następujące rodzaje *Weissella, Enterococcus, Pediococcus, Leuconostoc*. Rodzaj *Bacillus* w ogólnej społeczności bakteryjnej kiszonek stanowił do 3,65% w kiszonce z lucerny po 24 h więdnięcia z dodatkiem 2 g suchego lodu, jako subdominant. *Lactococcus* spp. był w grupie subdominantów w kiszonce z lucerny po 12 h więdnięcia w wariancie z dodatkiem 0,5 g i 2 g suchego lodu. Bakterie rodzaju *Clostridium* należały do subrecendentów w strukturze mikrobiomu bakteryjnego, za wyjątkiem jednego wariantu, kiszonki sporządzonej z lucerny po 0 h więdnięcia z dodatkiem 0 g suchego lodu, w której rodzaj ten stanowił 1,61% (recedent).

Tabela 24. Struktura mikrobiomu bakteryjnego zasiedlającego kiszonki z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu przedstawiona jako procentowy udział rodzajów w zbiorowości

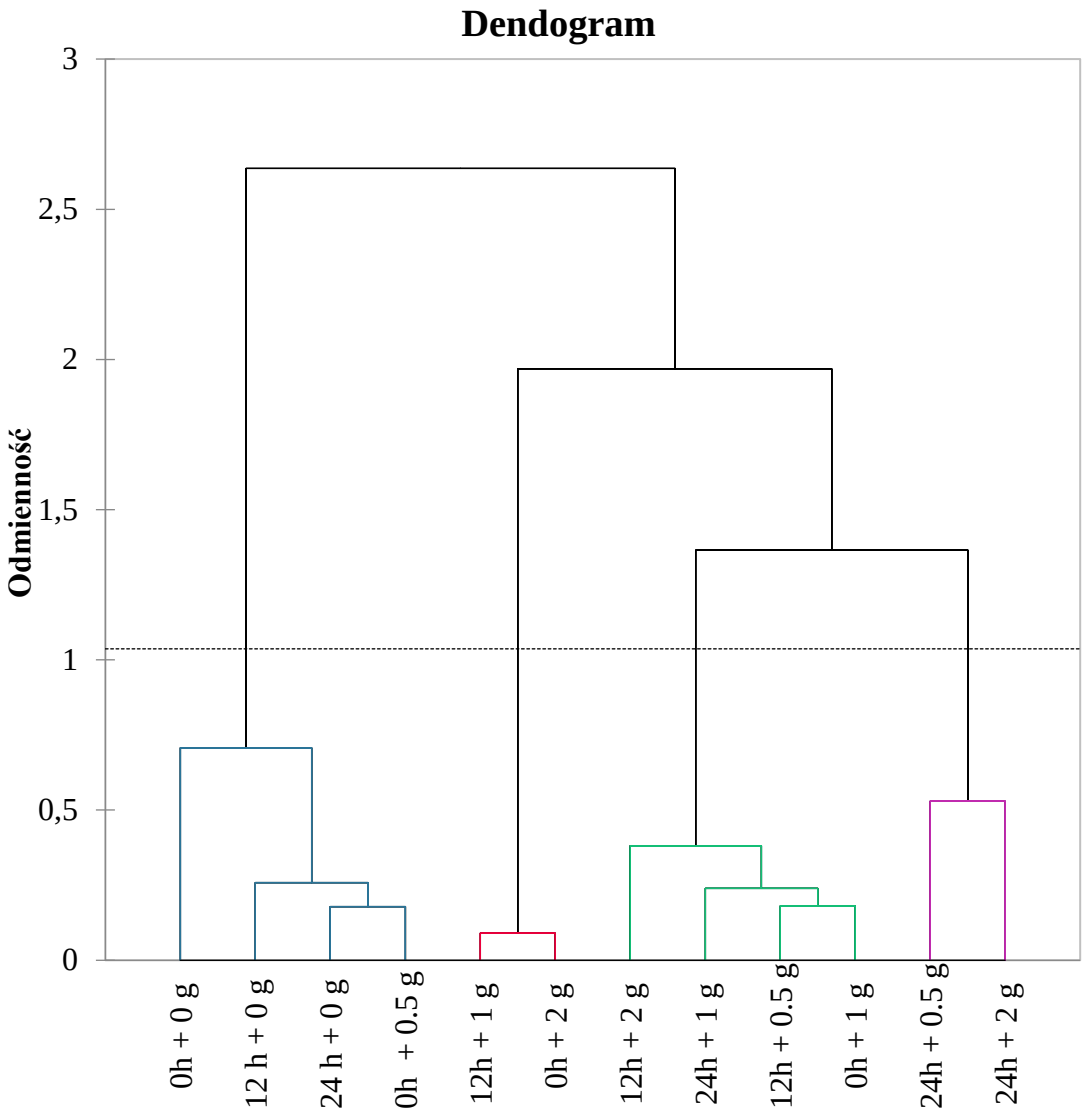
Wyszczególnienie	stopień przewiędnięcia	0 h				12 h				24 h			
	dodatek suchego lodu	0 g	0,5 g	1 g	2 g	0 g	0,5 g	1 g	2 g	0 g	0,5 g	1 g	2 g
Lactobacillus		89,85	93,32	94,54	83,71	22,10	21,48	30,86	39,33	80,09	9,43	2,15	76,84
Weissella		3,60	0,48	0,89	0,19	53,74	47,20	49,09	31,07	4,70	86,20	95,52	6,50
Enterococcus		0,06	0,00	0,22	0,00	16,07	18,25	12,71	18,03	3,49	0,97	1,36	6,51
Pediococcus		2,83	5,95	4,34	15,92	0,16	0,31	0,16	0,50	8,57	0,83	0,07	1,44
Leuconostoc		0,84	0,00	0,00	0,00	4,34	8,07	3,15	5,96	0,16	0,06	0,01	0,82
Bacillus		0,06	0,00	0,00	0,00	0,51	0,55	0,68	0,50	1,27	0,23	0,55	3,65
Pantoea		0,19	0,08	0,00	0,00	0,16	0,18	0,89	0,32	0,16	0,00	0,07	0,99
Lactococcus		0,13	0,00	0,00	0,00	1,86	2,37	0,50	2,19	0,16	0,10	0,05	0,75
Clostridium		1,61	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,03	0,02	0,00	0,07
Pseudomonas		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03	0,04	0,05	1,96	0,00	0,06

Wskazane rodzaje <1%; przynajmniej 1 komórka; w tabeli naniesiono również kolory klas dominacji rodzajów bakterii zgodnie z przyjętą metodyką.

Najmniej zróżnicowaną strukturę mikrobiomu bakteryjnego stwierdzono w grupie kiszonek sporządzonych z lucerny o najwyższej zawartość wody, tj. nieprzewiędniętej. Poza wcześniej wymienionymi rodzajami bakterii *Lactobacillus, Weissella, Pediococcus*, jedynie w wariancie kontrolnym bez dodatku suchego lodu stwierdzono obecność bakterii rodzaju *Leuconostoc, Bacillus, Pantoea, Lactococcus* nie przekraczających 1% i rodzaj *Clostridium* (1,61%) (Tabela 24). Kiszonki sporządzone z lucerny przewiędniętej przez 12 h i 24 h miały bogatszą strukturę mikrobiomu bakteryjnego, w której rodzaje *Leuconostoc* i *Lactococcus* przekroczyły 2% udziału ogółu społeczności.

Na podstawie wyników analizy mikrobiomu zaobserwowano, że najliczniejszymi rodzajami były bakterie kawasu mlekowego, czyli rodzaje *Lactobacillus, Weissella, Enterococcus, Pediococcus, Leuconostoc*. Eudominujący charakter wykazywały głównie rodzaje *Lactobacillus* oraz *Weissella*. Zabserwowano, że dodatek suchego lodu nie wpłynął na stopień dominacji dwóch wyżej wymienionych bakterii kwasu mlekowego. Długość czasu więdnięcia zielonki oddziaływała na strukturę dominacji rodzajów. W przypadku kiszonki z lucerny 0 h, pełną eudominację wykazywały bakterie rodzaju *Lactobacillus*. W kiszonkach z lucerny po 12 h więdnięcia rodzaje *Lactobacillus*, *Weisella* i *Enterococcus* współdominowały (>10% udziału), zaobserwowano również wzrost udziału *Leuconostoc* spp. (średnio 5,40%) i *Lactococcus* spp. (około 2,0%) oraz zmniejszenie *Pediococcus* spp. (<1%) w stosunku do pozostałych czasów więdnięcia lucerny przed zakiszeniem.

Bardziej szczegółowe podejście przedstawiono na dendrogramie AHC i PERMANOVA dotyczących zróżnicowania struktury mikrobiomów (Wykres 15). Grupowanie wariantów doświadczalnych sporządzonych kiszonek pozwoliło na uzyskanie czterech odmiennych grup. Pierwsza grupa składała się z wariantów kiszonek z lucerny 0 h z dodatkiem 0 g suchego lodu, 12 h z 0 g suchego lodu, 24 h z 0 g suchego lodu oraz 0 h z 0,5 g suchego lodu, które wykazywały największą odmienność (2,6 pkt.) w stosunku do pozostałych grup. W skład drugiej grupy wchodziły warianty kiszonek z lucerny 12 h z 1 g suchego lodu i 0 h z 2 g suchego lodu, natomiast do grupy trzeciej zaliczono kiszonki z lucerny 12 h z 2 g suchego lodu, 24 h z 1 g suchego lody, 12 h z 0,5 g suchego lodu oraz 0 h z 1 g suchego lodu. Ostatnia, czwarta grupa obejmowała dwa warianty kiszonek z lucerny 24 h z 0,5 g suchego lodu i 24 h z 2 g suchego lodu. Na podstawie wyników analizy wariancji zaobserwowano, że dodatek suchego lodu wpłynął na zmiany w strukturze mikrobiomu bakteryjnego kiszonek. Stopień przewiędnięcia oraz interakcje nie wpływały istotnie na odnotowane zmiany.



Wykres 15. Dendrogram zróżnicowania AHC dla poszczególnych wariantów doświadczalnych kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia (0 h, 12 h, 24 h) z dodatkiem suchego lodu (0 g, 0,5 g, 1 g, 2 g); linia odciętych i jednakowy kolor linii wskazuje na brak istotnego zróżnicowania w obrębie grup doświadczalnych

7. Dyskusja

7.1. Zadanie badawcze I

7.1.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek

Zawartość BO w zielonce z lucerny w badaniach własnych (207 g·kg^{-1} SM) była porównywalna z wynikami pracy Ke i in. (2018) (200 g·kg^{-1} SM), a także wynikami prezentowanymi przez Hartinger i in. (2019) (213 g·kg^{-1} SM). Zgodnie z Kume i in. (2001) udział tego składnika w lucernie może wynosić od 114 g do nawet 279 g·kg^{-1} SM, w zależności od fazy wzrostu rośliny. Inne źródła (Annicchiarico, Barrett, Brummer, Julier, Marshall, 2015) donoszą, że średnio w lucernie jest 150 – 200 g BO·kg^{-1} SM, przy uwzględnieniu optymalnych warunków uprawy i zbioru. Dysproporcje w koncentracji BO lucerny występujące w piśmiennictwie są ściśle związane ze stosunkiem liści względem łodyg, czyli wysokością cięcia, a także stopniem zdrewnienia łodyg, co bezpośrednio determinuje zawartość składnika (Yari i in., 2012).

W odniesieniu do komonicy zwyczajnej uzyskana w badaniach własnych koncentracja BO (213,1 g·kg^{-1} SM) była nieco wyższa niż średnie zaprezentowane w pracy Marley, Fychan, Jones (2006) dla pokosu I (196,2 g·kg^{-1} SM) i pokosu II (193,3 g·kg^{-1} SM). W przeprowadzonych badaniach Marley i in. (2006) ukazali zróżnicowaną zawartość BO w zakresie od 185 g do 212 g·kg^{-1} SM w I pokosie i od 177 g do 216 g·kg^{-1} SM w II pokosie, uwzględniając różnice odmianowe rośliny. Wyniki własne, tak więc mieściły się w górnych granicach podanych powyżej wartości.

Zielonka z lucerny w badaniach własnych charakteryzowała się porównywalną zawartością NDF (428,1 g·kg^{-1} SM) i ADF (331,9 g·kg^{-1} SM) względem wyników prezentowanych przez Hartinger i in. (2019), gdzie odnotowano 431 g NDF·kg^{-1} SM i 340 g ADF·kg^{-1} SM. Pomimo tej samej fazy dojrzałości rośliny, w badaniach własnych uzyskano niższą koncentrację ADL (58,08 g·kg^{-1} SM) względem wyników zespołu Hartinger i in. (2019) (91 g·kg^{-1} SM), co wynikało z różnicy w stopniu lignifikacji ścian komórkowych rośliny. Wskaźnik L/NDF był wyższy (0,21) w cytowanych badaniach (Hartinger i in., 2019) względem wyników własnych (0,14). Według Grant (2013) zakres L/NDF w lucernie powinien wynosić od 0,11 do 0,20, a najbardziej pożądanymi są wielkości poniżej 0,15, co zostało uzyskane w badaniach własnych i świadczyło o bardzo dobrej jakości węglowodanów strukturalnych zebranego surowca.

W badaniach Naydenova, Kyuchukova, Pavlov (2013) zielonka z komonicy zwyczajnej zebrana w tej samej fazie wegetacji, charakteryzowała się zbliżonym

rozkładem frakcji NDF, ADF i ADL (266,4 g, 252,4 g, 62,50 g·kg^{-1} SM, odpowiednio) w odniesieniu do wartości uzyskanych w badaniach własnych (298,0 g, 287,7 g, 66,22 g·kg^{-1} SM, odpowiednio). Wskaźnik L/NDF również był zbliżony do uzyskanych wyników i wynosił 0,24 (Naydenova i in., 2013). L/NDF jest wskaźnikiem wysoko ujemnie skorelowany ze strawnością frakcji NDF (R = - 0,9), co zatem może świadczyć o niskiej strawności ścian komórkowych komonicy zwyczajnej (Grant, 2013).

Zielonka z lucerny w badaniach własnych uzyskała korzystniejsze wartości podanych parametrów, w tym zawartość WSC (71,34 g·kg^{-1} SM) zbliżoną do średnich podawanych dla traw pastewnych wysoko nawożonych azotem (70 g·kg^{-1} SM), niższą pojemność buforową (58,60 g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM), charakterystyczną dla mieszanek trawiastych zdominowanych przez rodzaj *Lolium* (55 g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM) i wyższy stosunek WSC/BC (1,22), będący wartością pośrednią pomiędzy zielonką z lucerny (0,80), a koniczyny czerwonej (1,40). Podobnie współczynnik FC był wyższy w badaniach własnych (41,09) względem średnich podawanych dla lucerny (26), a wartością zbliżony do przewiędniętych traw intensywnie nawożonych azotem (41 – 45), dla których zaprezentowano cytowane wartości według Weissbach, Auerbach (2013).

Niższą zawartość WSC w komonicy zwyczajnej (59,69 g·kg^{-1} SM) względem lucerny (71,34 g·kg^{-1} SM), można wyjaśnić wyższą zawartością BO (213,1 g vs. 207,0 g·kg^{-1} SM, odpowiednio) (Loaiza, Balocchi, Bertrand 2016). Pojemność buforowa zielonek wzrasta wraz ze wzrostem zawartości BO i obniża się wraz ze wzrostem WSC (Stepanova, Volovik, 2021), co również zaobserwowano w wynikach własnych. Według Weissbach, Auerbach (2013) zielonki o FC < 35 uznawane są za trudne do zakiszenia, podczas gdy zielonki o FC > 45 określane są jako łatwe kiszące. Obie analizowane zielonki uzyskały wartość FC > 35, a poszczególne parametry określające przydatność do zakiszania były korzystniejsze względem wzorców podanych dla lucerny (Weissbach, Auerbach, 2013).

Koncentracja tanin w komonicy zwyczajnej może przybierać wartości w zakresie od 2,0 g do nawet 39,0 g·kg^{-1} SM zależnie od regionu uprawy, warunków klimatycznych i środowiskowych, a także odmiany (Grabber, 2009; Hedqvist i in., 2000; Woodward i in., 2000). Zatem zawartość tanin w zielonce z komonicy zwyczajnej stanowiącej surowiec do współzakiszania z lucerną w badaniach własnych należało uznać za wysoką.

Sporządzone kiszonki charakteryzowały się zbieżnym podstawowym składem chemicznym, co świadczyło o dobrej jakości fermentacji i braku strat składników pokarmowych (Kung, Shaver, Grant, Schmidt, 2018). Odnotowany wyższy udział TS

w kiszonkach w stosunku do zielonek może wynikać z udziału w tej frakcji produktów procesu fermentacji (McDonald i in., 1991). Zawartość BO, NDF i ADF kiszonek doświadczalnych była porównywalna z wynikami prezentowanymi przez Grabber, Coblentz (2009) dla samodzielnie zakiszonej lucerny i komonicy zwyczajnej o niskiej, średniej i wysokiej zawartości tanin. Kiszonka z lucerny w 1 kg SM zawierała 221 g BO, 436 g NDF i 349 g ADF. Komonica zwyczajna zakiszona samodzielnie uzyskała zawartość BO na poziomie 215 g vs. 211 g vs. 205 $g \cdot kg^{-1}$ SM, NDF był równy 418 g vs. 421 g vs. 430 $g \cdot kg^{-1}$ SM, a ADF wynosił 341 g vs. 343 g vs. 345 $g \cdot kg^{-1}$ SM w zależności od zawartości tanin (Grabber, Coblentz, 2009). W badaniach wcześniejszych Marley i in. (2006) kiszonka z komonicy zwyczajnej uzyskała porównywalną zawartość BO (186 – 210 $g \cdot kg^{-1}$ SM), a NDF był niższy (294 – 342 $g \cdot kg^{-1}$ SM). Najwyższą pozostałość WSC stwierdzono w grupie kontrolnej kiszonek własnych, co wynikało z ilości substratu zużytego podczas fermentacji (Weiberg i Ashbel, 2003). Pojemność buforowa i SM obu zielonek była zbliżona, a istotne różnice w pozostałości WSC mogły być wynikiem indywidualnego charakteru przebiegu fermentacji i stopnia zagęszczenia poszczególnych warstw w mikrosilosie, jak i zróżnicowania mikroflory epifitycznej (Lin i in., 2023; Muck i in., 2018).

Według wartości rekomendowanych, podawanych przez Kung i in. (2018) kiszonki z roślin strączkowych (30 – 35% SM) powinny uzyskać następujące wartości typowych produktów fermentacji: pH w zakresie 4,3 – 4,5, 60 – 80 g kwasu mlekowego, 20 – 30 g kwasu octowego, <5 g kwasu propionowego, <5 g kwasu masłowego i 5 – 10 g etanolu w kg SM, a $N\text{-}NH_3$ w przedziale od 100 do 150 $g \cdot kg^{-1}$ $N_{ogólnego}$. Stwierdzona kwasowość badanych kiszonek była nieco niższa, co może być związane z przebiegiem fermentacji i zdolnością buforową roślin (McDonald i in., 1991). Samodzielnie zakiszona lucerna i komonica zwyczajna o niskiej, średniej i wysokiej zawartości tanin miały niższe pH (4,63 vs. 4,71 vs. 4,20 vs. 4,17) w badaniach Hymes-Fecht i in. (2013). Marley i in. (2006) również donoszą o niższym pH kiszonek z komonicy zwyczajnej, w zakresie od 3,98 do 4,08. Potwierdzają to badania Fraser, Fychan, Jones (2000), gdzie dla samodzielnie zakiszonej lucerny i komonicy zwyczajnej przy zbieżnej zawartości SM (332 g i 325 $g \cdot kg^{-1}$ FM) odnotowano pH równe 4,77 i 4,63, odpowiednio.

Intensywność przebiegu fermentacji mlekowej była zróżnicowana, a uzyskane wyniki zawartości kwasu mlekowego były niższe niż typowe, podane przez Kung i in. (2018). Pomimo braku istotnych różnic kiszonka z lucerny grupy kontrolnej uzyskała najwyższą koncentrację tego kwasu, wyższą w stosunku do kiszonek z udziałem

komonicy zwyczajnej. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach Fraser i in. (2000), w których to właśnie samodzielnie zakiszona lucerna uzyskała znacznie wyższą zawartość omawianego produktu fermentacji (36,4 $g \cdot kg^{-1}$ SM) w stosunku do samodzielnie zakiszonej komonicy zwyczajnej (16,0 $g \cdot kg^{-1}$ SM). Doświadczalne kiszonki poza grupą z 20% i 30% udziałem komonicy zwyczajnej miały zbliżoną koncentrację kwasu mlekowego do kiszonek z komonicy zwyczajnej analizowanych przez Marley i in. (2003), gdzie odnotowano zakres od 42,0 g do 66,0 $g \cdot kg^{-1}$ SM. W omawianych grupach doświadczalnych zawartości kwasu mlekowego wskazywały na ograniczoną fermentację, jednak wyższy udział resztkowego WSC w stosunku do grup z 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej sugerował, że mogło to być spowodowane liczebnością i składem mikroflory epifitycznej (Fychan i in., 1998). W przypadku roślin strączkowych udział kwasu mlekowego jest zmienny, gdyż przy 30 – 35% SM powstają warunki sprzyjające rozwojowi *Clostridium* spp., które są w stanie metabolizować kwas mlekowego do kwasu masłowego (Kleinschmit, Kung, 2006).

Kiszonki uzyskały niską zawartość kwasu octowego względem wartości typowych podanych w literaturze dla zakiszania roślin strączkowych (Kung i in., 2018). Generalnie niski udział tego kwasu mógł być wynikiem zawartości SM, jak i związków nieorganicznych, zawartych w PS. Kiszonki z roślin strączkowych o wysokiej zawartości PS (>15% SM) zwykle zawierają bardzo dużo kwasu octowego z powodu przedłużającej się fermentacji (Kung i in., 2018). W kiszonkach stwierdzony poziom kwasu octowego był kilkukrotnie niższy w porównaniu do wcześniejszych badań zespołu Fraser i in. (2000), gdzie lucerna uzyskała 20,5 $g \cdot kg^{-1}$ SM, natomiast zbliżony do wyniku dla komonicy zwyczajnej (9,3 $g \cdot kg^{-1}$ SM).

Należy zwrócić uwagę na zawartość kwasu propionowego w analizowanych kiszonkach, która wynosiła <0,1%, co wskazuje na prawie niewykrywalne ilości tego kwasu i dobrą jakość kiszonek (Kung i in., 2018). Kwas masłowy nie powinien być wykrywalny w kiszonkach o dobrym i bardzo dobrym wzorze fermentacji (Pahlow i in., 2003). W przygotowanych kiszonkach zawartość kwasu masłowego była znikoma, co potwierdza bardzo niską aktywność *Clostridium* spp., a mogło być wynikiem podwyższenia SM przed zakiszeniem do poziomu >30%, a w efekcie wzrostu ciśnienia osmotycznego (Mills, Kung, 2002). Stwierdzone ilości etanolu w kiszonce kontrolnej i wariantach z 10%, 20% oraz 30% udziałem komonicy zwyczajnej można uznać za niskie i nie wpływające na pogorszenie jakości (Kung i in., 2018; McDonald i in., 1991).

Stosunek kwasu mlekowego do kwasu octowego jest jednym z powszechnie znanych i stosowanych wskaźników jakości przebiegu fermentacji. Dobrze fermentowane kiszonki uzyskują zwykle stosunek tych kwasów w zakresie od 2,50 do 3,00 zgodnie z Muck, Kung (1997). Stosunek kwasów w badaniach własnych, gdzie kiszonki zostały przygotowane bez zastosowania dodatków kiszonkarskich, jest kilkukrotnie wyższy, zwłaszcza w grupie kontrolnej (20,20). Kiszonki z bardzo wysokim stosunkiem kwasu mlekowego do kwasu octowego mogą czasami być mniej stabilne tlenowo, ponieważ uzyskana koncentracja kwasu octowego może być nie wystarczająca do hamowania aktywności drożdży (Kung i in., 2018; Schmidt, Hall, Charley, 2017). Najbliższą rekomendowanej wartości uzyskał wariant z 50% komonicy zwyczajnej.

Na uwagę zasługuje niski udział $N\text{-}NH_3$ w kiszonkach doświadczalnych. Stwierdzone zawartości świadczyły o niskim stopniu degradacji aminokwasów podczas fermentacji (McDonald i in., 1991). Niższy od wartości typowych poziom $N\text{-}NH_3$ potwierdza niską aktywność bakterii *Clostridium* spp. (Kaiser, Polip, Weiz, 2002).

Podsumowując, zielonki charakteryzowały się korzystnym składem chemicznym oraz dobrą przydatnością do zakiszania w odniesieniu do danych piśmiennictwa, a także nie były zróżnicowane pod względem wartości pokarmowej. Parametry fermentacji kiszonek przedstawiały model ekstensywnej fermentacji mlekowej, ze stosunkowo niskim poziomem $N\text{-}NH_3$ i niską zawartością analizowanych LKT (Huhtanen, Nousiainen, Khalili, Jaakkola, Heikkilä, 2003). Najwyższą jakość fermentacyjną uzyskały kiszonki lucerny z 40% i 50% komonicy zwyczajnej, których parametry były najbliższe rekomendowanym wzorcom (McDonald i in., 1991; Kung i in., 2018).

7.1.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek

Analizując skład BO zielonek doświadczalnych należy stwierdzić, że charakteryzowała je znacznie niższa zawartość TP (55,92% i 67,28% BO dla lucerny i komonicy zwyczajnej, odpowiednio) w stosunku do danych literaturowych. Guo i in. (2008) odnotowali TP na poziomie 84,70% BO dla świeżej lucerny i 82,90% BO dla lucerny przewiędniętej. W innych badaniach (Grabber, 2009) prezentujących wartości średnie z dwóch lat doświadczenia i dwóch zbiorów rocznie, liofilizowana zielonka z lucerny miała TP równe 71,20% BO, a komonica zwyczajna o niskiej, średniej i wysokiej zawartości tanin uzyskała odpowiednio 75,80% vs. 76,30% vs. 75,80% BO. Na obniżenie zawartości tego składnika w zielonkach doświadczalnych zapewne duży wpływ miał proces więdnięcia, szczególnie jego długość i intensywność (Guo i in., 2008;

Owens, Albrecht, Muck, Duke, 1999). Znaczne dysproporcje między wartościami uzyskanymi, a wynikami podawanymi w literaturze mogły wynikać z zróżnicowanego tempa utraty wody przez komórki roślinne podczas więdnięcia, co warunkowane było zmiennymi czynnikami zewnętrznymi, tj. temperaturą, wilgotnością i ruchem powietrza. Dodatkowo wpływ miały cechy materiału roślinnego obejmujące różnice gatunkowe i odmianowe, w tym m.in. udział liści względem łodyg i fazę wegetacji podczas zbioru (Alzueta, Caballero, Rebole, Trevino, Gil, 2001). Niższe udziały TP w badaniach własnych sugerują, że część tejże frakcji BO uległa proteolizie już przed zakiszeniem, co zostało wcześniej opisane w literaturze (Coblentz, Brink, Martin, Undersander, 2008; Coblentz, Grabber, 2013; Purwin i in., 2015). Wyższą zawartość TP w zielonce z komonicy zwyczajnej względem lucerny można natomiast wytłumaczyć obecnością tanin, głównie tanin skondensowanych (CT), które jak wykazano wcześniej ograniczały przemiany proteolityczne (Lorenz, Eriksson, Udén, 2010).

Zawartość frakcji PA1 była niska i jednocześnie bardzo zbliżona dla obu zielonek w badaniach własnych (0,34% i 0,33% BO, odpowiednio dla lucerny i komonicy zwyczajnej), co było zgodne z ilością tej formy azotu w materiale świeżym, zwykle <1% BO (McDonald i in., 1991). W systemie CNCPS v 6.5 do frakcji rozpuszczalnych należy także frakcja PA2, której niższą koncentrację stwierdzono w zielonce z komonicy zwyczajnej względem lucerny. Uzyskane wyniki były konsekwencją wyższej zawartości TP i niższego udziału SCP w zielonce z komonicy zwyczajnej (Tabela 4), gdyż właśnie te frakcje wpływają na ilość PA2 (Higgs i in., 2015). Zgodnie z danymi literaturowymi (Das, Kundu, Kumar, Datt, 2015; Van Amburgh i in., 2015) największą częścią BO zielonek powinna być frakcja PB1, o szacowanej szybkości degradacji 3 – 20 $\%\cdot h^{-1}$, co zostało potwierdzone w badaniach własnych. Zawartość frakcji PB1 zarówno w lucernie, jak i komonicy zwyczajnej należało uznać za wysoką w stosunku do wyników Thers, Stødkilde, Jensen, Eriksen (2021), gdzie udział tej frakcji nie przekraczał 48,60% BO dla lucerny oraz koniczyny czerwonej. Jednak frakcja PB1 zawsze stanowiła najwyższą wartość we wszystkich badanych gatunkach roślin (lucerna, koniczyna czerwona, koniczyna biała, życica trwała) niezależnie od terminu koszenia, co zostało stwierdzone przez Thers i in. (2021). Uzyskane w badaniach własnych wartości dla frakcji PB1 przekraczały 65,00% BO, co należało uznać za bardzo wysoki wynik. Potwierdziły to wcześniejsze badania Grabber (2009), gdzie odnotowano średnie wartości tej frakcji dla lucerny wynoszące 52,30% BO i dla komonicy zwyczajnej o niskiej, średniej i wysokiej koncentracji tanin, odpowiednio 57,00% vs. 55,90% vs.

56,10% BO. Analizowane wyniki własne frakcji PB2 dla zielonek były niskie względem wartości zgłoszonych przez Grabber (2009) dla lucerny (6,80% BO) i komonicy zwyczajnej (5,00% vs. 6,70% vs. 7,40% BO, odpowiednio dla nisko-, średnio- i wysokotaninowej). Natomiast zbliżoną wartość (2,71% BO) uzyskali Guo i in. (2008) dla przewiędniętej przez 10 h lucerny, którzy też wykazali, że więdnięcie skutkuje wzrostem udziału PB2. Koncentracja BO frakcji PC odpowiadająca zawartości ADICP była niska w obu zielonkach i kształtowała się w zbliżonym zakresie do badań Grabber (2009), w których w lucernie średnio z dwóch lat użytkowania wykazano 2,80% BO, a w komonicy zwyczajnej 3,00% vs. 3,10% vs. 3,50% BO (dla niskiej, średniej i wysokiej zawartości tanin, odpowiednio). Natomiast wcześniejsze badania Guo i in. (2008) prezentują znacznie wyższe zawartości dla przewiędniętej lucerny, wynoszące 10,30% BO. Jeszcze wyższe udziały ADICP stwierdzili Li i in. (2018a) dla przewiędniętej lucerny (13,40% BO) i koniczyny czerwonej (20,80% BO). Generalnie w zielonkach roślin pastewnych zawartość frakcji PC zwykle jest najniższa (Thers i in., 2021), co świadczy o wyższej biodostępności BO (Das i in., 2015). Wyższe wartości frakcji PC wykazywać mogą pasze świeże, na które wpływał czynnik termiczny, już nieznaczne przyrosty temperatury mogą oddziaływać krzywoliniowo na powolny wzrost tejże frakcji przed zakiszeniem (Coblentz, Hoffman, Martin, 2010).

Uzyskane wartości TP w kiszonkach doświadczalnych były zgodne z zakresem podanym w literaturze (20 – 50% BO) dla zakiszania lucerny, której towarzyszą przemiany proteolityczne (Ohshima, McDonald, 1978), na podstawie czego można było stwierdzić o niskiej i/lub średniej efektywności wykorzystania BO sporządzonych kiszonek (Ke i in., 2022). Zbliżone udziały TP w samodzielnie zakiszonej lucernie (31,90% BO) i komonicy zwyczajnej o różnej zawartości tanin (30,90% vs. 34,30% vs. 37,80% BO) zgłosili Grabber, Coblentz (2009), potwierdzając wpływ tanin na ograniczenie proteolizy. Badania własne, tak więc potwierdziły skuteczność tanin naturalnie obecnych w komonicy zwyczajnej, gdyż w grupach przy udziale powyżej 20% rośliny stwierdzono wyższe zawartości TP względem cytowanych wyników (Grabber, Coblentz, 2009). Wyższa koncentracja TP w analizowanych kiszonkach wydaje się być związana z obniżonym tempem hydrolizy do peptydów i aminokwasów, w wyniku hamującego działania tanin zawartych w komonicy zwyczajnej (Grabber, Coblentz, 2009). Obecne w roślinie taniny ograniczają proteolizę głównie poprzez niekowalencyjne wiązanie i wytrącanie proteaz, a także substratów białkowych (Min, Barry, Attwood, McNabb, 2003). Efektem działania tanin jest zmniejszenie zawartości NPN i N-NH_3

podczas fermentacji (Cavallarin, Tabacco, Borreani, 2007). Wyniki własne potwierdziły wzrost TP, który jest analogiczny do obniżenia ilości NPN, natomiast uzyskane wartości N-NH_3 wskazywały na tendencję odwrotną. Analizowana frakcja PA1 wraz ze wzrostem udziału komonicy zwyczajnej również wzrastała, lecz mieściła się w zalecanym zakresie (Kung i in., 2018). Odnotowane zmiany w zawartości frakcji PA1 mogą świadczyć o wzrastającej aktywności drobnoustrojów w zakiszanych roślinach, ponieważ aminokwasy są rozkładane do NH_3 w procesie deaminacji, przeprowadzanej przez bakterie produkujące kwas masłowy, octowy i mlekowy (Fijałkowska i in., 2015). Badania późniejsze Ke i in. (2022) również dowodzą zmniejszenia koncentracji NPN i N-NH_3 w kiszonkach traktowanych taninami. W badaniach tych (Ke i in., 2022) kiszonka z lucerny z dodatkiem tanin uzyskała zbliżoną wartość TP (48,60% BO) do wyników własnych dla grupy z 50% udziałem komonicy zwyczajnej (47,13% BO), a lucerna bez dodatku znacznie niższą zawartość TP (26,90% BO) w porównaniu do własnej grupy kontrolnej (31,81% BO). Pomimo efektywnego zastosowania komonicy zwyczajnej w przeprowadzonym doświadczeniu, zawartość TP w grupie kontrolnej można było uznać za niską w stosunku do wyników odnotowanych przez Hymes-Fecht i in. (2013), którzy przy samodzielnie zakiszonej lucernie uzyskali wartości wyższe (47,90% BO). Były one zbliżone do wyników dla kiszonki z 50% komonicy zwyczajnej (47,13% BO).

Część białka frakcji PB1, które charakteryzuje się dobrą biodostępnością zarówno w żwaczu, jak i w jelicie cienkim w badanych kiszonkach można było uznać za wysoką, porównując z wynikami prezentowanymi dla lucerny (19,80% BO) i komonicy zwyczajnej (19,80%, 22,70%, 26,70% BO, odpowiednio dla nisko-, średnio- i wysokotaninowej) w badaniach Grabber, Coblentz (2009). Zakiszanie zmniejszyło udział frakcji PB1 przy jednoczesnym wzroście udziału PA2. Grabber, Coblentz (2009) stwierdzili, że taniny zawarte w komonicy zwyczajnej powodują niewielkie przesunięcia azotu z frakcji NPN, głównie do PB1 i jednocześnie wykazali, że zawartość PB1 wzrosła w kiszonce z komonicy zwyczajnej wraz ze wzrostem zawartości tanin.

Kwantyfikacja frakcji NDICP jest ważna w systemie CNCPS, ponieważ ta część BO, które jest nierozpuszczalne w neutralnym detergencie, ale rozpuszczalne w kwaśnym detergencie, zawiera frakcja białkowa PB2, co do której zakłada się, że zachowuje ona dobrą biodostępność, ale również jest stosunkowo odporna na degradację w żwaczu, co skutkuje większym pasażem wartościowego białka by-pass (Higgs i in., 2015; Van Amburgh i in., 2015). Cześć frakcji PB2 może wzrastać wraz ze spontanicznym

podwyższeniem temperatury masy roślinnej, ponieważ białka frakcji PB1, które są rozpuszczalne w neutralnym detergencie, często ulegają denaturacji pod wpływem temperatury, przez co stają się mniej rozpuszczalne (Licitra i in., 1996). Wartości frakcji PB2 w badanych kiszonkach były istotnie zróżnicowane ($P \leq 0,01$), w tym grupy z 30%, 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej uzyskały wyższe wartości względem doniesień literaturowych. Wyniki badań Grabber, Coblentz (2009) prezentują zawartość tej frakcji BO na poziomie 3,40% BO dla kiszonki z lucerny i 2,60%, 2,90%, 3,40% BO dla kiszonki z komonicy zwyczajnej (nisko-, średnio-, wysokotaninowej). Jeszcze niższe wartości stwierdzili Hymes-Fecht i in. (2013) dla zakiszonej lucerny (1,33% BO), a także komonicy zwyczajnej (1,39%, 0,66%, 1,03% BO, nisko-, średnio-, wysokotaninowej, odpowiednio). Wyższa zawartość PB2 wśród kiszonek z bobowatych charakterystyczna była zwykle dla koniczyny czerwonej (11,20% BO) co potwierdzili Grabber, Coblentz (2009), a także (9,83% BO) Hymes-Fecht i in. (2013).

W badanych kiszonkach względem zielonek, stwierdzono wzrost białka niepodlegającego rozkładowi w żwaczu, ani trawieniu w jelicie, należącego do frakcji PC, które stanowi jeden ze wskaźników przemian BO podczas fermentacji. Uważa się, że koncentracja frakcji PC wzrasta w wyniku zajścia reakcji Maillarda indukowanych podwyższeniem temperatury masy roślinnej lub też, jako wynik nieenzymatycznych produktów powstałych poprzez kondensację cukrów redukujących z aminokwasami, dając następnie polimery posiadające wiele fizycznych właściwości ligniny (Coblentz i in., 2010). Wchodząca w skład PC frakcja ADICP jest powszechnie uważana za wskaźnik uszkodzeń termicznych w roślinie (Coblentz i in., 2000). Po zakiszeniu obserwuje się wzrost udziału frakcji PC w porównaniu do zielonek roślin strączkowych, co może być spowodowane akumulacją ciepła wytworzonego podczas fermentacji (Guo i in., 2008). Stwierdzono wyższy udział frakcji PC w analizowanych kiszonkach doświadczalnych w stosunku do lucerny i komonicy zwyczajnej nisko-, średnio- i wysokotaninowej w badaniach Grabber, Coblentz (2009) (3,40% vs. 3,40% vs. 3,70% vs. 4,00% BO, odpowiednio), a także w porównaniu do wyników zaprezentowanych przez Hymes-Fecht i in. (2013) (1,71% vs. 1,23% vs. 1,20% vs. 1,38% BO, odpowiednio). Jednak inne zespoły badawcze określające ilość ADICP w kiszonce z lucerny zaprezentowały wartości zbliżone lub nawet wyższe, m.in. 6,50% BO (Hristov, Sandev, 1998) czy nawet wartości na poziomie 10,50% BO (Schwab, Tylutki, Ordway, Sheaffer, Stern, 2003).

Podsumowując należy zaznaczyć, że według systemu CNCPS v 6.5, BO zakiszonej lucerny z wyższymi udziałami komonicy zwyczajnej (30%, 40%, 50%) charakteryzowało się wyższą jakością, co wynikało z niższego udziału frakcji PA2, a także największego wśród badanych kiszonek udziału wartościowych frakcji PB1 i PB2, które są biodostępne w żwaczu, ale znaczna ich część rozkładana jest w jelicie cienkim. Korzystniejszy rozkład frakcji białkowych wyżej wymienionych kiszonek może wynikać głównie z ograniczenia degradacji TP na skutek naturalnie zawartych w komonicy zwyczajnej tanin. Poprawę jakości BO lucerny po zakiszeniu z komonicą zwyczajną można było stwierdzić, także na podstawie porównania wyników własnych kiszonki z 50% udziałem komonicy zwyczajnej do wyników uzyskanych dla samodzielnie zakiszonej lucerny w badaniach Li i in. (2018a). Kiszonka z lucerny w cytowanych badaniach (Li i in., 2018a) uzyskała zbliżoną wartość frakcji PA2 (43,40% BO), PB2 (7,52% BO), a także o 8,23 pkt. % mniej PB1 (27,00% BO) i o 8,58 pkt. % więcej frakcji PC. Wielu autorów potwierdza, że taniny hamują proteolizę w zakiszaniu, zmniejszając degradację TP, a ich efektywność jest różna, zależnie od pochodzenia i zastosowanej dawki (Cavallarin i in., 2007; Grabber, Coblentz, 2009; Huang i in., 2010; Ke i in., 2022; Lorenz i in., 2010; Min i in., 2003).

7.1.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek

Technika woreczków nylonowych procedury *in situ* jest najczęściej stosowaną do oceny stopnia i tempa degradacji składników pokarmowych pasz w żwaczu, a także jest uważana za technikę referencyjną w obecnych systemach oceny pasz. Jednak jest to procedura czasochłonna i pracochłonna, a do uzyskania wiarygodnych wyników wymagana jest odpowiednia liczebność przetokowanych zwierząt (Trujillo i in., 2010). Zgodnie z danymi literaturowymi procedura grawimetryczna *in vitro* z wykorzystaniem inkubatora Daisy II dostarcza wysoce powtarzalnych danych o rozkładzie w celu oszacowania zarówno tempa, jak i zakresu degradacji pasz włóknistych (Ceballos, Noguera, Bolivar, Posada, 2008). W stosunku do techniki woreczków nylonowych, procedura ta zapewnia mniejsze nakłady pracy, paszy, czasu do przeprowadzenia eksperymentu, jak i wymaga mniejszej liczebności przetokowanych zwierząt (Ceballos i in., 2008; Trujillo i in., 2010).

Zmiany w rozkładalności *in vitro* SM i BO między zielonkami i kiszonkami w poniższym doświadczeniu były wynikiem obniżenia zawartości łatwo strawnych składników pokarmowych zwłaszcza podczas procesu zakiszania, a także spowodowane mogły być zmianami udziału poszczególnych frakcji BO w wyniku przemian

proteolitycznych i możliwie powstałych produktów reakcji Maillarda (Damborg, Stødkilde, Jensen, Weisbjerg, 2018; Fijałkowska i in., 2015). Różnice istotne uzyskane w badaniach własnych dla degradacji żwaczowej SM można było wytłumaczyć różnicami gatunkowymi roślin, głównie dotyczącymi rozkładu węglowodanów strukturalnych, które wpływają na kruchość, a zatem również na rozkład wielkości i skład cząstek (Eisenhardt, Saleeb, McKay, Zeller, 2009). Odmienny profil rozdrobnienia i składu cząstek mógł spowodować znaczne i szybkie straty bardzo małych cząstek paszy przez pory woreczków podczas pierwszych godzin inkubacji (Mould, Morgan, Kliem, Krystallidou, 2005), co zostało zaobserwowane dla czasu inkubacji 2 h i 4 h, wraz ze wzrostem udziału komonicy zwyczajnej wzrastała ilość rozłożonej *in vitro* SM w badaniach własnych. Kolejnym czynnikiem, który wpływał na zmiany w rozkładalności SM poza różnicami międzygatunkowymi roślin mogła być obecność tanin w komonicy zwyczajnej (Tabacco i in., 2006). Zespoły badawcze, które koncentrowały się na wpływie tanin na dostępność składników pokarmowych w żwaczu zaobserwowały negatywny wpływ tanin na dostępność SM *in vitro* (Cope, Burns, 1971). McMahon i in. (2000) doszli do wniosku, że taniny nie tylko hamują trawienie celulozy w żwaczu *in vitro* i *in vivo*, ale także hamujące działanie tanin obejmuje aktywność większości grup bakterii. Zmniejszenie rozkładalności SM *in vivo* zaobserwowano, gdy skarmiano pasze zawierające CT (> 5% SM) w pracy Waghorn, Jones, Shelton, McNabb (1990). Późniejsze badania Tabacco i in. (2006) wykazały, że również niższe poziomy tanin (2% SM) mają możliwość hamowania procesów fermentacyjnych zachodzących w żwaczu, bez możliwości regeneracji populacji drobnoustrojów. Zastosowanie systemu oceny rozkładalności pasz *in vitro* jest rozwiązaniem statycznym w porównaniu z wysoce dynamicznym systemem żwacza, w którym pasza traktowana taninami ma możliwość połączenia z innymi paszami nie zawierającymi tej grupy związków aktywnych biologicznie i ogromną populacją drobnoustrojów. McMahon i in. (2000) stwierdzili, że hamujący wpływ nawet niskich ilości tanin może odzwierciedlać ograniczoną dostępność substratu do wiązania kompleksów *in vitro*, gdzie *in vivo* jest szerszy zakres i większa dostępność substancji w żwaczu, które prawdopodobnie mogłyby obniżyć stopień, w jakim taniny hamowałyby pojedyncze populacje mikroorganizmów.

Badania własne wykazały, że taniny obecne w komonicy zwyczajnej skutecznie ograniczyły degradację BO kiszonek w żwaczu, co jest zgodne z innymi wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu tanin w kiszonkach z różnych roślin (Broderick, Albrecht, 1997; Salawu i in., 1999), a także zbieżne z wynikami dla dawek pokarmowych, w skład

których wchodziły pasze traktowane taninami (Śliwiński, Soliva, Machmüller, Kreuzer, 2002). Późniejsze badania Tabacco i in. (2006) donoszą o zmniejszeniu degradacji BO w żwaczu kiszonek z lucerny traktowanej różnymi dawkami tanin, co prowadziło do zależnego od dawki tanin wzrostu frakcji BO pokarmowego trawionego w jelicie cienkim. Stwierdzona tendencja do wyższej strawności jelitowej dla białek w kiszonce z lucerny traktowanej taninami, może wynikać z faktu, że te aktywne biologicznie związki zmniejszyły proteolizę w żwaczu w wyniku tworzenia kompleksów białkowych, odpornych na rozkład w bliskim obojętnego pH przedżołądków (McSweeney, Palmer, McNeill, Krause, 2001; Tabacco i in., 2006).

Badania przeprowadzone przez Xue i in. (2020a) oraz Xue, Wang, Yang, Li, Zhang (2020b) prezentują zbliżone wyniki dla degradacji *in vitro* SM mieszanek lucerny z kupkówką pospolitą, w zakresie od 65% do 71%, a także w przedziale od 68% do 74%, odpowiednio w stosunku do wyników własnych. Rozkładalność *in vitro* SM w badaniach własnych była zbliżona do wyników zgłoszonych przez Purwin i in. (2014a), gdzie po 48 h inkubacji *in situ* podano wynik na poziomie 65,60%, jednak wartości podane dla rozkładalności BO po 48 h inkubacji (71,50%) były znacznie wyższe w stosunku do wyników własnych. Degradacja składników pokarmowych w żwaczu, w tym przede wszystkim BO jest bardzo złożonym procesem, a jego ocena ilościowa jest ciągłym wyzwaniem dla wielu badaczy (Edmunds, Südekum, Spiekers, Schwarz, 2012). Zgodnie z Purwin i in. (2014a) degradacja BO w żwaczu warunkowana była koncentracją $N_{ogólnego}$ w paszy, składem frakcji białkowych, w tym ważny był udział frakcji ADICP. Wyższe ilości ADICP w BO kiszonek mogą prowadzić do znacznego spadku efektywności degradacji BO. Straty łatwo rozpuszczalnych składników i ewentualne produkty reakcji Maillarda w kiszonkach najprawdopodobniej wpływały na zmniejszenie degradacji BO (Purwin i in., 2014a). Zauważono, że tempo degradacji było szybsze w ciągu pierwszych kilku godzin inkubacji, co też już zostało stwierdzone w literaturze dla kiszonek z roślin bobowatych (Purwin i in., 2014a).

Uzyskane wyniki ilości SM i BO, rozłożonych *in vitro* w badanych czasookresach, jak i po zakończeniu inkubacji mogą się znacznie różnic od wyników prezentowanych w literaturze. Podstawowym kryterium jest zastosowana technika. Istotnie odmienne wyniki uzyskiwane mogą być w technice *in situ*, naśladującej warunki *in vivo*, która jest szeroko stosowana jako metoda standardowa. Technika ta dostarcza odniesień wartości, z którymi skorelowane są techniki *in vitro*. Jednak procedura jest podatna na różne źródła

błędów, w tym kolonizację pozostałości paszy przez mikroorganizmy żwacza (Edmunds i in., 2012; Krawielitzki, Schmidt, Voight, Kowalczyk, Gabel, 2006).

Reasumując przeprowadzoną analizę rozkładalności *in vitro* i kinetykę rozkładu SM oraz BO kiszonek, można było stwierdzić wpływ czynnika doświadczalnego w grupie z 50% udziałem komonicy zwyczajnej na tempo i zakres degradacji BO. Wskazany wariant potencjalnie mógłby poprawić efektywność wykorzystania BO kiszonki z lucerny w jelicie cienkim przeżuwaczy. Aktywność tanin zawartych w komonicy zwyczajnej mogłaby zostać potwierdzona także niższym tempem rozkładu BO badanej kiszonki z 50% udziałem komonicy zwyczajnej w pierwszych godzinach inkubacji prób, co stwierdzono w badaniach własnych. Jednak należy pamiętać, że degradacja BO w żwaczu jest bardzo złożonym procesem, zależnym od wielu czynników, nie tylko ilości i jakości BO pasz. Najniższy rozkład BO wskazanej grupy doświadczalnej z 50% udziałem komonicy zwyczajnej mógł pośrednio wynikać z najniższego udziału frakcji białkowej PA2 i wyższego w stosunku do grupy kontrolnej udziału frakcji PB1. Degradacja *in vitro* SM różniła się kinetyką rozkładu w poszczególnych grupach doświadczalnych kiszonek, jednak wyniki po 48 h inkubacji były zbieżne, co mogło być spowodowane różnicami w składzie węglowodanów strukturalnych i nieznacznymi dysproporcjami w ilości łatwo rozpuszczalnych składników pokarmowych zawartych w komórkach roślinnych.

7.1.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych

Analiza ogólnej liczebności bakterii, drożdży i pleśni w kiszonkach może być przydatna, gdyż te wartości często powiązane są z przebiegiem fermentacji i jakością kiszonek. Znajomość tych informacji w materiale świeżym ma ograniczoną wartość, ponieważ warunki zakiszania i różne zabiegi mogą zmienić kierunek fermentacji (Kung i in., 2018). Populacja mikroorganizmów zasiedlająca świeże rośliny znacznie różni się od zbiorowisk występujących w procesie fermentacji, czy też w produkcie końcowym. Mikroflora epifityczna zasiedlająca zielonkę z lucerny zwykle zdominowana jest przez *Enterobacteriaceae*, drożdże i pleśnie. Znacznie mniej licznie występują bakterie fermentacji mlekowej (Wu i in., 2021; Zhang, 2011). Pomimo pełnienia zasadniczej roli w konserwacji lucerny, ta grupa zwykle stanowi < 0,5% całej populacji według Lin i in. (1992). Zarodniki *Clostridium* spp. również mogą pojawić się w zielonce, a ich obecność i liczebność uwarunkowana jest przede wszystkim stopniem zanieczyszczenia glebą czy wystąpieniem opadów deszczu przed zbiorem. Patogeny te nie wchodzą jednak w skład

mikroflory epifitycznej, której różnorodność i liczebność na lucernie nie jest związana z kolejnym pokosem i/lub dojrzałością rośliny, a więdnięcie ma zwykle niewielki wpływ. Znaczącymi czynnikami są temperatura i wilgotność. Wyższe temperatury podczas więdnięcia przyczyniają się do wzrostu liczebności drożdży i pleśni. Rozdrobnienie wpływa na wzrost liczebności i wzmocnienie grupy pałeczek kwasu mlekowego, rodzajów *Pediococcus* i *Leuconostoc*. Powszechnie wiadomo, że ładunek drożdży i pleśni na rozdrobnionej lucernie wzrasta wraz z większą zawartością SM i zdolnością buforową (Lin i in., 1992; Wang i in., 2022; Wu i in., 2021).

Znaczna liczebność drożdży w kiszonkach jest zwykle związany z wysokimi stężeniami etanolu (Kung i in., 2018), czego nie potwierdzono w badaniach własnych. Ponadto grupy doświadczalne charakteryzujące się istotnie wyższą liczebnością drożdży w stosunku do grupy kontrolnej uzyskały wręcz najniższą zawartość etanolu lub też jego całkowity brak. Na podstawie czego można było stwierdzić, że obecny ładunek drożdży, a także ich aktywność była bardzo niska i nie wpływała na pogorszenie jakości profilu fermentacji sporządzonych kiszonek (Kung i in., 1998; Kung i in., 2018). Potwierdzają to dodatkowo wyniki badań zakiszonej purpurowej koniczyny preriowej (*Dalea purpurea* Vent.), zawierającej naturalnie wysoką koncentrację CT (84,5 $g \cdot kg^{-1}$ SM) (Peng i in., 2018). W badaniach tych liczebność drożdży była wyższa i wynosiła powyżej 9,0 log10 liczby kopii genu$\cdot g^{-1}$ SM, a całkowita liczebność grzybów znacznie przewyższała wyniki własne, została stwierdzona na poziomie przekraczającym 11,0 log10 liczby kopii genu$\cdot g^{-1}$ SM (Peng i in., 2018). Poza tym wzrost udziału tanin w kiszonkach, jako wynik wyższych udziałów komonicy zwyczajnej nie wpłynął na obniżenie ładunku drożdży, nie można również stwierdzić wzrostu ich liczebność. Pomimo stwierdzonych różnic statystycznych wyniki rzeczywiste nie przedstawiały zależności liniowej. Zbieżne wyniki prezentują Peng i in. (2018), którzy również nie stwierdzili wpływu tanin na zmiany w ładunku drożdży w 14 dniu fermentacji. Autorzy zgłosili istotne różnice w pierwszych 7 dniach zakiszania, co jednak jest zasadne, gdyż jest to czas w którym następują dynamiczne zmiany zarówno w produktach fermentacji, jak i liczebności mikroorganizmów (Peng i in., 2018). Inne badania przeprowadzone przez Salawu i in. (1999) oraz praca późniejsza Wang i in. (2007) wskazują, że taniny zmniejszają aktywność grzybów w kiszonkach roślin bobowatych.

Ładunek drożdży w kiszonkach odpowiada również za ich stabilność tlenową (Kung i in., 1998). Kung i in. (1998) przewidują, że stabilność tlenowa jest równa zero, gdy w kiszonce ilość drożdży wynosi ≥6,0 log10 jednostek tworzących kolonie (jtk)

w 1 g świeżej masy. Według Santos, Lock, Mechor, Kung (2015) drożdże obecne w kiszonce zmniejszają strawność włókna *in vitro*, co nie zostało potwierdzone w badaniach *in vivo*. Windle, Kung (2013) donoszą, że wysoka liczebność drożdży, powyżej 7,8 log10 jtk w 1 g kiszonki obniża smakowitość. Nie wskazano jednak bezpośredniego wpływu samych drożdży, gdyż potencjalnie negatywne skutki w skarmianiu zanieczyszczonej kiszonki mogą wynikać także ze zmian właściwości organoleptycznych pasz, wytwarzania toksycznych związków czy z kombinacji kilku czynników (Gotlieb, 2016). Zgodnie z Kung i in. (2018) przy interpretacji liczebności drożdży w kiszonce należy zachować ostrożność z kilku powodów. Do najważniejszych zalicza się podawanie całkowitej liczebności drożdży, bez rozróżnienia na grupę asymilatorów mleczanu. Następnie ładunek drożdży nie odzwierciedla ich zdolności metabolicznych, tak więc kiszonka z umiarkowanym ładunkiem drożdży zależnie od rośliny może być nadal stosunkowo stabilna tlenowo. Po trzecie niektóre drożdże w bardzo niskich udziałach mogą inicjować tlenowe psucie się. Kiszonki, które już uległy zepsuciu mogą zawierać bardzo mało drożdży i pleśni, ponieważ mikroorganizmy te obumarły z powodu braku substratów. Należy pamiętać, że liczba drożdży i pleśni może też znacznie wzrosnąć od momentu pobrania próby kiszonki do przybycia do laboratorium (Kung i in., 2018).

Niższa jakość zakiszania jest zwykle spowodowana aktywnością niepożądanych mikroorganizmów, takich jak *Clostridium* spp. i *Enterobacter* spp. (Ni i in., 2020). Liczebność *Clostridium* spp. w analizowanych kiszonkach uzyskała najniższe wartości. Stwierdzona obecność *Clostridium* spp. była wyższa względem kiszonek z traw (poniżej 4,5 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM) w badaniach Fijałkowska i in. (2019). Bakterie *Clostridium* spp. nie tolerują wysokiego ciśnienia osmotycznego w komórkach roślinnych, a ich wzrost jest szybszy w kiszonkach o niskiej SM (Krzywiecki i in., 2008). W związku z właściwym poziomem SM i bardzo niskiej zawartości kwasu masłowego, można wnioskować o niskim znaczeniu i aktywności oznaczonej liczebności *Clostridium* spp., która wynikać mogła ze znacznej obecności form przetrwalnikujących (Kung i in., 2018). König i in. (2017) zgłosili, ze zawartość kwasu masłowego była bardzo słabo skorelowana (R^2 = 0,280) z liczbą kopii genów 16S rDNA w *Clostridium* spp., co też by mogło wyjaśnić oznaczony ładunek bakterii względem znikomych ilości kwasu masłowego (< 0,01 g·kg^{-1} SM) w badaniach własnych. Silniejszą korelację (R^2 = 0,397) stwierdzili Fijałkowska i in. (2019), co wskazuje, że poza szeregiem czynników determinujących zawartość kwasu masłowego ważny jest ładunek *Clostridium* spp.

Do głównej grupy mikroorganizmów stymulujących rozkład materii roślinnej w warunkach tlenowych i beztlenowych obok drożdży należą bakterie *Bacillus* spp. Wysokiej jakości surowiec fermentuje skutecznie, jednak kiszonki sporządzone z rozdrobnionej zielonki zatrzymują więcej tlenu i są bardziej obficie skolonizowane przez *Bacillus* spp. (Fijałkowska i in., 2019; McEniry, O'Kiely, Clipson, Forristal, Doyle, 2008). Gatunki *Bacillus* spp. są zdolne do metabolizowania węglowodanów do kwasów organicznych w warunkach beztlenowych (Cruz i in., 2000). Różnice w składzie LKT i pH kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej można wytłumaczyć działaniem *Bacillus* spp. podczas przedłużonej początkowej fazy aerobowej. Pewne gatunki *Bacillus* spp. wyróżniają wysokie proporcje kwasów tłuszczowych, ponadto produkują one kwasy organiczne, takie jak kwas cytrynowy i bursztynowy. Zdolne są do aktywności i wzrostu w obecności kwasów kiszonkarskich, głównie kwasu mlekowego (Brillard, 2015; Yan, Zheng, Chen, Han, 2013).

Całkowita liczebność bakterii w badanych kiszonkach była zbliżona do wyników zgłoszonych dla samodzielnie zakiszonej lucerny (9,4 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM) w badaniach Hartinger, Kube, Gresner, Südekum (2020). Peng i in. (2018) podobnie jak w badaniach własnych nie stwierdzili wpływu tanin na zmiany w ładunku bakterii. Odmienne zdanie przestawili Wang i in. (2007), którzy współzakiszając lucernę z esparcetą, jako naturalnym źródłem tanin, zgłosili obniżenie populacji bakterii wraz ze wzrostem udziału esparcety/tanin. Zasadniczo zróżnicowane społeczności drobnoustrojów powinny uwzględniać różnice w jakości kiszonek (Ni i in., 2018). Dlatego też dysproporcje w produktach fermentacji uzyskane w kiszonkach doświadczalnych wydawałyby się nie wynikać z całkowitego ładunku bakterii, ale z różnic we względnym składzie na poziomie rodzaju (Hartinger i in., 2020). Uzyskana całkowita liczebność *Lactobacillus* spp. była niższa niż w kiszonce z lucerny (9,2 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM) w badaniach Hartinger i in. (2020). Zbliżone wartości ładunku *Lactobacillus* spp. do wyników własnych zgłosili Fijałkowska i in. (2019) dla kiszonki z traw (8,5 – 9,0 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM). *Lactobacillus* spp. są głównym rodzajem reprezentującym bakterie fermentacji mlekowej, której dominacja jest uzasadniona w optymalnych warunkach przebiegu zakiszania roślin. Zwykle też taniny negatywnie wpływają na wzrost bakterii fermentacji mlekowej (Chen i in., 2021b). Szkodliwa mikrobiota także może obniżyć ładunek *Lactobacillus* spp. (Pahlow i in., 2003). Nie zawsze na poziomie rodzaju ładunek bakterii świadczy o ich aktywności, ponieważ udowodniono, że tylko niektóre bakterie rodzaju *Lactobacillus* charakteryzują

się stabilną aktywnością enzymatyczną, wykazując wyższą przydatność podczas fermentacji roślin (Paya, Taghizadeh, Lashkari, 2015; Yang, Cao, Cai, Terada, 2010). Doniesienia Ke i in. (2022) potwierdzają wpływ tanin na liczbowo wyższe bogactwo ładunku bakterii w kiszonce z lucerny, czego nie stwierdzono statystycznie w badaniach własnych. Ponadto uzyskane wyniki nie potwierdzają mniejszej różnorodności mikrobiomu bakteryjnego w skutek działania tanin, co wykazali Ke i in. (2022). Kiszonki z grupy o wyższych udziałach komonicy zwyczajnej (40% i 50%) charakteryzowały się większym zróżnicowaniem mikrobiomu, co może wskazywać na brak działania bakteriostatycznego tanin wobec wybranych rodzajów bakterii (Farha i in., 2020). Wyraźne różnice w mikrobiomie bakteryjnym sugerują, że 50% udział komonicy zwyczajnej zmienił populację bakterii. Zawarte w komonicy zwyczajnej taniny mogły sprzyjać wzrostowi rodzajów *Loigolactobacillus*, *Lactiplantibacillus* i *Lentilactobacillus*, których obecność stwierdzono w znacznie wyższym udziale procentowym względem grupy kontrolnej, a wobec innych mogły wykazywać działanie inhibitujące, jak na przykład w stosunku do rodzaju *Weissella* (Waghorn, 2008; Wang, McAllister, Acharya, 2015).

Analiza struktury mikrobiomu bakteryjnego na poziomie rodzaju kiszonki z esparcety wykazała, że wśród najliczniejszych rodzajów znalazły się *Lactobacillus* (90,56%), *Weissella* (3,85%), *Pediococcus* (3,38%) i *Enterobacter* (1,04%) (Huang i in., 2022). Powszechnie wiadomo, że większość bakterii biorących udział w fermentacji mlekowej kiszonek należy do rodzajów *Lactobacillus*, *Pedicoccus*, *Weissella* i *Leuconostoc* (Ni i in., 2018). *Weissella* spp., która dominowała we wszystkich kiszonkach, jest uważana za rodzaj o charakterze wczesnego kolonizatora. W późniejszych fazach bakterie te są zastępowane przez *Lactobacillus* spp., wraz ze spadkiem pH w miarę postępu procesów fermentacyjnych (Graf, Ulrich, Idler, Klocke, 2016), co nie znalazło statystycznego potwierdzenia w strukturze mikrobiomu bakteryjnego kiszonek własnych. Cai, Benno, Ogawa, Ohmomo, Kumai (1998) wykazali, że *Weissella* był heterofermentacyjnym rodzajem, który nie mógł rosnąć poniżej pH = 4,5, co by mogło częściowo wyjaśnić znaczny udział *Weissella* spp. w badaniach własnych, gdzie kiszonki po 90 dniach fermentacji miały pH powyżej 4,7. Porównując jednak uzyskane wyniki z badaniami zespołu Huang i in. (2022), trudno było wyjaśnić tak wysoki udział rodzaju *Weissella*, jedynie można sugerować się kwasowością kiszonek. Huang i in. (2022) wykazali wysokie udziały *Weissella* spp. z poziomu 31,83% w trzecim dniu fermentacji, które sukcesywnie obniżały swoją populację do 60 dnia

zakiszania esparcety. Trudno było ustalić jednoznacznie powód istotnie niższej liczebności rodzaju *Weissella* w kiszonce z 50% udziałem komonicy zwyczajnej. Można sugerować się właściwościami tanin, które mogły ograniczać wzrost bakterii (Ke i in., 2022).

Proces fermentacji lucerny traktowanej taninami hydrolizującymi (HT) i CT w doświadczeniu Ke i in. (2022) został zdominowany przez rodzaj *Enterococcus*, zarówno w grupie kontrolnej, jak i doświadczalnej, zwłaszcza przy zastosowaniu HT. Ke i in. (2022) zgłosili, że na poziomie rodzaju dominującymi bakteriami w samodzielnie zakiszonej lucernie były *Enterococcus* (55,17%), *Lactobacillus* (27,50%) i *Pediococcus* (11,70%). Zastosowanie HT zwiększyło liczebność *Enterococcus* spp. (73,68%) i zmniejszyło udział *Lactobacillus* spp. (18,48%). Najwyższe proporcje *Lactobacillus* spp. (50,04%) i *Enterococcus* spp. (41,25%) obserwowano w kiszonce z CT. Cytowane wyniki dowodzą różnorodnego wpływu obu rodzajów tanin na różność społeczności bakteryjnej kiszonki z lucerny. W badaniach własnych oparto się jedynie o całkowitą zawartości tanin w komonicy zwyczajnej, bez wyodrębnienie ich grup, co może mogłoby wpłynąć w przyszłości na lepsze zrozumienie działania rośliny w zakiszaniu lucerny (Ke i in., 2022). Podobnie Ni i in. (2017) zgłosili wyniki dotyczące dominacji rodzaju *Enterococcus* w zakiszaniu lucerny, co absolutnie nie znalazło potwierdzenia w stosunku do badań własnych, gdzie najwyższy udział tego rodzaju wynoszący jedynie 1,46% odnotowano w grupie z 50% udziałem komonicy zwyczajnej. Według Ni i in. (2017) rodzaje *Enterococcus*, *Erwinia* i *Methylobacterium* były trzema głównymi we wstępnie zakiszonej lucernie, a względna liczebność *Enterococcus* spp. przekraczała 30%. McGarvey i in. (2013) zaobserwowali, że *Enterobacter* spp. stanowił 40,26% wszystkich sekwencji lucerny, jednak względna liczebność rodzaju *Pantoea* wynosiła zaledwie 1,10%. Mikrobiom bakteryjny kiszonek doświadczalnych nie obejmował rodzaju *Enterobacter*, a udział *Pantoea* spp. był zbliżony dla wybranych wariantów. *Enterobacter* spp. nie namnaża się, a ich żywotność obniża się przy pH niższym niż 4,5 do 5,0. Szybki i wystarczający spadek pH w pierwszych fazach fermentacji zmniejsza zatem ich wzrost i może skutkować bardzo niską ich przeżywalnością. Brak obecności tego rodzaju bakterii w kiszonkach może być wynikiem szybkiego zakwaszenia w pierwszej fazie fermentacji i efektywnego zagęszczenia, gdyż tlen może przedłużać przeżywalność tego rodzaju. Bakterie te, które znajdują się w dojrzałej kiszonce mogą ponownie wzrastać w wyniku wzrostu pH (Driehuis, Elferink, 2000).

Badania Bao i in. (2016) wykazały, że rodzaje *Enterobacter*, *Weissella*, *Pantoea* i *Bacillus* najliczniej reprezentowały mikrobiom bakteryjny zakiszonej lucerny, co jest bardziej zgodne z wynikami własnymi. Rodzaje *Pantoea* i *Bacillus* uzyskały najwyższe udziały odpowiednio w grupie z 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej. Zwiększona obfitość *Pantoea* spp. może przyczynić się do zmniejszenia N-NH_3, biorąc pod uwagę, że Ogunade i in. (2018b) również wykazali tę zależność. Jednak nad podstawie badań własnych nie można tego potwierdzić, gdyż pomimo najwyższego udziału *Pantoea* spp. uzyskano także jedną z wyższych koncentracji N-NH_3. Zhao i in. (2021) w samodzielnie zakiszonej lucernie zgłosili główny udział rodzajów *Enterobacter* (29,68%), *Hafnia-Obesumbacterium* (19,71%), *Weissella* (13,14%), *Lelliottia* (11,05%) i *Lactococcus* (9,46%). Rodzaje *Weissella* i *Lactococcus* uznawane są za inicjatory fermentacji w nieprzetworzonej lucernie (Yuan, Li, Dong, Shao, 2020). Względna obfitość rodzajów *Weissella* i *Leuconostoc* była bardzo nieliczna we wszystkich kiszonkach z lucerny w badaniach Huo i in. (2022), co było zgodne z ustaleniami Ogunade i in. (2018b), którzy doszli do wniosku, że czynnikiem zmniejszającym względną liczebność *Weissella* spp. może być zastosowanie bakterii fermentacji mlekowej jako dodatku do zakiszania lucerny. W badaniu Zhao i in. (2021) dominującymi rodzajami bakterii fermentacji mlekowej po zakiszeniu były *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Weissella*, wśród nich *Lactobacillus* odgrywał kluczową rolę. Rodzaj ten może wytwarzać kwas mlekowy, obniżać pH, zmniejszać względną obfitość niepożądanych bakterii i często staje się dominującym rodzajem w różnych rodzajach wysokiej jakości kiszonek (Filya, Muck, Contreras-Govea, 2007; Wang, Gao, Wu, Yu, 2020). W badaniu Zhao i in. (2021) względna liczebność *Lactobacillus* spp. (< 5%) w grupie z kiszonką z lucerny była bardzo niska przez cały okres fermentacji, co także zaobserwowano w wynikach własnych.

Bakterie rodzaju *Pediococcus* wzrastają energicznie i inicjują fermentację mlekową we wczesnej fazie zakiszania, podczas gdy wraz ze spadkiem pH będą stopniowo zastępowane przez *Lactobacillus* spp. (Ni i in., 2017). Jednak wyższa względna liczebność *Pediococcus* w grupie z 20% udziałem komonicy zwyczajnej może być związana z opóźnionym tworzeniem się kwaśnego środowiska (Yang i in., 2019). Gatunki *Pediococcus* spp. rosną szybko podczas zakiszania, gdy pH wynosi od 5,0 do 6,5 (Kung i in., 2003a; Mcdonald i in., 1991). *Ligilactobacillus*, ten rodzaj bakterii fermentacji mlekowej, składający się z byłych przedstawicieli *Lactobacillus*, obejmuje Gram-dodatnie, nietworzące przetrwalników bakterie homofermentacyjne (Tohno i in., 2022). Uznawany jest za dominujący rodzaj bakterii fermentacji mlekowej w późniejszym

stadium kiszenia, podobnie jak rodzaje *Lentilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Secundilactobacillus* i *Levilactobacillus*, a także *Lactococcus* (Fan i in., 2022). Po 56 dniach w kiszonce z lucerny w badaniach Hu i in. (2020) dominowały rodzaje *Lactobacillus* (75,10%), *Pediococcus* (9,30%), *Enterococcus* (6,70%). *Lactobacillus* spp. może fermentować heksozę w celu wytworzenia kwasu mlekowego u gatunków homofermentacyjnych lub fermentować heksozę i pentozę w celu wytworzenia równych ilości kwasu mlekowego i kwasu octowego u gatunków heterofermentacyjnych (Muck i in., 2018; Parvin, Nishino, 2009). W badaniach własnych jednak rodzaj *Lactobacillus* mógł w najwyższym stopniu odpowiadać za produkcję kwasu mlekowego w grupie z 20% i 40% udziałem komonicy zwyczajnej. Wiele badań wskazuje na dominację *Lactobacillus* spp. w kiszonkach, w tym z lucerny (McGarvey i in., 2013, Zheng, Niu, Jiang, Zuo, Xu, 2017). Znacznie niższy udział rodzaju *Lactobacillus* w kiszonkach doświadczalnych można tłumaczyć wyższą aktywnością i lepszymi warunkami do rozwoju i aktywności dla innych rodzajów bakterii fermentacji mlekowej, w tym możliwie niewystarczające ilości substratów (Hu i in., 2020).

Rodzaj *Synechococcus* stanowiący drugi co do liczebności w grupie kontrolnej i w grupach z 10% oraz 20% udziałem komonicy zwyczajnej, należy do cyjanobakterii. Ten rodzaj jest bardzo powszechny, co zawdzięcza niezwykłej zdolność przystosowania się do wysokich i niskich temperatur (Callieri, 2017). He i in. (2020) zgłosili, że na poziomie gromady cyjanobakterie stanowiły jedno z trzech głównych zbiorowisk w kiszonce z liści drzewa *Neolamarckia cadamba*, które są bardzo zasobne w taniny (40 g HT i 60 g CT·kg^{-1} SM) (He i in., 2018). Cyjanobakterie charakteryzują się obfitym wzrostem i szeroką gamą generowanych produktów, ciesząc się dużym zainteresowaniem w przemyśle farmaceutycznym i biotechnicznym (Heberline, 2017). Dominacja tego rodzaju w wybranych kiszonkach była bardzo ciekawa i warta dalszej uwagi, gdyż dotychczas nie odnaleziono więcej informacji o ich obecności w zakiszonej lucernie.

Podsumowując skład mikrobiologiczny kiszonek, a w szczególności brak obfitości rodzaju *Enterobacter*, przy dominacji rodzajów *Weissella*, *Loigolactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lentilactobacillus* i pewnej obfitości rodzajów *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Levilactobacillus* oraz *Latilactobacillus* sugeruje dominującą fermentację kwasu mlekowego we wszystkich kiszonkach (Kung i in., 2018; Ni i in., 2017; Ni i in., 2018; Pahlow i in., 2003). Zróżnicowanie społeczności bakteryjnej może być jednym z krytycznych czynników prowadzących do różnic w jakości kiszonki i ilości produktów fermentacji (Kung i in., 2018; Muck i in., 2018). Pomimo braku krytycznych dysproporcji

w jakości fermentacji, większe zainteresowanie wzbudził zróżnicowany mikrobiom bakteryjny kiszonek doświadczalnych. W niniejszym badaniu zróżnicowanie struktury społeczności bakteryjnej było większe, gdy zastosowano 50% udział komonicy zwyczajnej, co może wynikać nie tylko z różnic międzygatunkowych roślin, a co za tym idzie dysproporcji w ilości i jakości mikroflory epifitycznej, ale także różnych oddziaływań synergistycznych i antagonistycznych pomiędzy konkretnymi rodzajami bakterii. Zróżnicowanie mikrobiomu mogło być wynikiem bardzo dobrego przystosowania się do warunków zakiszania wybranych rodzajów bakterii (Zheng i in., 2017). Wysoka różnorodność mikrobiomu przy dominującym udziale bakterii fermentacji mlekowej może sugerować intensywny i satysfakcjonujący przebieg fermentacji (Kraut-Cohen i in., 2016). Grupa kontrolna, jak i kiszonki lucerny z niższymi udziałami komonicy zwyczajnej nie miały tak bogatego mikrobiomu bakteryjnego, co wskazuje, że zakiszanie jest procesem stymulowanym przez mikroorganizmy, a synergiczne działanie różnych drobnoustrojów jest kluczem do poprawy jakości fermentacji (Ni i in., 2018). Liczebności drożdży i *Clostridium* spp. w kiszonkach towarzyszyły niewielkie, mieszczące się w normach poziomy etanolu i kwasu masłowego, co mogło być wynikiem obecności tych mikroorganizmów, wykorzystujących spadek aktywności bakterii kwasu mlekowego pod koniec fermentacji (McEniry i in., 2008). Metagenomikę przeprowadzono na poziomie rodzaju, co jest bardziej miarodajne w ocenie różnorodności i struktury zbiorowiska bakteryjnego w stosunku do poziomu gromady, ale nadal zbyt niewystarczające do wyjaśnienia wszystkich zależności i identyfikacji bakterii na poziomie szczepu lub nawet gatunku, co lepiej tłumaczyłoby uzyskane wyniki względem współzakiszania lucerny z zasobną naturalnie w taniny komonicą zwyczajną (Kraut-Cohen i in., 2016).

7.2. Zadanie badawcze II

7.2.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek

Zawartość BO zielonki z lucerny w badaniach własnych była zbieżna z wynikami prezentowanymi przez Tyrolová, Výborná (2008), gdzie średnio w fazie od początku do momentu pełnego pąkowania lucerny wykazano 219,6 – 203,1 g BO·kg^{-1} SM. Zgodnie z zaleceniami Undersander i in. (2004) zbiór lucerny powinien odbyć się przy możliwie najwyższym plonie o wysokiej jakości, który przypada właśnie na fazę od początku do zakończenia pąkowania włącznie. Taki też termin zbioru rośliny zastosowano w przeprowadzonym doświadczeniu. Lucerna zebrana w tej samej fazie dojrzałości

w badaniach Hartinger i in. (2019) w wariancie o zbliżonej zawartość SM (339 g·kg^{-1} FM) charakteryzowała się podobnymi wartościami BO (213 g·kg^{-1} SM), NDF (421 g·kg^{-1} SM) i ADF (336 g·kg^{-1} SM), jednak ADL (95 g·kg^{-1} SM) był o 39,37 g·kg^{-1} SM wyższy w stosunku do wyników własnych. Sousa, Hansen, Hallina, Nussio, Nadeau (2020) przeanalizowali wybrane składniki odżywcze w różnych odmianach lucerny w ciągu dwóch lat użytkowania plantacji, a zbiór był prowadzony w fazie od pąkowania do wczesnego kwitnienia. W porównaniu do wyników własnych zielonki z lucerny w I roku doświadczenia zespołu badawczego Sousa i in. (2020) średnio uzyskiwały zbliżoną ilość BO (205 – 213 g·kg^{-1} SM) i NDF (387 – 422 g·kg^{-1} SM). Wyższe wartości Autorzy (Sousa i in., 2020) zgłosili w II roku użytkowania plantacji lucerny, zarówno zawartość BO, jak i NDF były korzystniejsze względem wyników własnych i wynosiły odpowiednio 208 – 224 g oraz 364 – 376 g·kg^{-1} SM. Dysproporcje w zawartości poszczególnych frakcji węglowodanów strukturalnych w zielonce z lucerny w badaniach własnych względem cytowanych wyników można wytłumaczyć stopniem lignifikacji ścian komórkowych, który zależy od wielu czynników, głównie od fazy wegetacji i warunków klimatycznych (Ziebell i in., 2010). W badaniach własnych uzyskano korzystną wartość wskaźnika L/NDF (0,14), który docelowo w lucernie o wysokiej jakości pokarmowej powinien wynosić od 0,11 do 0,20 według Grant (2013).

Zielonka w badaniach własnych uzyskała wyższą koncentrację WSC (68,37 g·kg^{-1} SM) i niższą pojemność buforową (58,42 g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM) w stosunku do średnich zgłoszonych przez Weissbach, Auerbach (2013), które wynosiły 60 g·kg^{-1} SM i 80 g kwasu mlekowego·kg^{-1} SM, odpowiednio. Konsekwentnie wskaźnik WSC/BC w badaniach własnych przyjął wartości wyższe (1,17) względem średnich podanych przez Weissbach, Auerbach (2013) (0,80). Sousa i in. (2020) stwierdzili znacznie niższe udziały WSC (30,70 – 41,10 g·kg^{-1} SM w I roku, 42,40 – 47,70 g·kg^{-1} SM w II roku zbioru), podobnie jak Tyrolová, Výborná (2008) (37,40 g·kg^{-1} SM w fazie początku pąkowania i 45,30 g·kg^{-1} SM w fazie pąkowania) dla zielonki z lucerny. Koncentracja WSC w lucernie zwykle określana jest na niskim poziomie jako cecha gatunkowa rośliny (Morin i in., 2011). Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować o wystarczającej ilości substratu węglowodanowego do prawidłowego przebiegu fermentacji (Weissbach, Auerbach, 2013). Ponadto zielonka w badaniach własnych uzyskała wartość współczynnika FC powyżej zalecanego poziomu (>35) dla zadowalającego przebiegu fermentacji (Chen i in., 2014).

Łuska bobiku jest jednym z produktów ubocznych powstających podczas przerobu nasion bobiku, czy też jego uszlachetniania. Krenz, Grebenteuch, Zocher, Rohn, Pleissner (2023) dokonali szerokiego przeglądu literatury na temat składu chemicznego i przydatności paszowej łuski bobiku, której główną frakcją w składzie chemicznym są węglowodany, w tym włókno pokarmowe stanowiące średnio 781 g·kg^{-1} SM. Wyniki własne dla łuski bobiku były zbieżne ze średnimi wartościami cytowanymi przez Krenz i in. (2023) dla BO (81,50 g·kg^{-1} SM), TS (6,80 g·kg^{-1} SM) i WS (457,5 g·kg^{-1} SM). W badaniach własnych uzyskano znacznie wyższą zawartość PS (51,93 g·kg^{-1} SM) względem średnich wartości podanych (31,80 g·kg^{-1} SM), jednak była to wartość zbliżona do maksymalnych wyników zamieszczonych w pracy Krenz i in. (2023) (55 g·kg^{-1} SM). Frakcje węglowodanów włóknistych łuski bobiku w większości składały się z celulozy oraz w mniejszym stopniu z hemicelulozy i ligniny, a zawartość frakcji NDF, ADF i ADL w badaniach Minakowski, Skórko-Sajko, Falkowska (1996) była następująca 542,7 g, 530,4 g i 2,79 g·kg^{-1} SM. Wyniki własne potwierdziły udział NDF i ADF, natomiast stwierdzona ilość ADL była znacznie wyższa w porównaniu do wyników uzyskanych przez Minakowski i in. (1996). Własny wynik dla ADL w łusce bobiku był zbieżny ze średnią podaną przez Krenz i in. (2023), która wynosiła 64,0 g·kg^{-1} SM.

Zawartość tanin w łusce bobiku w badaniach własnych można uznać za wysoką względem danych zgłoszonych przez Ivarsson, Grudén, Södergren, Hultberg (2021), którzy odnotowali wartość 18,90 g·kg^{-1} SM dla odmiany bobiku o kolorowych kwiatach. Jansman, Verstegen, Huisman, van den Berg (1995) stwierdzili 3,50 g tanin·kg^{-1} SM łuski bobiku odmiany wysokotaninowej. Jeszcze wcześniejsza praca zespołu van der Poel i in. (1991) donosi, że zawartość tanin w łusce bobiku może wahać się od 58 g, aż do 76 g·kg^{-1} SM, co należałoby uznać za wyniki bardzo wysokie, co najmniej dwukrotnie wyższe od wyników własnych. Koncentracja tanin w łusce bobiku uwarunkowana jest wieloma czynnikami, ale do najważniejszych należy odmiana, z której pozyskano produkt uboczny, a następnie należy zwrócić uwagę na metodę analityczną wykorzystaną do oznaczenia poziomu tanin. Pomimo to, bardzo ważnym aspektem jest technologia pozyskiwania łuski, jakość procesu obłuszczania, który będzie w dużej mierze warunkował cały skład chemiczny odzyskanej łuski bobiku, w tym głównie wpłynie na koncentrację BO, tanin i możliwie wyższe wartości PS, wśród których mogą znaleźć się drobne nieorganiczne zanieczyszczenia (Carmo i in., 2020; Krenz i in., 2023; Neacsu i in., 2017; Singh i in., 2017). Wśród polskich odmian krajowych powszechnie dostępnych i uprawianych wybrana do przeprowadzenia doświadczenia odmiana Bobas,

jako źródło łuski jest zaliczana do odmian wysokotaninowych (Przywitowski, Mikulski, Zduńczyk, Rogiewicz, Jankowski, 2016; Świątkiewicz, Księżak, Hanczakowska, 2018).

Uzyskane parametry chemiczne kiszonki bez zastosowania dodatków wynikały z dobrej jakości surowca przed zakiszeniem (Borreani i in., 2018; Kung i in., 2018). Wyższa zawartość TS we wszystkich sporządzonych kiszonkach doświadczalnych w stosunku do zawartości w zielonce i łusce bobiku mogła wynikać z udziału w tej frakcji produktów procesu fermentacji (McDonald i in., 1991). Grupa kontrolna w badaniach własnych charakteryzowała się wartościami BO, NDF i ADF porównywalnymi do wyników zgłoszonych w literaturze. Zespół Lin i in. (2023) dla dwóch kiszonek spośród badanych odmian lucerny uzyskał zbieżne wyniki, mianowicie było to 185,3 g BO, 387,5 g NDF i 305,3 g ADF, a także 204,2 g BO, 374,2 g NDF i 281,3 g ADF w 1 kg SM. W badaniach przeprowadzonych przez Ke i in. (2018) kiszonka z lucerny charakteryzowała się nieco wyższymi wartości BO, NDF i ADF (215 g, 409 g, 312 $g \cdot kg^{-1}$ SM, odpowiednio), a wartości te zostały potwierdzone w późniejszej pracy zespołu Ke i in. (2022) (217 g BO, 403 g NDF, 273 g ADF w 1 kg SM).

Wzrost zawartość SM w sporządzonych kiszonkach wraz ze wzrostem udziału zarówno łuski bobiku, jak i słomy pszennej był charakterystyczny dla zastosowania absorbentów (Kung i in., 2018; Muck i in., 2018). Wykorzystanie wysokowłóknistych materiałów roślinnych, takich jak łuska bobiku lub też słoma pszenna, pomimo dużej chłonności, istotnie obniża jakość paszową kiszonek, co również stwierdzono w badaniach własnych (Yin, Wu, Tian, Wang, Zhang, 2021). Cechą charakterystyczną zastosowania wysokowłóknistych materiałów było pogorszenia jakości składu węglowodanów strukturalnych, zmniejszenie ilości łatwostrawnej hemicelulozy, a wzrost udziału celulozy i ligniny, przy jednoczesnym obniżeniu koncentracji BO, co było adekwatne z wartościami stwierdzonymi dla sporządzonych kiszonek własnych (Chen, Sharma-Shivappa, Chen, 2007; Larsen, Hjort-Gregersen, Heidarzadeh-Vazifehkhoran, Triolo, 2017). Słoma pszenna zwykle składa się w 86% do nawet 95% z SM, a dominującymi związkami organicznymi są lignocelulozy, zbudowane głównie z celulozy i w mniejszym stopniu z hemiceluloz. Skład słomy pszennej jest bardzo dobrze znany w literaturze i zwykle nie podlega on zbyt znacznym zmianom. W składzie chemicznym 1 kg SM słomy pszennej odnotowuje się zwykle około 36,0 – 46,3 g BO, 4,9 g TS, nawet do 769,3 g NDF i 485,2 g ADF (Khan, Mubeen, 2012; Larsen i in., 2017; Ni, Wang, Pang, Cai, 2014). Podobnie łuska bobiku składa się głównie z frakcji wysokowłóknistych, które w większości stanowi celuloza. W stosunku do słomy

pszennej, łuska bobiku charakteryzuje się zwykle prawie dwukrotnie wyższą zawartością BO, średnio jest to 80 g·kg^{-1} SM (Krenz i in., 2023). W wynikach własnych zaobserwowano, że przy tych samych poziomach dodatku absorbującego, kiszonki zawierające łuskę bobiku uzyskiwały wyższe wartości BO.

Zawartość WSC w słomie pszennej, jak i w łusce bobiku, jest zwykle bardzo niska, co może prowadzić do ograniczonej fermentacji i wzrostu pH podczas zakiszania (Krenz i in., 2023; Larsen i in., 2017). Początkowa wartość WSC zielonki z lucerny mieściła się w zakresie 60 – 70 g·kg^{-1} SM, uznawanym za niezbędny do osiągnięcia dobrego i stabilnego przebiegu fermentacji (Zheng i in., 2018). Nie wykazano wpływu rodzaju i dawki dodatku na zawartość WSC pozostałego w kiszonkach, wszystkie kiszonki charakteryzowała niska i wyrównana zawartość WSC resztkowego, porównywalna z wynikami Ke i in. (2018) (8,58 g·kg^{-1} SM). Tao i in. (2019) oraz Lin i in. (2023) zgłosili średnio dwukrotnie wyższe ilości WSC w kiszonce z lucerny.

Typowa wartość pH kiszonki z roślin bobowatych waha się w przedziale 4,30 – 5,00 (Kung i in., 2018). W badaniu własnym wartości pH kiszonek uplasowały się w granicach wartości 4,83 – 5,15. Różnice w kwasowości kiszonek w porównaniu z danymi literaturowymi mogą wynikać z heterogenicznego składu chemicznego różnych wariantów kiszonek, a także zmienności w społeczności drobnoustrojów zasiedlających lucernę, jak i zastosowanych dodatków Tremblay, Belanger, McRae, Michaud (2001). Według Kung i in. (2018) wysokie wartości pH (>5,00) towarzyszą zawartości SM oscylującej na poziomie 30%, a wraz ze wzrostem SM do 35% obniża się, powyżej 40% do 45% SM natomiast pH kiszonek ponownie wzrasta.

Według Kung i in. (2018) kiszonka z roślin motylkowatych powinna zawierać od 20 do 80 g·kg^{-1} SM kwasu mlekowego, zależnie od zawartości SM. W badaniach własnych koncentrację kwasu mlekowego należy uznać za niską i bardzo niską, gdyż stwierdzone wartości mieściły się w zakresie od 17,31 g do maksymalnie 36,16 g·kg^{-1} SM. Zbieżnie niskie zawartości kwasu mlekowego zgłosili także Lin i in. (2023) dla wybranych odmian zakiszonej lucerny (19,34 – 42,27 g·kg^{-1} SM), przy pH 4,49 – 5,36. Jedna z badanych odmian uzyskała znacznie wyższą zawartość kwasu mlekowego (54,02 g·kg^{-1} SM) przy pH wynoszącym 4,59 (Lin i in., 2023). Podobnie Wang i in. (2019) również odnotowali bardzo niską zawartość kwasu mlekowego (14,40 g·kg^{-1} SM) i pH powyżej 5,00 (5,12) w kiszonce z lucerny. Powodem niskiej zawartości końcowej kwasu mlekowego w kiszonkach, przede wszystkim z najwyższą dawką łuski bobiku i słomy pszennej mogła być ograniczona ilość WSC i wzrastające ciśnienie osmotyczne

wynikające ze wzrostu zawartości SM (Muck, Moser, Pitt, 2003). Niskie końcowe wartości kwasu mlekowego można by również tłumaczyć możliwością konwersji kwasu mlekowego do innych produktów fermentacji, jak na przykład kwas octowy, kwas masłowy, 1,2-propanodiol czy etanol, co jest wynikiem działalności różnych grup mikroorganizmów (Elferink i in., 2001).

Koncentrację kwasu octowego należy uznać za niską w porównaniu do typowych ilości w kiszonkach roślin bobowatych (5 – 30 g·kg^{-1} SM) (Kung i in., 2018). Wyniki własne potwierdzają, że podobnie jak w przypadku kwasu mlekowego, koncentracja kwasu octowego była zwykle odwrotnie proporcjonalna do zawartości SM, w szczególności znalazło to potwierdzenie dla kiszonek z 24,0% łuski bobiku oraz 24,0% słomy pszennej (Kung i in., 2018; McDonald i in., 1991). Lin i in. (2023) pomimo niskich zawartości kwasu mlekowego odnotowali znacznie wyższe w stosunku do wyników własnych ilości kwasu octowego (15,13 – 33,46 g·kg^{-1} SM). Natomiast Wang i in. (2019) przy niższej koncentracji kwasu mlekowego w stosunku do badań własnych, zgłosili zbliżone wartości dla kwasu octowego w kiszonce z lucerny (6,40 g·kg^{-1} SM).

Dobrej jakości kiszonki, charakteryzujące się poprawnym przebieg procesu fermentacji mają zwykle stosunek kwasu mlekowego do octowego na poziomie 2,50 – 3,00 (Kung i in., 2018). W badaniach własnych uzyskano nieco wyższy przedział wartości omawianego wskaźnika (4,14 – 7,16), co zostało potwierdzone dla kiszonek z roślin bobowatych (Muck, Kung, 1997). Stosunek kwasu mlekowego do octowego w kiszonce powyżej 3,00 wskazuje na fermentację homolaktyczną, a wynik niższy niż 3,00 to fermentacja heterolaktyczna (Zhang, Xin, Hua, 2010). Wszystkie kiszonki własne uzyskały wartości powyżej 3,00, co wskazywało na fermentację homolaktyczną.

Większość kiszonek zwykle zawiera bardzo niskie ilości kwasu propionowego (<2 do 3 g·kg^{-1} SM), jedynie bardzo wysoka zawartość wody powoduje wzrost jego udziału (< 25% SM) (Kung i in., 2000). Uzyskane wyniki potwierdzają, że w kiszonkach o optymalnej zawartości SM (35 – 35%) kwas propionowy może być słabo wykrywalny (<1 g·kg^{-1} SM) (Kung i in., 2018). Dla kiszonek dobrej jakości podobnie niskie wartości (<5 g·kg^{-1} SM) powinien przyjmować kwas masłowy zgodnie z doniesieniami Kung i in. (2018). Słabo wykrywalna ilość tego kwasu w badaniach własnych (<0,60 g·kg^{-1} SM) wskazuje na wysoką jakość i brak strat SM (Pahlow i in., 2003), a przede wszystkim potwierdza, że w trakcie zakiszania lucerny nie wystąpiła wtórna fermentacja (Weissbach, Honig, 1992). Należy sugerować się, że głównym czynnikiem inhibitującym

działalność *Clostridium* spp. i ograniczającym możliwość wystąpienia wtórnej fermentacji był wzrost SM w wyniku zastosowania dodatków (Pahlow i in., 2003).

Stwierdzona bardzo niska ilość etanolu była charakterystyczna dla kiszonek wysokiej jakości, gdzie maksymalnie udział etanolu wynosi do 5,00 $g \cdot kg^{-1}$ SM (Kung i in., 2018). Powszechnie niska koncentracja alkoholu jest wskaźnikiem ograniczonego metabolizmu drożdży i bardzo niskiej podatności na psucie się, gdy kiszonka narażona zostanie na ekspozycję tlenową (Kung i in., 2000; McDonald i in., 1991).

Poziom $N\text{-}NH_3$ odzwierciedla stopień degradacji BO kiszonki, w którym pośredniczą głównie proteazy roślinne i mikrobiologiczne (Fijałkowska i in., 2015). Kiszonki dobrej jakości powinny zawierać mniej niż 100 g $N\text{-}NH_3 \cdot kg^{-1}$ $N_{ogólny}$ (Yuan, Yu, Shimojo, Shao, 2012). W niniejszym badaniu żadna z kiszonek nie przekroczyła podanego poziomu. Jednak w kiszonkach z 12,0% słomy pszennej uzyskany wynik wskazywał, że utrata BO była bardziej znacząca niż gdy zastosowano 12,0% łuski bobiku. Podobne różnice, lecz nie potwierdzone statystycznie odnotowano dla wariantu z 18,0% łuski bobiku i słomy pszennej. W tym przypadku można było zasugerować, że taniny zawarte w łusce bobiku ograniczyły rozkład BO i produkcję $N\text{-}NH_3$ podczas fermentacji, co było zgodne z badaniami Cavallarin i in. (2007) oraz Ke i in. (2022).

Podsumowując wyniki podstawowego składu chemicznego można stwierdzić, że dodatek łuski bobiku jako źródła tanin spowodował obniżenie wartości pokarmowej kiszonek, podobnie było w przypadku słomy pszennej. Nastąpiło istotne obniżenie zawartości BO i zmiany w składzie frakcji węglowodanów strukturalnych. Na podstawie przeanalizowanych parametrów chemicznych i profilu fermentacji opisującego kiszonki, stwierdzono ograniczoną fermentację z niską produkcją kwasów, przy jednocześnie niskiej resztkowej zawartość WSC (Huhtanen i in., 2003). Uzyskane wyniki wskazują na silniejszy wpływ łuski bobiku jako dodatku absorbującego niż jako źródła tanin, które mogło istotnie wpłynąć jedynie na obniżenie koncentracji $N\text{-}NH_3$. Wszystkie kiszonki osiągnęły wyniki akceptowalne, ale przede wszystkim nie stwierdzono wtórnej fermentacji, która znacznie mogłaby obniżyć ich jakość. Kiszonki o wyższej zawartości SM mają tendencję do wyższej porowatości, co przyczynia się do niższej ilości produkcji kwasów organicznej, w tym głównie kwasu mlekowego, ale również kwasu octowego (Muck, Kung, 1997), co znalazło potwierdzenie w przeprowadzonym doświadczeniu. Sporządzone kiszonki charakteryzowały się prawie niewykrywalną ilością kwasu propionowego i masłowego, co mogło być spowodowane ograniczeniem liczebności

i aktywności zarodników *Clostridium* spp. w wyniku wzrostu ciśnienia osmotycznego na skutek dodatku absorbującego (Zheng i in., 2018).

7.2.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek

Głównym składnikiem BO zielonki z lucerny w badaniach własnych przed zakiszeniem była frakcja TP, której stwierdzony udział mieścił się w niższych wartościach przedziału podanego przez Fijałkowska i in. (2015) (64,20 – 82,90% BO). Zbliżone wyniki dla przewiędniętej lucerny zgłosili także Li i in. (2018a), gdzie TP stanowiło 71,70% BO. Wartości TP uzyskane w badaniach własnych sugerują, że część najwartościowszej frakcji BO lucerny uległo degradacji w trakcie więdnięcia (Coblentz i in., 2008). Zawartości TP dla lucerny przewiędniętej zwykle są niższe w stosunku do świeżo ściętej rośliny, gdyż powszechnie przyjmuje się, że dynamiczne przemiany proteolityczne mają miejsce już przy pierwszym uszkodzeniu komórek roślinnych (Coblentz, Grabber, 2013; Guo i in., 2008).

Ocena jakości BO według Systemu CNCPS v 6.5 wykazała że najmniejszą część BO zielonki z lucerny stanowiła frakcja PA1 zawierająca wyłącznie N-NH_3. Ta część $N_{ogólnego}$ w świeżej roślinie zwykle przyjmuje wartości < 1% BO (McDonald i in., 1991). Pośród rozpuszczalnych frakcji BO w zielonce analizowano także udział PA2 zawierającej pozostałe związki frakcji NPN (Purwin i in., 2014b; Purwin i in., 2015), który wynika z zawartości TP i SCP (Higgs i in., 2015). Uzyskane wyniki w badaniach własnych dla najważniejszej frakcji BO, do której należy PB1, można uznać za poprawne względem rezultatów zgłoszonych przez Grabber (2009), gdzie frakcja ta stanowiła 52,30% BO dla zielonki z lucerny i 57,10% BO dla zielonki z koniczyny czerwonej. Jednak podobnie jak w badań własnych była to dominująca część BO w materiale zielonym. Niższe wartości dla frakcji PB1 zaobserwowali Thers i in. (2021), od 40,60% do 48,60% BO, odpowiednio dla koniczyny czerwonej i lucerny. Marković i in. (2022) przeanalizowali skład frakcji BO lucerny uwzględniając okres wzrostu, różnice między odmianami, fazę dojrzałości i kolejny pokos. Wyniki frakcji PB1 dla lucerny zebranej w kolejnych czterech pokosach były następujące: 55,00%, 45,80%, 50,80%, 59,10% BO.

Zawartość frakcji PB2 w zielonce z lucerny w badaniach własnych była zbliżona do doniesień Grabber (2009) (6,80% BO). Natomiast Thers i in. (2021) odnotował zawartość PB2 w przedziale od 4,70% BO dla zielonki z lucerny do 17,90% BO dla zielonki z życicy trwałej. Podobne wartości dla lucerny przedstawili Marković i in. (2022) w kolejnych pokosach 4,82%, 4,93%, 6,49% i 1,72% BO. Na zawartość frakcji PB2

wpływa udział BO należącego do NDICP oraz ADICP (Higgs i in., 2015). NDICP jest wartościową częścią BO, w składzie której przeważa białko związane z macierzą ściany komórkowej rośliny (Coblentz i in., 2008). Poziom NDICP analizowany w zielonce doświadczalnej był wyższy względem wyników przedstawionych przez Grabber (2009) (9,60% BO). Wcześniejsze badania przeprowadzone przez zespół Coblentz i in. (2008) zaprezentowały wartości NDICP dla różnych okresów zbioru i dni odrostu lucerny w zakresie od 12,20% do 14,80% BO w I roku, od 9,00% do nawet 18,70% BO w II roku trwania eksperymentu. Wyniki te były spójne z wcześniejszymi badaniami Coblentz, Fritz, Fick, Cochran, Shirley (1998), a także Coblentz i in. (1999). Trudno było jednoznacznie wyjaśnić dysproporcje w udziale NDICP, ponieważ wykazano, że koncentracja tej frakcji w lucernie nie zależy od stosunku liści do łodyg. Udział NDICP jest iloczynem dwóch dynamicznie zmieniających się wartości, tj. zawartość TP w nierozpuszczalnej pozostałości NDF oraz udział NDF (Coblentz i in., 2008).

Udział ADICP wpływa pośrednio na ilość frakcji PB2, a bezpośrednio warunkuje zawartość frakcji PC, czyli frakcji białka niedostępnego w przewodzie pokarmowym (Higgs i in., 2015; Van Amburgh i in., 2015). W składzie ADICP można znaleźć przede wszystkim polimery o właściwościach fizycznych zbliżonych do ligniny, dlatego też biodostępność tej frakcji BO jest w zasadzie bardzo mocno ograniczona (Licitra i in., 1996). W świeżej roślinie zawartość frakcji PC powinna być najniższa obok frakcji PA1, czego nie uzyskano w badaniach własnych (Thers i in., 2021). Jednak wyższe udziały tej frakcji zostały wcześniej w literaturze odnotowane przez Guo i in. (2008) (10,30% BO), a także Li i in. (2018a) (13,40% BO). Znacznie niższe wartości względem wyników własnych uzyskał Grabber (2009) dla lucerny (2,80% BO) oraz koniczyny czerwonej (2,90% BO). Zgodnie z Purwin i in. (2014b) proces więdnięcia nie powinien wpływać istotnie na zmiany w składzie frakcji NDICP, a także ADICP.

W składzie BO kiszonek z dodatkiem od 1,2% do 12,0% łuski bobiku lub słomy pszennej włącznie, TP nie przekraczało 42,01% BO, a najniższe wartości (33,83% BO) były tożsame z wynikami badań Grabber, Coblentz (2009) (31,90% BO). Niższą koncentrację TP w lucernie po 35 dniach fermentacji zgłosili Guo i in. (2008) (31,60% BO). Porównywalne do średnich wyników własnych wartości TP zaprezentowali Yuan i in. (2017) dla kiszonki z lucerny bez dodatków (40,10% BO). Po 120 dniach zakiszania lucerny Hartinger i in. (2019) zgłosili znacznie niższą koncentracją TP (18,80 – 25,60% BO) w stosunku do badań własnych, ale również rezultatów zespołu Dong i in. (2019)

(46,10% BO), co było bardziej zbliżone do wartości własnych dla grup z 18,0% i 24,0% dodatkiem łuski bobiku lub słomy pszennej.

Potwierdzone statystycznie najwyższe zawartości TP stwierdzono w kiszonkach własnych z 18,0% i 24,0% łuski bobiku oraz 18,0% słomy pszennej w stosunku do grupy kontrolnej. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że wpływ na ograniczenie degradacji TP miał rodzaj, jak i dawka dodatku, która była najskuteczniejsza w ilości 18,0% i 24,0%.W literaturze Ke i in. (2022), a także wcześniej Cavallarin i in. (2007) wykazali pozytywny wpływ tanin na ograniczenie proteolizy w zakiszaniu lucerny, co potwierdzono także w przeprowadzonych badaniach własnych w oparciu o wpływ rodzaju i dawki zastosowanego dodatku względem podstawowego wskaźnika proteolizy, czyli ilości TP. W badaniach Ke i in. (2022) samodzielnie zakiszona lucerna uzyskała TP na poziomie 26,90% BO, co było niską wartością względem kiszonek z lucerny traktowanych taninami w cytowanej pracy (48,60 – 49,60% BO). Wyniki dla lucerny zakiszonej z dodatkiem tanin w badaniach Ke i in. (2022) były porównywalne z wynikami własnymi dla grup z najwyższymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej (18,0% i 24,0%). Przyczyną uzyskanych wyników rzeczywistych mogło być szybkie hamowanie proteaz pochodzenia roślinnego, których aktywność zależała od wystarczającej dostępności wody (Hoedtke i in., 2010), jak i obecności tanin zawartych w łusce bobiku (Ke i in., 2022). Owens i in. (1999) zaobserwowali w przeprowadzonym eksperymencie, że wzrost SM ograniczał aktywność roślinnych proteaz i odnotowane zawartości NPN były niższe. Należy jednak wziąć pod uwagę, że pomimo zgłoszonych rezultatów w aspekcie zmniejszenia aktywności proteaz pochodzenia roślinnego przez więdnięcie o wysokiej intensywności, to jest to kwestia dyskusyjna. Nie ma obecnie pewności, że enzymy roślinne w przeprowadzonych wcześniej badaniach zostały całkowicie zdezaktywowane, ponieważ utrata wody w lucernie była ograniczona, jedynie do momentu uzyskania SM na poziomie 35%. Zatem proteazy pochodzenia roślinnego mogły nadal warunkować przebieg proteolizy skutkując znaczną konwersją TP do NPN pomimo podwyższenia SM lucerny. Badania Hartinger i in. (2019) potwierdzają wpływ wzrostu SM lucerny na zmniejszenie proporcji NPN, co potwierdzili wcześniej już Edmunds i in. (2014), a można to wytłumaczyć było niższą aktywnością wody, która w konsekwencji ograniczała także metabolizm drobnoustrojów (McDonald i in., 1991).

Analizowana w sporządzonych kiszonkach frakcja PA1 mieściła się w zakresie podanym przez Kung i in. (2018) dla kiszonek dobrej jakości z roślin bobowatych. W badaniach własnych wzrastający udział łuski bobiku jako źródła tanin nie wpłynął

jednoznacznie na ograniczenie deaminacji, co było odmienne wobec danych Cavallarin i in. (2007) oraz Ke i in. (2022). Przemiany proteolityczne jakie zaszły w przeprowadzonym badaniu skutkowały przekształceniem większości składników do form o wyższej rozpuszczalności, co było zasadne dla lucerny i zostało potwierdzone w badaniach wcześniejszych (Grabber, Coblentz, 2009; Guo i in., 2008). W badaniach własnych wraz ze wzrostem udziału łuski bobiku w zakiszanej lucernie udział frakcji PA2 w BO ulegał zmniejszeniu, co było oczekiwanym efektem. Jednak Li i in. (2018a) w lucernie zakiszonej bez dodatków uzyskali niższe ilości frakcji PA2 (43,40% BO).

Udział frakcji PB1 o wysokiej biodostępności dla wariantów o najniższych udziałach łuski bobiku lub słomy pszennej (1,2 – 3,6%) był zbliżony do wartości zgłoszonej przez Li i in. (2018a) (27,00% BO). W kiszonkach doświadczalnych z wyższym udziałem dodatków stwierdzono wyższe zawartości frakcji PB1, które były porównywalne do wyników badań Chrenková i in. (2012) (32,10% BO). Natomiast wartości niższe uzyskali Guo i in. (2008) (14,60% BO), Grabber, Coblentz (2009) (19,80% BO), a także Hartinger i in. (2019) (13,90 – 20,60% BO).

Kiszonka z lucerny wśród pastewnych roślin bobowatych charakteryzuje się zwykle najniższym udziałem frakcji PB2 (Grabber, Coblentz, 2009; Hymes-Fecht i in., 2013), co prezentują również wyniki własne przeprowadzonego doświadczenia. Li i in. (2018a) w kiszonce z lucerny zgłosili średnio prawie dwukrotnie wyższe zawartości tejże frakcji (7,52% BO) w porównaniu do wyników własnych (0,81 – 5,69% BO). Podobnie niskie wartości frakcji PB2 zostały zgłoszone przez Guo i in. (2008) (3,26% BO). Inne zespoły badawcze uzyskały zbliżone udziały PB2 w kiszonkach z lucerny, jak 3,40% BO (Grabber, Coblentz, 2009), 1,33% BO (Hymes-Fecht i in., 2013), natomiast Hartinger i in. (2019) odnotowali wartości w zakresie od 0,00% do 0,20% BO dla omawianej frakcji. Kwantyfikacja BO frakcji PB2 jest istotna ze względu na jego ograniczoną degradację w żwaczu (1 – 18%·h^{-1}) i wysoką biodostępność by-pass (Higgs i in., 2015; Van Amburgh i in., 2015). Podwyższona koncentracja PB2 może być wynikiem czynnika termicznego, który przyczynia się do częściowej degradacji białek należących do frakcji (Licitra i in., 1996). Jednak wzrost temperatury podczas fermentacji występuje w trakcie zakiszania w warunkach gospodarczych, tj. w dużych silosach i balotach, a w mikrosilosach zakiszana masa szybko oddaje ciepło do otoczenia, tłumaczyć to może niskie wartości uzyskane w badaniach własnych (Purwin, 2007).

Frakcja PC nie jest rozkładana zarówno przez drobnoustroje żwacza, jak i enzymy wydzielane w przewodzie pokarmowym, nie ma więc wartości paszowej (Das i in., 2015).

W kiszonkach z 18,% i 24,0% łuski bobiku lub słomy pszennej stwierdzono istotny wzrost udziału tej frakcji w stosunku do zielonki, jak i kiszonki kontrolnej. Wzrost udziału frakcji PC po zakiszeniu rośliny względem świeżej zielonki jest generalnie obserwowany ze względu na akumulację ciepła wytworzonego podczas procesu fermentacji (Guo i in., 2008). Frakcja PC składa się przede wszystkim z białka związanego z ligniną, a także z produktów reakcji Maillarda, które powstają w wyniku wzrostu temperatury zakiszanej masy roślinnej lub są wynikiem kondensacji cukrów redukujących z aminokwasami (Coblentz i in., 2010). Jednocześnie w składzie frakcji PC stwierdza się także obecność trwałych kompleksów białka z taninami, które powstają podczas procesu fermentacji (Licitra i in., 1996). Na podstawie uzyskanych wyników własnych można było zasugerować, że wzrastający udział łuski bobiku, a co za tym idzie wzrost udziału zawartych w niej tanin wpłynął na wzrost frakcji PC, zatem potencjalnie powstałe kompleksy białkowo-taninowe w sporządzonych kiszonkach częściowo mogły być kompleksami nieodwracalnymi, które obniżyły dostępność BO kiszonki z lucerny (Salawu i in., 1999). Niższe zawartości PC w kiszonkach doświadczalnych o niższym udziale łuski bobiku lub słomy pszennej wskazywały na wyższą potencjalną strawność BO kiszonki z lucerny (Broderick, Walgenbach, Maignan, 2001). Średnio ponad dwukrotnie niższe od uzyskanych w badaniach własnych udziały frakcji PC w kiszonce z lucerny zgłosili Grabber, Coblentz (2009) (3,40% BO), a także Hymes-Fecht i in. (2013) (1,71% BO). Inne zespoły badawcze prezentowały różnorodne wyniki dla wartości frakcji PC, wynoszące 6,50% BO (Hristov, Sandev, 1998), 10,50% BO (Schwab i in., 2003) czy 12,30% BO (Guo i in., 2008). W swoich badaniach Hartinger i in. (2019) podali, że dla różnych systemów więdnięcia kiszonka z lucerny uzyskała od 4,60% do 5,80% BO frakcji PC. Natomiast Coblentz, Grabber (2013) podali zakres frakcji PC wynoszący od 4,70% do 6,30% BO dla kiszonek z różnych roślin bobowatych. Jeszcze wyższe wartości dla frakcji PC uzyskali Li i in. (2018a) dla kiszonki z lucerny (14,80% BO) i koniczyny czerwonej (21,60% BO).

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że wpływ na ograniczenie degradacji TP miał rodzaj i dawka dodatku, która była najskuteczniejsza w ilości 18,0% i 24,0%. Na podstawie uzyskanych wartości rzeczywistych i przeprowadzonej analizy wariancji można było wnioskować o ograniczeniu zakresu przemian proteolitycznych w zakiszaniu lucerny z dodatkiem łuski bobiku, jako donora tanin. Warianty doświadczalne przy tym poziomie absorbentu uzyskiwały korzystniejszy skład BO. Podsumowując najkorzystniejszy skład frakcji BO stwierdzono dla kiszonki lucerny

z 24,0% łuski bobiku, gdyż w tym wariancie doświadczalnym zaobserwowano najmniejszy zakres proteolizy, czyli najniższy udział frakcji PA2 przy wysokiej ilości najbardziej wartościowej frakcji PB1. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że na skład frakcji BO w sporządzonych kiszonkach wpływ miał więcej niż jeden czynnik, czego dowodzą istotne interakcji pomiędzy rodzajem absorbentu, a jego poziomem zastosowania.

7.2.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek

Ocena rozkładalność żwaczowej składników pokarmowych jest użytecznym narzędziem do określenia wartości pokarmowej pasz dla przeżuwaczy, szczególnie przy obecnie wysokim potencjale produkcyjnym zwierząt i wzrastających potrzebach pokarmowych (Pagella, Mayes, Pérez-Barbería, Ørskov, 2017). Ponadto coraz większego znaczenia nabiera minimalizacja emisji składników pokarmowych nierozłożonych w przewodzie pokarmowych zwierząt do środowiska (Huhtanen, Rinne, Nousiainen, 2007).

Dysproporcje w ilość i tempie rozkładu *in vitro* SM i BO kiszonek doświadczalnych należało tłumaczyć zmiennym składem węglowodanów strukturalnych. Składniki rozpuszczalne w komórkach są prawie całkowicie rozkładalne w żwaczu, więc ilość i skład ściany komórkowej, czyli zawartość NDF decyduje o całkowitej strawności paszy (Zhang, Yu, Yang, Na, 2015b). Tendencję spadkową rozkładu SM zaobserwowaną wraz ze wzrostem udziału łuski bobiku lub słomy pszennej, które powodowały równocześnie wzrost zawartość NDF w kiszonkach, co wynikało ze zróżnicowanego składu węglowodanów strukturalnych zielonki z lucerny oraz łuski bobiku i słomy pszennej. Zastosowana w badaniach własnych łuska bobiku miała w swoim składzie więcej o 187,2 g NDF, 253,3 g ADF i 12,91 g ADL·kg^{-1} SM względem zakiszanej zielonki. Natomiast słoma pszenna średnio w 1 kg SM uzyskuje jeszcze wyższą zawartość NDF (769,3 g) względem łuski bobiku, w składzie którego znajduje się średnio 485,2 g ADF (Khan, Mubeen, 2012; Larsen i in., 2017; Ni i in., 2014). Najmniejszy stopień degradacji SM *in vitro* stwierdzono dla kiszonki z 18,0% i 24,0% słomy pszennej, gdzie właśnie dla tych grup oznaczono najwyższą koncentrację NDF. Rodzaj substratu ma istotny wpływ na namnażanie się określonej grupy mikroorganizmów w płynie żwaczowym (Van Soest, 1994). Skutkiem zakiszenia lucerny z dodatkami było również obniżenie zawartości łatwo strawnych składników pokarmowych, co sugerowałoby zmniejszającą się rozkładalność SM i BO wraz ze wzrostem udziału dodatku (Damborg i in., 2018).

Zastosowane w poniższym doświadczeniu własnym dodatki o charakterze wysokowłóknistym mogły wpłynąć na kruchość końcową kiszonek, co przekładało się na stopień rozdrobnienia i skład cząstek (Eisenhardt i in., 2009). W poniższych badaniach odnotowano wzrost zawartości frakcji NDF w zakresie 41,20 – 184,0 g, ADF od 71,20 g do 129,0 g, a także udział ADL na poziomie 7,66 – 27,26 g w kiszonkach z dodatkiem łuski bobiku lub słomy pszennej w odniesieniu do samodzielnie zakiszonej lucerny. Najwyższe wartości wzrostu powyższych frakcji zostały stwierdzone przy najwyższych udziałach dodatków. Kiszonki z niższymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej charakteryzowały się wyższą rozkładalnością SM i BO, co mogło także częściowo wynikać z odmiennego profilu rozdrobnienia w stosunku do kiszonek z wyższymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej, większego udziału frakcji bardzo drobnych i kontrastowego ich składu. Straty najdrobniejszych cząstek paszy przez pory woreczków są najwyższe w pierwszych godzinach inkubacji (Mould i in., 2005).

Wyższy rozkład BO w grupach do 4,8% łuski bobiku lub słomy w stosunku do wariantów o wyższych udziałach dodatków mógł wynikać z szerszego zakresu proteolizy i większej konwersji TP do form o wyższej rozpuszczalności (Fijałkowska i in., 2015). Stopień i tempo rozkładu SM i BO mogły być również zależne od ilości obecnych tanin w sporządzonych kiszonkach (Tabacco i in., 2006). W badaniach Tabacco i in. (2006) kiszonka z lucerny nietraktowana taninami charakteryzowała się najwyższą degradacją BO w żwaczu, a dodatek tanin zmniejszał ubytek BO proporcjonalnie do dawki. Zastosowanie tanin zmniejszyło rozkładalność materii organicznej dla wszystkich poziomów dodatku (Tabacco i in., 2006). W badaniu własnym nie można jednoznacznie potwierdzić powyższych obserwacji Autorów, gdyż grupy o niskim i pośrednim udziale łuski bobiku uzyskały wyniki zbieżne z grupą kontrolną. Dopiero dodatek 4,8% łuski bobiku miał niewielki wpływ na obniżenie ilości zdegradowanej SM i BO, a największe różnice stwierdzono przy dawce 18,0% i 24,0% łuski bobiku. Mogło to być powiązane z proporcjami poszczególnych grup tanin zawartych w łusce bobiku, gdyż literatura donosi, że CT zwykle mają niższą zdolność ochrony BO niż HT, ponieważ ulegają one hydrolizie w kwasach żołądkowych poza żwaczem, uwalniając białka, aminokwasy i małe jednostki związków fenolowych, które prawdopodobnie przechodzą do moczu (Van Soest, 1994). Zróżnicowane roślinne źródła tanin mogą wywierać korzystny lub niekorzystny wpływ na rozkład składników pokarmowych w żwaczu, w zależności od czynników, takich jak złożoność struktury, dawka, rodzaj skarmianych pasz, gatunek i stan fizjologiczny zwierzęcia (Makkar, 2003; Mueller-Harvey, 2006). Efekt

rozkładalności żwaczowej i całkowitej strawności paszy może różnić się w zależności od źródła tanin, które są stosowne na tych samych poziomach (Jayanegara, Goel, Makkar, Becker, 2015). Różnice w złożoności cech strukturalnych tanin w dużej mierze odpowiadają na bardzo wiele rozbieżności w biologicznym ich działaniu na stopień i tempo rozkładu poszczególnych składników odżywczych (Waghorn, 2008). Ze względu na swoją aktywność wiążącą taniny mogą także wchodzić w interakcje zarówno z mikroorganizmami, jak i składnikami pokarmowymi, takimi jak białka i węglowodany (McSweeney i in., 2001). McMahon i in. (2000) donieśli, że hamujący wpływ niższych koncentracji CT może odzwierciedlać ograniczoną dostępność substratu do wiązania przez aktywne biologicznie taniny *in vitro*. *In vivo* szerszy zakres i większa dostępność substratu w żwaczu prawdopodobnie mogą obniżyć stopień hamowania pojedynczych populacji drobnoustrojów żwaczowych przez CT (Colombari, Crovetto, Borreani, Tabacco, Zapparoli, 2005). Taniny mogą znacznie wpłynąć na zmiany aktywności i liczebności poszczególnych grup mikroorganizmów uczestniczących w rozkładzie składników pokarmowych (Tavendale i in., 2005). W badaniach Liu, Vaddella, Zhou (2011) wykazano, że zastosowanie CT zmniejszyło istotnie populację metanogenu i pierwotniaków. Wcześniejsza praca Tavendale i in. (2005) również dostarcza wiedzy na temat hamującego wpływu tanin jako ekstraktu roślinnego na wzrost metanogenów żwacza. Podobnie jak w pracy Liu i in. (2011) również wcześniejsze badania (Bhatta i in., 2009; Patra i Patra, Kamra, Agarwal, 2006) wykazały, że taniny mają właściwości przeciwpierwotniacze. Zdolność tanin do zmian mikrobiomu płynu żwaczowego została powiązana ze zmniejszoną degradacją BO i redukcją metanogenezy (Patra, Min, Saxena, 2012). Taniny mogą wykazywać działanie bakteriostatyczne, chociaż interakcja z drobnoustrojami żwacza różni się w zależności od rodzaju tanin, biorąc pod uwagę, że HT są bardziej podatne na hydrolizę mikrobiologiczną niż CT (McSweeney i in., 2001).

Rozkładalność *in vitro* SM w sporządzonych kiszonkach po 48 h inkubacji była porównywalna do lucerny współzakiszonej z różnymi proporcjami kupkówki pospolitej w badaniach Xue i in. (2020a) (65 – 71%) oraz Xue i in. (2020b) (68 – 74%). Michalski i in. (2020) zaprezentowali dynamikę rozkładalności SM kiszonki z lucerny określoną metodą *in situ*, której wyniki były zbieżne z wynikami własnymi dla grupy kontrolnej. W następujących przedziałach czasowych (2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h) ilość zdegradowanej SM była następująca 35,9%, 36,0%, 47,8%, 54,2%, 59,4%, 65,3%. Wcześniejsze badania Purwin i in. (2014a) potwierdzają wartości uzyskanych wyników własnych. Autorzy określili *in situ* dynamikę rozkładalności SM (2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24

h, 48 h) dla kiszonki z lucerny (37,7%, 38,3%, 49,0%, 55,8%, 62,7%, 65,6%), a także kiszonki z koniczyny czerwonej (29,9%, 32,5%, 39,9%, 52,4%, 58,2%, 65,4%) i kostrzewy czerwonej (27,7%, 32,4%, 38,3%, 46,4%, 57,5%, 63,4%).

Uzyskane wyniki własne rozkładu BO *in vitro* odpowiadały wartością zgłoszonych przez Purwin i in. (2014a) dla kiszonki z lucerny (43,2%, 38,7%, 52,1%, 59,2%, 68,0%, 71,5%) w wyznaczonych czasookresach (2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h). Jedynie ilość zdegradowanego BO *in vitro* w żwaczu po 48 h w rzeczywistych wynikach własnych była wyższa względem zacytowanych wartości dla wariantów z 1,2% i 2,4% łuski bobiku. Kiszonki z lucerny z najwyższymi poziomami łuski bobiku (12,0%, 18,0% i 24,0%) uzyskały końcowy wynik rozkładu BO po 48 h inkubacji niższy względem kiszonki z lucerny w badaniach Purwin i in. (2014a), który był bliższy wynikom podanym dla kiszonki z kostrzewy czerwonej. Na podstawie czego można wnioskować o wyższej efektywności wykorzystania BO tych wariantów doświadczalnych w trawieniu jelitowym przeżuwaczy. Podobne wyniki zgłosili Michalski i in. (2020) dla kiszonki z lucerny, gdzie ilość rozłożonego BO *in situ* była następująca 41,1% (2 h), 37,2% (4 h), 52,9% (8 h), 62,7% (16 h), 68,8% (24 h), 78,2% (48 h). W tym przypadku również końcowy wynik degradacji BO po 48 h uzyskany w badaniach własnych dla kiszonek z dodatkiem od 3,6% do 24,0% był mniejszy i wraz ze wzrostem udziału łuski bobiku zmniejszał się, co świadczyło o rosnącej wartości BO pod względem potencjalnego wykorzystania w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Na różnice w degradacji BO mogła wpłynąć koncentracja ADICP, której wyższe ilości prowadzą do obniżenia efektywności rozkładu BO według Purwin i in. (2014a).

Dysproporcje w rozkładalności SM i BO w wariantach o tym samym poziomie dodatku, ale z uwzględnieniem jego rodzaju mogły być związane z odmiennym składem frakcji węglowodanów strukturalnych, co pośrednio wynikało z różnej zawartości ligniny, będącej ważnym czynnikiem wpływającym na szybkość degradacji pasz objętościowych w żwaczu (Liu i in., 2017). Ponadto ważną rolę odgrywa struktura ścian komórkowych, która gdy jest luźniejsza pozwala mikroorganizmom zawartym w płynie żwaczowym szybciej przedostać się do wnętrza komórek roślinnych i sprzyja to skuteczniejszej degradacji. Jednocześnie substancje fenolowe uwalniane w wyniku metabolizmu lignocelulozy mogą hamować aktywność drobnoustrojów (Sewalt, Ni, Jung, Dixon, 1997). W rezultacie stopień degradacji BO kiszonek z dodatkiem słomy pszennej był wyższy względem łuski bobiku, co mogło wynikać z luźniejszej struktury włókien zastosowanej słomy pszennej, jak i obecności tanin w łusce bobiku.

Reasumując analizę rozkładalności żwaczowej kiszonek doświadczalnych należy stwierdzić, że warianty z wyższymi udziałami łuski bobiku lub też słomy pszennej na poziomie 12,0%, 18,0% i 24,0% mogłyby potencjalnie wpłynąć na wzrost efektywności wykorzystania BO kiszonek z lucerny w żywieniu przeżuwaczy jako absorbenty. Grupy z dodatkiem słomy pszennej charakteryzowały się wyższą i szybszą rozkładalnością BO kiszonki z lucerny względem dodatku łuski bobiku. Największe różnice w tempie rozkładu BO zaobserwowano w grupie z 24,0% łuski bobiku i słomy pszennej. W tym przypadku wariant z łuską bobiku charakteryzował się znacznie wolniejszym rozkładem BO *in vitro*, co mogło wskazywać na działanie tanin. Jednocześnie należy podkreślić złożoność procesu degradacji składników pokarmowych, a zwłaszcza kiszonek w żwaczu, który warunkowany jest wieloma czynnikami, poza ilością i jakością BO paszy (Purwin i in., 2014a). Rozbieżności w rozkładzie SM *in vitro* mogły wynikać z ilości zastosowanego dodatku wysokowłóknistego oraz struktury ich ścian komórkowych, który zmienił skład i strukturę NDF kiszonek.

7.2.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych

Według McAllister i in. (2018) populacje mikroorganizmów związane z kiszonką z lucerny są dużo bardziej zróżnicowane niż te powiązane z kiszonkami produkowanymi z roślin zbożowych, co skutkuje ich gorszą jakością fermentacyjną. Zgodnie z literaturą skład mikroorganizmów epifitycznych na powierzchni świeżej lucerny jest dość zróżnicowany ze względu na dysproporcje w odmianach surowców, a także regionie i czasie zbioru. Jednak większość mikroflory epifitycznej obejmuje bakterie niepożądane, a zasadnicze gatunki baterii fermentacji mlekowej stanowią niewielki odsetek całej społeczności (Guo i in., 2018; Hu i in., 2020; Yang i in., 2019; Yang i in., 2020).

Liczebność drożdży i pleśni na rozdrobnionej lucernie może wzrastać wraz ze wzrostem SM i zdolności buforowej rośliny (Wang i in., 2022; Wu i in., 2021). Tendencji tej nie zaobserwowano w wynikach własnych, ponieważ zmiany nie miały charakteru liniowego, gdyż najwyższe liczebności całkowite drożdży były stwierdzone dla najniższych (1,2% i 2,4%) i jednocześnie najwyższych dawek łuski bobiku (12,0%, 18,0% i 24,0%). Podobnie w całkowitej liczebność grzybów, wzrost SM związany ze wzrostem udziału dodatków nie wykazał wpływu na zmiany w ich ładunku. Wyższe od średnich uzyskanych wartości liczebności drożdży i grzybów w przeprowadzonych badaniach własnych mogą wynikać z jakości zagęszczenia masy roślinnej związanej z zawartością SM (Kung i in., 2018). Zastosowanie zarówno łuski bobiku, jak i słomy

pszennej mogło wpłynąć na jakość zagęszczenia i ilość powietrza pozostawionego w mikrosilosie, co było charakterystyczne dla tego rodzaju dodatków wysokowłóknistych o dużej sprężystości (Kung i in., 2018; Muck i in., 2018). Koncentracja kwasów i alkoholu podczas fermentacji może wpływać inhibitująco na aktywność i liczebność drożdży w późniejszym okresie zakiszania. Sporządzone kiszonki uzyskały poprawne parametry fermentacji, zgodne z rekomendowanymi w literaturze (Kung i in., 2018), a odnotowane różnice w składzie chemicznym wynikały z zastosowanych dodatków. Oznaczona liczebność drożdży i grzybów była na tyle niska, że nie wpłynęła na pogorszenie jakości sporządzonych pasz (Nishino, Hattori, 2007). W badaniach własnych kiszonki z łuską bobiku charakteryzowały się wyższą liczebnością drożdży, potwierdzoną statystycznie na poziomie 12,0%, 18,0% i 24,0%, a w przypadku liczebności grzybów nie zaobserwowano wpływu tanin zawartych w łusce bobiku na zmniejszenie ich ładunku. Salawu i in. (1999) oraz Wang i in. (2007) wykazali jednoznacznie, że taniny ograniczają aktywność grzybów w kiszonkach z roślin motylkowatych. Peng i in. (2018) natomiast nie potwierdzili wpływu tanin na zmiany w liczebności drożdży w 14 dniu zakiszania purpurowej koniczyny preriowej, a zgłosili istotne różnice w 7 dniu procesu fermentacji. Na całkowitą liczebność drożdży w kiszonkach może wpływać wiele czynników nawet jeśli porównywane są wartości dla tego samego surowca roślinnego (Gotlieb, 2016; Kung i in., 2018).

Według König i in. (2017) zawartość kwasu masłowego w kiszonkach jest słabo skorelowana z liczbą kopii genów *Clostridium* spp., co mogłoby wyjaśnić dysproporcję między oznaczoną liczebnością bakterii a udziałem kwasu masłowego. Fijałkowska i in., (2019) stwierdzili liczebność *Clostridium* spp. w kiszonkach z traw na poziomie 4,5 log 10 liczby kopii genu·g^{-1} SM, w prezentowanych badaniach tylko niektóre próby uzyskały niższe wartości liczbowe. Poziom kwasu masłowego i N-NH_3 w kiszonkach mogą wskazywać na aktywność bakterii *Clostridium* spp., którą w badaniach własnych można było ocenić jako niską (Kung i in., 2018; Ni i in., 2020). Zarówno *Clostridium* spp., jak i *Enterobacter* spp. są uważane za niepożądane rodzaje bakterii obecnych w kiszonkach, a przede wszystkim w roślinach o wysokiej zawartości BO (Ni i in., 2017; Ni i in., 2018). *Clostridium* spp., któremu sprzyja wilgotne środowisko może powodować degradację TP, straty SM i produkować kwas masłowy, co znacznie obniża jakość pasz (Zheng i in., 2018). Wiele badań wykazało, że wzrost SM może skutecznie ograniczać wzrost *Clostridium* spp. (Ni i in., 2017; Ni i in., 2020). Dzieje się tak, gdyż ten rodzaj bakterii w zasadzie nie toleruje wysokiego ciśnienia osmotycznego (Krzywiecki i in., 2008).

Pałeczki *Bacillus* spp. podobnie jak *Clostridium* spp. tworzą endospory, jednak są fakultatywnymi tlenowcami. Fermentują węglowodany do kwasu octowego, mlekowego czy masłowego lub etanolu, 2,3-butanodiolu i gliceroli. Niektóre specyficzne gatunki *Bacillus* spp. są zdolne do wytwarzania substancji przeciwgrzybiczych, hamując w ten sposób tlenowe psucie się kiszonek. Za wyjątkiem tych gatunków, rodzaj *Bacillus* w kiszonkach jest ogólnie uważany za niepożądany. Pałeczki te są mniej wydajnymi producentami kwasu mlekowego i octowego niż bakterie fermentacji mlekowej (Elferink, Driehuis, Gottschal, Spoelstra, 2000; McDonald i in., 1991), a dodatkowo mogą w późniejszych etapach wzmacniać efekt pogorszenia warunków tlenowych (Elferink i in., 2000). Obecność *Bacillus* spp. w badaniach własnych można przypisać aktywności w fazie aerobowej zakiszania, co mogło wpłynąć na istotne różnice kwasowości końcowej i zawartości sumy LKT w poszczególnych kombinacjach (Brillard, 2015).

Bakterie, które dominują w fermentacji kiszonek z lucerny to przede wszystkim rodzaje *Lactiplantibacillus* i *Lentilactobacillus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Pediococcus* (Guo i in., 2018; Hu i in., 2020; Yang i in., 2019; Yang i in., 2020). Populacja bakterii analizowana na poziomie rodzaju w badaniach własnych była zgodna z powyższymi doniesieniami literaturowymi. W grupie dominujących rodzajów bakterii zasiedlających kiszonki znalazły się również rodzaje *Pantoea*, *Klebsiella* i *Escherichia*. Bao i in. (2016) analizując strukturę mikrobiomu bakteryjnego kiszonki z lucerny zgłosili, że większość wykrytych rodzajów stanowiły *Enterobacter*, *Weissella*, *Pedicoccus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, jak i również zbieżnie z badaniami własnymi *Pantoea*. Wyniki badań Ogunade i in. (2018b) sugerują, że rodzaje *Pantoea*, *Pseudomonas* i *Sphingomonas* mogą przyczyniać się do zachowania jakości BO w zakiszanej lucernie, ponieważ ich obfitość była ujemnie skorelowana z koncentracją $N\text{-}NH_3$. Natomiast w badaniach własnych kiszonki o najwyższych udziałach rodzaju *Pantoea* miały pośrednie i najwyższe zawartości $N\text{-}NH_3$, a wszystkie te wyniki były zgodnie z rekomendowanymi wartościami, podanymi przez Kung i in. (2018). W kiszonkach własnych nie odnotowano obecności rodzaju *Pseudomonas*, a *Sphingomonas* spp. stanowił nieznaczny odsetek, jedynie w przypadku dwóch grup z 18,0% słomy pszennej i 24,0% łuski bobiku udział przekroczył 1%. Badania Kung i in. (1998) oraz Kung i in. (2000) donoszą o negatywnej korelacji wspominanych powyżej rodzajów bakterii z liczbą pleśni i drożdży, co mogłoby wyjaśnić zależności zaobserwowane dla *Pantoea* spp. i liczebności drożdży w kiszonce z 12,0% słomy pszennej.

Dominujący udział rodzaju *Klebsiella* obok rodziny *Enterobacteriaceae* i rodzaju *Enterococcus* w kiszonce z lucerny stwierdził zespół Kang, Tang, Zhong, Tan, Wu (2021). W drugiej kolejności licznie występującymi w badaniach Kang i in. (2021) rodzajami bakterii zasiedlających kiszonki były *Enterobacter*, *Proteus*, *Acinetobacter*, *Bifidobacterium* i podobnie jak w kiszonkach własnych rodzaje *Pantoea* i *Lactobacillus*. Społeczność bakteryjna samodzielnie zakiszonej lucerny była zdominowana we wszystkich próbkach przez rodzinę *Enterobacteriaceae* (37,61%), a także rodzaje *Klebsiella* (41,78%) i *Weissella* (10,81%) zgodnie z doniesieniami Hou, Zheng, Zhang, Chen, Wu (2022). W przeciwieństwie do badań własnych Autorzy (Hou i in., 2022) stwierdzili wyższy udział rodzaju *Klebsiella* w stosunku do *Weissella*. Badania własne wykazały odwrotną proporcję dla wspominanych rodzajów bakterii. Zacytowane powyżej wyniki badań, jak i również wyniki własne były odmienne w stosunku do wyników badań (Ni i in., 2018; Pang, Qin, Tan, Li, Wang, 2011), na podstawie których wykazano, że większość bakterii uczestniczących w fermentacji mlekowej kiszonek należy do rodzajów *Lactobacillus*, *Pedicoccus*, *Weissella* i *Leuconostoc*. Zwykle stwierdzano niski poziom rodzaju *Lactobacillus* (Keshri i in., 2018), podczas gdy bakterie rodzaju *Pediococcus* rosną intensywnie i inicjują fermentację mlekową na wczesnym etapie, stymulując w ten sposób dominację gatunków *Lactobacillus* spp., które wówczas stają się bardziej aktywne i intensywnie rosną wraz ze spadkiem pH. Literatura donosi, że rodzaje *Weissella* i *Lactococcus* uznawane są za głównych inicjatorów fermentacji mlekowej w zakiszanej lucernie (Yuan i in., 2020).

Obecność bakterii rodzaju *Escherichia* w kiszonkach z traw stwierdzili Li i in. (2022), w badaniach tych głównymi rodzajami społeczności bakteryjnej były *Lactobacillus* (60,96%) i *Enterobacter* (11,26%). W grupie z dodatkiem bakterii fermentacji mlekowej w kiszonce z traw dominowały rodzaje *Lactobacillus* (58,29%), *Enterobacter* (7,72%), *Pantoea* (4,17%) i *Escherichia* (4,00%). Trawa zakiszona z dodatkiem melasy charakteryzowała się dominującą obecnością rodzajów *Lactobacillus* (23,86%), *Enterobacter* (35,31%), *Escherichia* (20,12%) i *Pantoea* (1,74%). W tej grupie Li i in. (2022) zanotowali najwyższy udział bakterii *Escherichia* spp. Ponadto wykazano, że zastosowanie melasy wpłynęło na przyspieszenie wzrostu rodzajów *Enterobacter* i *Escherichia*. Podobną tendencję zaobserwowali również Mu, Xie, Hu, Chen, Zhang, (2021).

Zgodnie z literaturą obecność tanin wpływa na modyfikację mikrobiomu bakteryjnego kiszonek, lecz mechanizmy tych zmian nie zostały w pełni poznane (Peng

i in., 2018). Ke i in. (2022) stwierdzili, że kiszonka z lucerny traktowana taninami HT i CT w grupie kontrolnej oraz w grupie doświadczalnej była zdominowana przez rodzaj *Enterococcus*, traktowanie HT skutkowało wyższym udziałem rodzaju *Enterococcus* (73,68%) na rzecz obniżenia liczebności *Lactobacillus* spp. (18,48%) w porównaniu z samodzielnie zakiszoną lucerną (Ke i in., 2022). W badaniach własnych nie zaobserwowano tej tendencji, a jedynie wariant z 24,0% udziałem łuski bobiku w odniesieniu do grupy kontrolnej charakteryzował wyższy udział rodzaju *Enterococcus* z obniżonym udziałem *Lactobacillus*. Stwierdzone w badaniach własnych procentowe udziały obu rodzajów były znacznie niższe od odnotowanych przez Ke i in. (2022), gdzie rodzaj *Lactobacillus* stanowił maksymalnie 50,04%, a *Enterococcus* – 41,25% w kiszonce z lucerny traktowanej CT. Ke i in. (2022) wskazują na zróżnicowane oddziaływanie grup tanin na strukturę mikrobiomu bakteryjnego kiszonki z lucerny. Badania własne obejmowały wyłącznie ogólną zawartość tanin, a pozyskana łuska bobiku mogła być dodatkowym źródłem składników pokarmowych dla określonych grup mikroorganizmów, ponieważ powstały produkt uboczny po obłuszczaniu nigdy w całości nie składał się tylko i wyłącznie z samej łuski, obecne był również inne struktury nasion (Krenz i in., 2023).

Uzyskane wyniki nie są zbieżne z rezultatami badań Ni i in. (2017), którzy podali, że populacja bakteryjna zakiszonej lucerny była reprezentowana głównie przez rodzaje *Enterococcus*, *Erwinia* i *Methylobacterium*. W badanych kiszonkach odnotowano jedynie rodzaje *Enterococcus* i *Erwinia*, a ich udziały wynosiły < 3,70%. Według McGarvey i in. (2013) dominującym rodzajem w kiszonce z lucerny był *Enterobacter* (40,26%), który w badaniach własnych był dominantem tylko w kiszonce z 2,4% słomy pszennej. Dysproporcje w liczebności *Enterobacter* spp. mogły być wynikiem tempa zakwaszenia w pierwszej fazie procesu (Driehuis, Elferink, 2000).

W niniejszej pracy, podobnie jak w badaniach Huang i in. (2022) zaobserwowano, że zwiększenie udziału łuski bobiku, jako źródła tanin związane było z wyparciem bakterii potencjalnie probiotycznych *Pediococcus* spp., które są możliwymi antagonistami *Lactobacillus* spp. w procesie zakiszania. Huang i in. (2022) przypisują dodatnią korelację bakterii rodzaju *Pediococcus* z produkcją dopaminy, a co za tym idzie pośrednio dodatni wpływ na produkcję enzymów proteolitycznych podczas zakiszania. Ponadto, najliczniejszy rodzaj *Weissella* ma odmienny metabolizm zarówno od rodzaju *Lactobacillus*, jak i przedstawicieli *Pediococcus* spp. (KEGG, 2023). Przeprowadzone badania własne dowiodły, że wyższe udziały łuski bobiku powodują zmniejszenie

liczebności rodzaju zarówno *Weisella*, *Pediococcus* oraz *Lactobacillus* na rzecz bakterii rzędu *Enterobacteriales*.

Wytłumaczeniem wyników powiązania pomiędzy zwiększeniem udziału wybranych enterobakterii ujemnie skorelowanych z trzema rodzajami bakterii kwasu mlekowego wraz z dawką tanin zawartych w łusce bobiku było opracowanie Özogul, Toy, Özogul, Hamed (2017). Cytowani Autorzy, testowali oddziaływanie supernatantów różnych gatunków bakterii fermentacji mlekowej na enterobakterie, w wyniku czego wykazali stymulujący wpływ metabolitów bakterii fermentacji mlekowej między innymi na *Escherichia coli* i *Salmonella paratyphi*. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy sugerują, że naturalne metabolity bakterii fermentacji mlekowej wydzielane we wcześniejszych fazach fermentacji, stymulowały produkcję dopaminy przez enterobakterie. Wpływało to pozytywnie na ich rozwój w kiszonkach o wyższej zawartości łuski bobiku poprzez domniemany wpływ na szlak produkcji fosfolipidów, co w rezultacie zmniejszyło aktywność bakterii fermentacji mlekowej podczas zakiszania (Özogul i in., 2017).

Analiza struktury mikrobiomu bakteryjnego kiszonek własnych, a przede wszystkim obfitość rodzajów *Weissella*, *Lactiplantibacillus*, *Pantoea*, *Loigolactobacillus*, *Latilactobacillus* i *Levilactobacillus* pozwala wnioskować, że w kiszonkach dominowała fermentacja mlekowa, niezależnie od ilości i rodzaju zastosowanego dodatku (Guo i in., 2018; Ni i in., 2017; Ni i in., 2018; Pahlow i in., 2003). Pomimo bardzo dużej obfitości i zróżnicowaniu społeczności bakteryjnej kiszonek, wszystkie warianty uzyskały bardzo dobre lub dobre wyniki fermentacyjne, a odnotowane różnice przypisuje się zarówno zastosowanej dawce, jak i rodzajowi dodatku. Lucerna zakiszana z łuską bobiku zwykle charakteryzowała się wyższą różnorodnością mikrobiomu bakteryjnego, co również mogło wynikać z mikroorganizmów zasiedlających nie tylko świeżą lucerną, ale również i łuskę bobiku. Ponadto w wariantach z łuską bobiku mikroorganizmy miały inny skład i dostępność do metabolizowanych składników pokarmowych w porównaniu z grupami, gdzie na tym samym poziomie zastosowano słomę pszenną. Nie należy zapominać o szeregu oddziaływań synergistycznych i antagonistycznych pomiędzy konkretnymi rodzajami bakterii, których różnorodność mogła być zmienna wraz ze wzrostem udziału dodatku absorbującego, co wpływało z kolei na wzrost SM. Powszechnie wiadomo, że zawartość wody w zakiszanym surowcu decyduje o różnorodności zbiorowisk mikroorganizmów epifitycznych, co później w mniejszym lub większym stopniu przełożyć się może na przebieg fermentacji (Guo i in., 2018; Kung i in., 2018; McAllister i in., 2018).

Stwierdzone w badaniach własnych różnice w strukturze mikrobiomu kiszonek mogły wynikać również ze stopnia adaptacji do warunków fermentacji, czyli zastosowania dodatku o jednocześnie charakter ze wysokowłóknistym i absorbcyjnym (Zheng i in., 2017). Ważnym aspektem była także potencjalnie niższa aktywność bakterii fermentacji mlekowej zwłaszcza na końcowym etapie, co mogło zostać wykorzystane przez obecne drożdże i bakterie *Clostridium* spp. (McEniry i in., 2008).

Według Kraut-Cohen i in. (2016) uzyskany w badaniach własnych zróżnicowany mikrobiom bakteryjny przy jednoczesnej dominacji bakterii fermentacji mlekowej mógł wskazywać na prawidłowy przebieg procesu pomimo niskich zawartości kwasu mlekowego i LKT, jakie uzyskano. Kluczowym w powiązaniu przebiegu i jakości fermentacji roślin ze strukturą mikrobiomu bakteryjnego kiszonki jest przeprowadzenie analizy sekwencjonowania nanoporowego na poziomie gatunku czy szczepu, co jest wielokrotnie bardziej rzeczowe niż ocena na poziomie gromady. W badaniach własnych przeprowadzono analizę na poziomie rodzaju, co jest wiarygodne, ale nie w pełni pozwala wyjaśnić wszystkie stwierdzone zależności i tendencje.

7.3. Zadanie badawcze III

7.3.1. Charakterystyka chemiczna zielonek i kiszonek

Użyta w badaniach zielonka z lucerny charakteryzowała się wysoką zawartością BO i niską ilością cukrowców strukturalnych. Według danych literaturowych koncentracja BO w zielonce z lucerny przy optymalnym terminie zbioru wynosić powinna 150 – 200 g·kg^{-1} SM (Annicchiarico i in., 2015), natomiast uwzględniając zbiór w różnych fazach wegetacji i wpływ czynników środowiskowych zakres ten może wynosić od 114 do 279 g·kg^{-1} SM (Kume i in., 2001). Zespół Coblentz i in. (2008) zaprezentowali wyniki BO w zielonce z lucerny zebranej w różnych fazach wegetacji, a wartości uplasowały się w przedziale 193 – 230 g·kg^{-1} SM, co było porównywalne z wynikami własnymi.

Przy zbliżonych wartościach SM (352 g vs. 423 g·kg^{-1} FM) i BO (222 g vs. 218 g·kg^{-1} SM) zielonka z lucerny w doświadczeniu przeprowadzonym przez Guo i in. (2020) miała koncentrację NDF (311 g·kg^{-1} SM) i ADF (234 g·kg^{-1} SM) zbieżną z uzyskanymi wynikami. Porównywalny z własnymi rezultatami skład węglowodanów strukturalnych przedstawili Ke i in. (2018), gdzie lucerna zebrana w fazie późnego pąkowania do stadium wczesnego kwitnienia uzyskała 384 g NDF i 287 g ADF w kg SM, przy nieznacznie niższej koncentracji BO (200 g·kg^{-1} SM). Pomimo niskich zawartości ADL,

wskaźnik L/NDF w badanych zielonkach własnych nie mieścił się w zakresie najbardziej pożądanych wartości (< 0,15) podanych przez Grant (2013), a był zgodny z zakresem charakterystycznym dla lucerny (0,11 – 0,20) (Grant, 2013).

W wyniku przewiędnięcia zaobserwowano poprawę przydatności do zakiszania lucerny, która polegała na obniżeniu pojemności buforowej oraz wzroście ciśnienia osmotycznego. Obniżenie pojemności buforowej zielonek z lucerny jako rezultat więdnięcia jest efektem ograniczenia aktywności procesów fizjologicznych zachodzących wewnątrz komórek roślinnych, głównie koncentracji w cytoplazmie komórkowej kwasów krótkołańcuchowych cyklu Krebsa, które charakteryzują się wyższym potencjałem buforującym niż białka (McDonald i in., 1991). Podobnie jak w badaniach własnych Zheng i in. (2017) zgłosili, że pojemność buforowa była wyższa w świeżo ciętej lucernie w porównaniu z przewiędniętą.

Zmniejszenie zawartość WSC, które nastąpiło podczas więdnięcia rośliny jest zjawiskiem związanym z procesami oddychania komórek roślinnych po ścięciu, co również zaobserwowali dla lucerny Purwin i in. (2014b) oraz Guo i in. (2020). W badanych zielonkach własnych ilość WSC była zgodna z wymaganym zakresem 60 – 70 g·kg^{-1} SM, stanowiącym teoretyczną koncentrację pozwalającą na prawidłowy i zadowalający przebieg fermentacji (Zheng i in., 2018). Zbieżne wyniki z własnymi przedstawili Ke i in. (2018) (60,7 g WSC·kg^{-1} SM) dla lucerny przewiędniętej, a także Purwin i in. (2014b) dla zielonki świeżej i przewiędniętej (70,3 g vs. 58,9 g·kg^{-1} SM, odpowiednio).

Wartości WSC/BC odnotowane w wynikach własnych były zbliżone do koniczyny czerwonej (1,4) i wysoko nawożonych azotem traw pastewnych kolejnych odrostów (1,4) zgodnie z Weissbach, Auerbach (2013). Stwierdzona w zielonkach wartość wskaźnika FC była znacznie wyższa w porównaniu do danych literaturowych dla lucerny (26). Uzyskany w badaniach własnych wskaźnik FC dla świeżej lucerny był porównywalny do koniczyny czerwonej (31) (Weissbach, Auerbach, 2013).

Wartość paszową wszystkich sporządzonych kiszonek można było uznać za wysoką, z uwzględnieniem relacji zawartości BO względem węglowodanów strukturalnych. Przy zbliżonej SM (240,5 g i 340,0 g·kg^{-1} FM) oraz BO (215 i 211 g·kg^{-1} SM) dla kiszonki z lucerny zebranej we wczesnej fazie pąkowania, Hartinger i in. (2019) odnotowali wyższe wyniki NDF (463 i 446 g·kg^{-1} SM), ADF (364 i 338 g·kg^{-1} SM), a także ADL (88 i 90 g·kg^{-1} SM). Rezultaty badań Grabber, Coblentz (2009) były

zbliżone, kiszonka z lucerny o koncentracji 221 g BO·kg^{-1} SM uzyskała 436 g NDF i 349 g ADF w kg SM.

Zawartość WSC po zakiszeniu lucerny po 12 h więdnięcia z dodatkiem 0 g i 0,5 g suchego lodu była porównywalna z wartościami kiszonek bez dodatków (Guo i in. 2018) (5,4 g·kg^{-1} SM). Pozostałe kiszonki z lucerny 0 h (0 g, 0,5 g, 1 g, 2 g suchego lodu) i lucerny 12 h (1 g, 2 g suchego lodu) miały ilość WSC zbliżoną do wyników uzyskanych przez Lin i in. (2023), dla kiszonek z różnych odmian lucerny (13,4 – 22,2 g·kg^{-1} SM). Najwyższe pozostałości WSC po zakiszeniu odnotowano w kiszonkach z lucerny 24 h, co mogło wynikać z ekstensywnego przebiegu fermentacji mlekowej w tych próbach. Potwierdza to także najniższa koncentracja kwasu mlekowego w tej grupie kiszonek, a spowodowane było to najprawdopodobniej wyższą koncentracją SM (Lin i in., 2023; McDonald i in., 1991). W niniejszych badaniach różnice w ilości resztkowego WSC można tłumaczyć zróżnicowaniem SM zielonek, co potencjalnie przekładało się na skład ilościowy i jakościowy mikroflory epifitycznej, a następnie stopień intensywności przebiegu fermentacji, a także różnicami w pojemności buforowej (Purwin, 2007).

Prawidłowo przefermentowana lucerna powinna uzyskać kwasowość na poziomie 4,3 – 4,5 przy SM < 30 – 35%, lub też 4,7 – 5,0 dla wyższej zawartości SM (45 – 55%) (Kung i in., 2018). W badaniach własnych jedynie kiszonki z lucerny 0 h miały wartości pH bliskie rekomendowanym. Można przypuszczać, że kiszonki o wyższej wilgotności zakonserwowane w tego samego typu mikrosilosach charakteryzowały się mniejszą porowatością i lepszymi warunkami tlenowymi już od pierwszych godzin fermentacji (Nowak, Šarec, 2001). Według Kung, Shaver (2001) typowymi przyczynami, dla których kiszonki z roślin bobowatych mają pH wyższe niż 4,6 do 4,8 to zakiszanie zielonki o SM <30%, co powoduje fermentację clostridiową, bądź też zbyt wysoka SM zielonki (>45 – 50%), co z kolei ogranicza aktywność bakterii fermentacji mlekowej. W pierwszym przypadku zawartość SM była zgodna z kiszonkami doświadczalnymi przygotowanymi z lucerny 0 h, jednak nie odnotowano w wynikach własnych obecności kwasu masłowego na takim poziomie, aby można było wykazać zajście fermentacji masłowej. Natomiast w drugim przykładzie, zakiszania zbyt suchej zielonki wysokie pH spowodowane było najprawdopodobniej ograniczoną fermentacją, gdyż rozwój i namnażanie bakterii były inhibitowane przez niedobór wody (Kung, Shaver, 2001).

W stosunku do wartości rekomendowanych dla koncentracji kwasu mlekowego 60 – 80 g·kg^{-1} SM (< 30 – 35% SM) oraz 20 – 40 g·kg^{-1} SM (45 – 55% SM) w kiszonkach z roślin bobowatych, podanych przez Kung i in. (2018), wyniki własne dla pierwszej

grupy (lucerny 0 h) można uznać za wysokie. W grupach gdzie zakiszono lucernę przewiędniętą (12 h i 24 h) ilość kwasu mlekowego była niższa niż zalecana, adekwatnie do uzyskanych wartości SM. Ten kwas jest silniejszym kwasem niż pozostałe obecne w kiszonce (octowy, propionowy, masłowy), a zatem jest zwykle odpowiedzialny za obniżenie pH kiszonki, co zostało również potwierdzone w badaniach własnych (Kung, Shaver, 2001). Niższe w stosunku do danych literaturowych zawartości kwasu mlekowego wynikać mogły przede wszystkim z ograniczonego przebiegu fermentacji, co było bezpośrednio spowodowane wysoką SM (Kung, Shaver, 2001). Pomimo niskich wartości liczbowych uzyskanych dla głównego produktu fermentacji mlekowej, to kiszonki własne spełniły warunek podany przez Kung, Shaver (2001), gdzie kwas mlekowy powinien stanowić co najmniej 65 – 70% całości kwasów kiszonkowych w paszy dobrej jakości. Według Guo i in. (2018) fermentację mlekową można podzielić na dwa typy homofermentację i heterofermentację. Homofermentacja polega na wytwarzaniu głównie kwasu mlekowego, podczas gdy heterofermentacja skutkuje wytworzeniem również kwasu octowego i etanolu (Pahlow i in., 2003). Wraz ze wzrostem zawartości kwasu mlekowego hamowane są bakterie homofermentatywne, podczas gdy grupa heterofermentatywna zaczyna dominować ze względu na silniejszą tolerancję na obecny kwas octowy i stopień zakwaszenia masy roślinnej, a homofermentacja stopniowo przechodzi w heterofermentację (Shao, Zhang, Shimojo, Wang, Masuda, 2005).

Bardzo wilgotne zielonki (< 25% SM) podobnie jak własna grupa lucerny 0 h więdnięcia charakteryzują się przedłużoną fermentacją, ze względu na wysoką pojemność buforową (Kung, Shaver, 2001). Takie kiszonki często też osiągają wysokie zawartości kwasu octowego (> 30 do 40 $g \cdot kg^{-1}$ SM) (Kung, Shaver, 2001), czego nie dowiedziono w przeprowadzonym doświadczeniu. Uzyskane wartości kwasu octowego były niższe nawet od wyników podanych jako zawartości optymalne dla dobrej jakości kiszonki z roślin bobowatych (5 – 30 $g \cdot kg^{-1}$ SM) (Kung i in., 2018). Tylko pojedyncze warianty zakiszonej lucerny miały wyniki zbliżone do wartości rekomendowanych. Tak niska koncentracja kwasu octowego może być niekorzystna, gdyż kwas ten wykazuje działanie inhibitujące wobec drożdży i wpływa na stabilność tlenową paszy objętościowej (Kung i in., 2000). Wraz ze wzrostem SM w kiszonkach obniżała się zawartość kwasu octowego, co jest cechą charakterystyczną, gdyż masa roślinna nie miała odpowiednio wysokiej wilgotności do namnażania i aktywności bakterii produkujących kwas octowy (McDonald i in., 1991).

Udział kwasu propionowego w sporządzonych kiszonkach był właściwy względem sugerowanych wartości przez Kung i in. (2018) (< 1 g·kg^{-1} SM). Literatura donosi, że wzrost poziomu SM obniża produkcję kwasu propionowego podczas zakiszania, co zaobserwowano w wynikach własnych (Kung i in., 2018). Podstawowym powodem niskiej aktywności bakterii produkujących kwas propionowy mógł być fakt, że mikroorganizmy te namnażają się mało dynamicznie i mają obniżoną tolerancję na zakwaszenie, przy niskiej wilgotności surowca roślinnego (Kung, Shaver, 2001). Ponadto niektóre z bakterii fermentacji mlekowej mogą oddziaływać hamująco na wzrost mikroorganizmów odpowiedzialnych za produkcję kwasu propionowego (Schwenninger, Meile, 2004). Ciekawą obserwacją, jest fakt, że kiszonki o niższym pH (4,45 – 4,58) z grupy lucerny 0 h więdnięcia charakteryzowały się wyższymi ilościami kwasu propionowego, gdyż produkcja tego kwasu prowadzona przez *Propionibacterium* spp. ustaje przy pH równym 4,80 (Lind, Jonsson, Schnürer, 2005).

Kiszonki wysokiej jakości w swoim profilu fermentacji nie mają wykrywalnego kwasu masłowego (Pahlow i in., 2003), a ilości na poziomie 5 g·kg^{-1} SM, według Kung, Shaver (2001) uznawane są za wysokie, wskazując na aktywność *Clostridium* spp. Zgodnie z Kung i in. (2018) sporządzone kiszonki nie miały obniżonej jakości, a poziom kwasu masłowego nie przekraczał 1,6 g·kg^{-1} SM. Niskie ilości wyprodukowanego kwasu masłowego podczas zakiszania lucerny 24h mogły wynikać ze wzrostu SM, czego wynikiem był wzrost ciśnienia osmotycznego hamujący aktywność bakterii fermentacji masłowej (Mills, Kung, 2002). Wyższa zawartość kwasu masłowego w wybranych wariantach własnych mogła wynikać z niedostatecznego tempa obniżenia pH, co dodatkowo potwierdziła wyższa zawartość kwasu octowego w tych próbkach doświadczalnych (McDonald i in., 1991).

Etanol jest najczęściej występującym produktem fermentacji z grupy alkoholi (McDonald i in., 1991). Obecny jest często w zakiszaniu roślin bobowatych, a jego optymalne zawartości wynoszą 5 – 10 g·kg^{-1} SM (Kung i in., 2018). Żaden z analizowanych wariantów kiszonek własnych nie uzyskał koncentracji etanolu powyżej podanych wartości, co wskazuje na brak wpływu na potencjalnie niższą jakość pasz i może wskazywać na ograniczenie aktywności metabolicznej drożdży w kiszonkach (Kung, Shaver, 2001).

Według Muck, Kung (1997) kiszonka o właściwym przebiegu fermentacji i wysokiej jakości paszowej powinna charakteryzować się stosunkiem kwasu mlekowego do kwasu octowego w zakresie od 2,5 do 3,0, której nie uzyskano dla żadnej ze

sporządzonych kiszonek w niniejszych badaniach. Świadczyć to może o niewystarczającej ilości kwasu octowego jaka została wyprodukowana podczas procesu fermentacji (Schmidt i in., 2017). W następstwie kiszonki takie mogą być mniej stabilne tlenowo (Kung i in., 2018).

Procesy proteolityczne zachodzące podczas fermentacji prowadzą do zmian związków azotowych w kiszonkach, głównie wzrostu azotu rozpuszczalnego i N-NH_3 (Kung i in., 2018). Wysoka koncentracja N-NH_3 (> 120 g do 150 g·kg^{-1} $N_{ogólny}$) jest wynikiem nadmiernej degradacji BO, spowodowanej powolnym zakwaszaniem masy roślinnej, a przede wszystkim działaniem *Clostridium* spp. (Kung, Shaver, 2001). W wynikach własnych tylko warianty kiszonek z lucerny 12 h więdnięcia z dodatkiem 0 g, 0,5 g i 1g suchego lodu charakteryzowały się zawartością N-NH_3 na poziomie powyżej 120 g·kg^{-1} $N_{ogólny}$. Ogólnie rzecz biorąc kiszonki o niższej SM mają wyższą koncentracją N-NH_3 (Kung, Shaver, 2001), czego nie zaobserwowano w badaniach własnych porównując grupę kiszonek z lucerny po 0 h i 12 h więdnięcia.

W następstwie przeprowadzonej analizy statystycznej należy stwierdzić, że zastosowanie suchego lodu w zakiszaniu lucerny niezależnie od zawartości SM nie wpłynęło na przebieg fermentacji. Odnotowane różnice wynikały tylko i wyłącznie z wpływu przewiędnięcia lub też były efektem interakcji obu czynników doświadczalnych. W poszczególnych wariantach kiszonek zaobserwowano dwa modele fermentacji opisane wcześniej przez Huhtanen i in. (2003). Grupa kiszonek z lucerny 0h prezentowała ekstensywną fermentację z wysokim poziomem kwasu mlekowego przy stosunkowo niskim poziomie LKT, ale jednak koncentracja N-NH_3 była na optymalnym poziomie. W kiszonkach z lucerny 12 h i 24 h więdnięcia stwierdzono ograniczoną fermentację z niską zawartością kwasu mlekowego i pośrednią lub wysoką pozostałością resztkowego WSC, odpowiednio dla grupy. Nie stwierdzono ostatniego typu fermentacji, wskazującego wtórną fermentację z wysokim pH i wysoką zawartością N-NH_3 oraz LKT (Huhtanen i in., 2003). Uzyskane różnice w profilu fermentacji wskazują na niższą jakość kiszonek z lucerny 12 h ze względu na wysokie pH, wysoką zawartość N-NH_3 przy niskiej zawartości kwasu mlekowego. Kiszonka z lucerny 24 h uzyskała pośrednią jakość, gdyż przy niskiej zawartości kwasu mlekowego i wysokim pH, koncentracja N-NH_3 była niska, co wskazywało na ograniczony rozkład BO, a jednocześnie próby z tej grupy miały najniższe ilości kwasu masłowego. Niepokojącym był jedynie niski poziom kwasu octowego, poniżej wartości rekomendowanych w literaturze (Kung i in., 2018). Najkorzystniejsze parametry fermentacji uzyskały kiszonki sporządzone z lucerny 0h,

których wartości analizowanych cech były zgodne z optymalnymi podanymi w literaturze (Kung, Shaver, 2001; Kung i in., 2018). Należy podkreślić także, że niższe zawartości produktów fermentacji są typowe przy wyższej SM (Muck, Kung, 1997).

Brak wpływu dodatku suchego lodu na tempo i zakres fermentacji może potencjalnie wynikać ze zbyt niskich dawek, jak i również strat podczas aplikacji i końcowego zagęszczenia do momentu zamknięcia mikrosilosów. Zasadniczo dodatek suchego lodu w temperaturze zakiszania powinien przejść w formę gazową i wypełnić wolne przestrzenie CO_2 zamiast obecnego powietrza, a to z kolei powinno skrócić tlenową fazę fermentacji. W profilu fermentacji kiszonek nie stwierdzono wpływu omawianego czynnika doświadczalnego.

Podwyższenie suchej masy lucerny jako czynnika było zgodne z zaleceniami literaturowymi, popartymi praktyką kiszonkarską. W produkcji kiszonek z lucerny zaleca się, aby zielonka była przewiędnięta przed zakiszeniem w celu poprawy jakości produktu końcowego. Proces więdnięcia sprzyja fermentacji mlekowej, minimalizując proteolizę i wzrost bakterii wtórnej fermentacji (Dawson, Ferris, Steen, Gordon, Kilpatric, 1999).

7.3.2. Związki azotowe zielonek i kiszonek

Według Fijałkowska i in. (2015) proteoliza jest dodatnio związana z proporcją białka rozpuszczalnego w roślinach bobowatych, a wartości te w badaniach własnych wzrastały wraz ze wzrostem SM. Pierwsze przemiany proteolityczne BO stwierdzono w niniejszych badaniach już na etapie więdnięcia, a ich zakres był zróżnicowany w zależności od długości procesu (Edmunds i in., 2014; Hartinger i in., 2019). Zielonka z lucerny po ścięciu powinna zawierać TP w zakresie od 70.2 do 85.0% BO, a materiał przewiędnięty od 64,2% do 82,9% BO (Guo i in., 2008; Purwin i in. 2014b). Według średnich wartości podanych w literaturze tylko zielonka z lucerny 0h w badaniach własnych uzyskała zadowalającą koncentracją TP. Uzyskane wyniki własne na jeszcze niższym poziomie w lucernie 24 h wskazywały na szerszy zakres proteolizy i niższą jakość BO zielonki (Fijałkowska i in., 2015). Guo i in. (2008) zgłosili TP na poziomie 84,7% BO dla lucerny świeżej i 82,9% BO dla przewiędniętej (10 h), natomiast w pracy Grabber (2009) było to 71,2% BO dla zielonki nieprzewiędnietej. Zbieżny wynik uzyskali Li i in. (2018a) (71,7% BO) w zielonce z lucerny przewiędniętej. Ilość TP w lucernie przewiędniętej jest ściśle uwarunkowany czasem więdnięcia i intensywnością procesu (Guo i in., 2008; Hartinger i in., 2019). W badaniach Sousa i in. (2020) podczas 6 h więdnięcia nie stwierdzono wpływu wzrostu SM na zmiany w koncentracji TP

i frakcji PB1 oraz PC, natomiast wzrosła frakcja PB2. W badaniach własnych jednak udział frakcji PA2 był wyższy niż w badaniach Sousa i in. (2020). Zaobserwowany wzrost frakcji PB2 w zielonkach własnych można uznać za korzystny i sprzyjający jakości BO lucerny, gdyż część rozpuszczalnego TP została przekształcona do frakcji wolno degradowalnej w żwaczu (Edmunds i in., 2014).

Wzrost frakcji PA2, która w dużej części obejmuje produkty proteolizy jest zależny od czasu i intensywności więdnięcia (Edmunds i in., 2014; Sousa i in., 2020). W niniejszym badaniu lucerna więdła w tempie 1,03 jednostki % SM·h^{-1}, co należy uznać jako powolne oddawanie wody z komórek roślinnych. Sousa i in. (2020) uzyskali trzykrotnie szybsze tempo więdnięcie lucerny z szybkością wzrostu o 3,1 jednostki % SM·h^{-1}. Typowe tempo więdnięcia zielonek wynosi od 0,58 do 2,30 jednostki % SM·h^{-1} (Edmunds i in. 2014; Hartinger i in., 2019). Biorąc pod uwagę czas i intensywność więdnięcia lucerny w badaniach własnych, można przypuszczać, że część rozpuszczalnego BO została związana z NDF. Wyjaśniałoby to wzrost frakcji PB2 w zielonkach własnych (Sousa i in., 2020).

Najmniejszy udział w BO zielonek stwierdzono dla frakcji PA1, której wartości były zgodne z McDonald i in. (1991) (< 1%), co jest cechą charakterystyczną zielonek (Fijałkowska i in., 2015). Cześć BO frakcji PB1 stanowi zawsze największy udział w zielonkach, co również potwierdzono w wynikach własnych (Purwin i in., 2014b). Uzyskaną koncentrację tejże frakcji w zielonkach należało uznać za wysoką, Grabber (2009) stwierdził średnio 52,30% BO w zielonce z lucerny, co było wartością pośrednią względem wyników własnych. Thers i in. (2021) dla motylkowatych (koniczyna czerwona, koniczyna biała, lucerna) i traw (życica trwała, kostrzewa łąkowa), zgłosili ilości frakcji PB1, na poziomie 40,60 – 48,60% BO.

Uzyskane wartości NDICP w pracy Purwin i in. (2014b) dla lucerny świeżej (9,61% BO) były ponad 2,5 razy wyższe względem wyników własnych dla zielonki z lucerny 0 h. Jeszcze wyższą koncentrację NDICP zgłosili Coblentz i in. (2008) w zakresie 12,20 – 14,80% BO i 9,00 – 18,70% BO. W prezentowanych badaniach jedynie zielonka 24 h uzyskała wartości zbliżone. Dotychczas tłumaczono rozbieżności w zawartości NDICP jako wypadkową udziału TP w nierozpuszczalnej pozostałości NDF i koncentracji NDF w materiale roślinnym (Coblentz i in., 2008). Przy ocenie jakości BO należy pamiętać, że wyższe zawartości NDICP przy stosunkowo niskich udziałach ADICP są korzystne, gdyż różnica tych dwóch frakcji stanowi udział wartościowej frakcji PB2 (Higgs i in., 2015; Van Amburgh i in., 2015).

Ostatnią z frakcji białkowych według systemu CNCPS v 6.5 jest frakcja PC, której udział bezpośrednio warunkuje zawartości ADICP (Higgs i in., 2015; Van Amburgh i in., 2015). Według Fijałkowska i in. (2015) średnia ilość ADICP w lucernie świeżej wynosi 4,80 – 6,86% BO, na podstawie czego należy wnioskować o wysokiej jakości BO zielonek doświadczalnych nawet po 24 h więdnięcia. Zbieżne z wynikami własnymi rezultaty dla ADICP przedstawił Grabber (2009) dla lucerny świeżej (2,80% BO). Zielonka 24 h w badaniach własnych miała wartości porównywalne do wyników dla lucerny świeżej w badaniach Purwin i in. (2014b) (6,86% BO). Wzrost ADICP podczas więdnięcia może wynikać z wystąpienia uszkodzeń termicznych zielonki, w efekcie czego indukowana zostaje kaskada reakcji Maillarda i wzrasta zawartość tej części BO (Coblentz i in., 2010), jednak w badaniach własnych więdnięcie zachodziło w temperaturze nie przekraczającej 25°C.

Proces zakiszania obniżył zawartość TP czemu towarzyszył w ocenie CNCPS v 6.5 wzrost udziału frakcji PA1 i PA2 oraz obniżenie udziału PB1 (Thers i in., 2021). Degradację TP podczas zakiszania można ograniczyć poprzez szybkie obniżenie pH (Fijałkowska i in., 2015) i właśnie takie działanie potencjalnie mogło zajść w próbach kiszonek z wyższymi udziałami suchego lodu (1 g i 2 g) w lucernie 0 h. Zmiana środowiska gazowego masy roślinnej w wyniku wprowadzenia suchego lodu (Nussbaum, 1996) mogła pozwolić na skrócenie fazy tlenowej procesu fermentacji, co zahamowało działalność roślinnych proteaz i pomimo wysokich strat TP podczas więdnięcia to kiszonki z lucerny o najwyższej SM (24 h) uzyskały najwyższą koncentracją TP.

Guo i in. (2008) uzyskali TP na poziomie 31,60% BO, podobnie Ke i in. (2018) zgłosili 30,40% BO, a w kolejnych badaniach zespołu Ke i in. (2022) koncentracja TP była jeszcze niższa (26,90% BO). Zbliżoną do wartości własnych uzyskanych w wariancie kiszonki z lucerny po 24 h z dodatkiem 1 g i/lub 2 g suchego lodu podali Yuan i in. (2017), gdzie kiszonka z lucerny uzyskała TP w ilości 40,10% BO. Podobnie zespół Dong i in. (2019) zgłosili 46,10% BO. Badania Hartinger i in. (2019) potwierdzają pozytywny wpływ więdnięcia na poprawę jakości BO kiszonki z lucerny niezależnie od stosowania innych dodatków kiszonkarskich.

Na podstawie przytoczonych wartości TP dla kiszonki z lucerny uzyskane wyniki własne dla wariantów 12 h oraz 24 h z dodatkiem 1 g i/lub 2 g suchego lodu, należy uznać za zadowalające. Ponadto uzyskane w tych próbach kiszonek wartości TP wskazują na wpływ suchego lodu na ograniczenie proteolizy podczas zakiszania lucerny. Zwykle ograniczenie degradacji TP jest przypisywane dezaktywacji proteaz z powodu niskiego

pH, około 4,0 – 5,0 (Jones, Muck, Hatfield, 1995). Jednak końcowe pH wyżej wymienionych kiszonek doświadczalnych było wyższe. Brzóska, Pieszka, Sala (1999) do czynników ograniczających proteolizę poza zakwaszeniem masy, zaliczyli także zwiększenie SM surowca przed zakiszeniem i dobre zagęszczenie zielonki zapobiegające procesom tlenowym i wzrostowi temperatury podczas fermentacji. Potwierdzają to obserwacje Makoni, Broderick, Muck (1997), którzy zakiszając lucernę w atmosferze zmodyfikowanej, w warunkach obniżonej zawartości tlenu, wykazali obniżenie udziału NPN w kiszonce jako wskaźnika przemian proteolitycznych. Przyczyną uzyskanych wyników własnych poza wpływem dodatku suchego lodu było również podwyższenie osmolarności środowiska co obniżyło aktywność enzymów proteolitycznych (Hoedtke i in., 2010; Owens i in., 1999).

Analizowana w kiszonkach doświadczalnych frakcja PA1 była zgodna z doniesieniami Kung i in. (2018) dla kiszonek z lucerny 0 h i 24 h. Najwyższe wartości uzyskane w grupie kiszonek z lucerny 12 h wskazywało na największy zakresie deaminacji, której jednym z produktów końcowych był N-NH_3 (Fijałkowska i in., 2015; McDonald i in., 1991). Na ogół wyższą koncentrację PA1 powinny mieć kiszonki o wyższej wilgotności, ze względu na intensywniejsze przemiany w pierwszym okresie fermentacji i większą aktywność proteolityczną *Clostridium* spp. (Kung i in., 2018).

Zakres przemian proteolitycznych jakie zaszły w kiszonkach doświadczalnych odzwierciedla stopień przekształcenia części frakcji PB1 do PA2, co zostało już wcześniej opisane w literaturze (Grabber, Coblentz, 2009; Guo i in., 2008; Lazarević i in., 2023). Zaobserwowane zależności wpływu czynników doświadczalnych na ograniczenie proteolizy były zgodne z uzyskanymi proporcjami w wartości frakcji białkowych. Przedstawione wyniki własne w grupie kiszonek z lucerny 24 h niezależnie od poziomu dodatku suchego lodu miały wartości zadowalające dla frakcji PA2, na co wskazują wyniki Li i in. (2018a), którzy odnotowali udział tej frakcji na poziomie 43,40% BO dla kiszonki z lucerny. Pozostałe wyniki własne, dla kiszonek 0 h i 12 h były wysokie i świadczyć mogły o znaczącej degradacji TP do prostszych form o wyższej rozpuszczalności, które charakteryzują się szybkością rozkładu w żwaczu na poziomie do 40%·h^{-1} (Van Amburgh i in., 2015).

W kiszonkach doświadczalnych koncentracja frakcji PB1 była porównywalna do udziału frakcji PA2 w kiszonkach sporządzonych z lucerny 24 h, co mogło sugerować wyższą jakość BO (Li i in., 2018a). Frakcja PB1 charakteryzuje się wysoką biodostępnością, ze względu na pośrednią rozkładalność żwaczową (3 – 20%·h^{-1}) i dobrą

dostępnością jelitową (Van Amburgh i in., 2015). Uzyskane wyniki frakcji PB1 w grupie o najwyższym zakresie proteolizy, tj. w kiszonkach z lucerny 0 h, były zbliżone z wartościami podanymi przez Li i in. (2018a) dla kiszonki z lucerny. Zatem pozostałe dwie grupy kiszonek (12 h i 24 h) należało określić jako pasze o wyższej jakości BO. Rezultaty badań własnych dla grupy kiszonek z lucerny 12 h były zbliżone do wyników badań Chrenková i in. (2012), w których dla kiszonki z lucerny frakcja PB1 stanowiła 32,10% BO. Zwykle w kiszonkach z lucerny frakcja ta ma mniejszy udział, jak na przykład 14,60% BO w badaniach Guo i in. (2008), 19,80% BO (Grabber, Coblentz, 2009), 20,60% (Hartinger i in., 2019) do 27,00% BO w pracy Sousa i in. (2020).

Zgodnie z Hymes-Fecht i in. (2013) kiszonki z lucerny zwykle uzyskują najniższe zawartości frakcji PB2, co potwierdzają również wyniki Grabber, Coblentz (2009), a także badania Hartinger i in. (2019), w których to kiszonki z lucerny niezależnie od stopnia przewiędnięcia uzyskały wartości w zakresie od 0,00 do 0,20% BO. W BO kiszonek własnych frakcja PB2 również stanowiła najmniejszą część (Licitra i in., 1996). Porównywalne z wynikami własnymi rezultaty dla kiszonki z lucerny zgłosili Guo i in. (2008) (3,26% BO), a także Sousa i in. (2020) (3,80% BO). Wyższe wartości uzyskali Li i in. (2018a), na poziomie 7,52% BO. Pomimo najniższego udziału frakcja ta jest bardzo istotna ze względu na ograniczoną degradację w żwaczu (1 – 18%·h^{-1}) i wysoką dostępność jelitową (Van Amburgh i in., 2015). Niskie udziały PB2 pośrednio warunkowane są poziomem frakcji PC, która w swoim składzie zawiera produkty reakcji Maillarda (Licitra i in., 1996).

Zgodnie z wynikami badań Guo i in. (2008) po zakiszeniu zaobserwowano wyższy udział frakcji PC w stosunku do zielonek, co mogło być spowodowane akumulacją ciepła w masie roślinnej podczas fermentacji. Uzyskane wyniki dla frakcji PC w kiszonkach doświadczalnych należy uznać za pośrednie względem danych literaturowych, które mieszczą się w szerokim zakresie od 1,71% do 10,50% BO (Grabber, 2009; Grabber, Coblentz, 2009; Hymes-Fecht i in., 2013; Schwab i in., 2003; Sousa i in., 2019). Guo i in. (2008) zgłosili jeszcze wyższe wyniki, mianowicie 12,30% BO, a Li i in. (2018a) donoszą o zawartości PC w zakiszonej lucernie na poziomie 14,80% BO. Niższe zawartości PC w kiszonkach własnych wskazują na potencjalnie wyższą strawność BO (Broderick i in., 2001).

Podsumowując ocenę składu BO lucerny zakiszanej z dodatkiem suchego lodu należy stwierdzić, że pierwsze przemiany proteolityczne zaszły już podczas więdnięcia zielonek, a ich zakres wynikał z długości i intensywności oddawania wody przez komórki

roślinne. Stwierdzone proporcje frakcji białkowych w zielonkach były zgodne z wcześniejszymi doniesienia i charakterystyczne dla uzyskanego materiału roślinnego. Zakiszanie lucerny przewiędniętej z dodatkiem suchego lodu na poziomie 1 g i/lub 2 g pozwoliło uzyskać korzystniejszy skład BO o wyższej jakości paszowej (Broderick, 2018). Uzyskane wyniki i przeprowadzona analiza sugerowały, że zastosowanie suchego lodu jako źródła CO_2 w celu modyfikacji atmosfery zakiszanej lucerny mogło skutecznie ograniczyć oddychanie komórkowe lucerny i lizę komórek podczas zakiszania co pomogło w ograniczeniu proteolizy (Makoni i in., 1997).

7.3.3. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* zielonek i kiszonek

Różnice w zakresie i tempie rozkładu SM i BO *in vitro* w przeprowadzonym doświadczeniu wynikały najprawdopodobniej z faktu, że więdnięcie i dodatek suchego lodu miały wpływ na dostęp mikroorganizmów do składników pokarmowych kiszonek w płynie żwacza (Hashemzadeh-Cigari, Khorvash, Ghorbani, Taghizadeh, 2011). Z drugiej strony mogło być to wynikiem zmiany tempa proliferacji drobnoustrojów i ich aktywności podczas procesu fermentacji (Hashemzadeh-Cigari i in., 2011). Wyższa rozkładalność SM i BO kiszonek względem zielonek wynikać mogła ze zmian jakie zaszły podczas fermentacji i wzrostu ilości łatwo strawnych składników pokarmowych (Damborg i in., 2018).

Stwierdzone w wynikach własnych istotne różnice w składzie węglowodanów strukturalnych wpłynęły na kruchość, jak i rozkład wielkości cząstek paszy, co z kolei wpłynęło na rozkładalność żwaczową SM (Eisenhardt i in., 2009). Jako substrat do fermentacji mikroorganizmów żwaczowych wykorzystywany jest N, pochodzący z paszy i energia zawarta w węglowodanach strukturalnych frakcji NDF oraz ADF. Im wyższa zawartość energii i BO w kiszonce, tym efektywność rozkładu, trawienia paszy przez mikroorganizmy żwaczowe jest większa (Camacho i in., 2010). Jednak w badaniach własnych zaobserwowano, że najwyższą ilością SM rozłożonej w żwaczu stwierdzono w grupie kiszonek z lucerny po 0 h więdnięcia (71,24%), która zawierała najmniej hemicelulozy (31,80 $g \cdot kg^{-1}$ SM) i celulozy (229,6 $g \cdot kg^{-1}$ SM) w porównaniu do kiszonek z lucerny po 12 h i 24 h przewiędnięcia (66,36% i 66,80%, odpowiednio). W kiszonkach z lucerny 0 h odnotowano najwyższą rozkładalność, gdyż średnia zawartość ligniny była najniższa (28,89 $g \cdot kg^{-1}$ SM) w stosunku do pozostałych grup 12 h i 24 h więdnięcia (59,59 g i 56,90 $g \cdot kg^{-1}$ SM, odpowiednio). Obniżenie ilości rozłożonego BO w żwaczu jest pozytywnym aspektem, który pozwala na pasaż większej ilości składników

pokarmowych kiszonek do dalszych części układu pokarmowego, co jest istotne w przypadku efektywności wykorzystania pasz u przeżuwaczy (Repetto i in., 2011; Purwin i in., 2014a).

Rozkład *in situ* w żwaczu SM kiszonki z lucerny został zbadany między innymi przez zespół Zhang i in. (2009), którzy zgłosili wartości na poziomie 63,79% po 48 h inkubacji, co było zbliżone do wyników własnych dla kiszonek z lucerny 12 h i 24 h bez dodatku suchego lodu, jak i z dodatkiem 0,5 g i 2 g suchego lodu. Warianty kiszonek doświadczalnych z podanych grup z dodatkiem 1 g suchego lodu uzyskały wyższe ilości dla rozkładalności SM po 48 h inkubacji. Porównywalne do wybranych wyników własnych ilości rozłożonej SM dla samodzielnie zakiszonej lucerny zgłosili Purwin i in. (2014a), było to 65,60% po 48 h inkubacji *in situ*. Rezultaty te były zbieżne z kiszonkami sporządzonymi z lucerny po 12 h i 24 h więdnięcia. Kiszonka przygotowana z lucerny 0 h więdnięcia charakteryzowała się wyższym stopniem rozkładalności SM, której stwierdzone wartości były porównywalne z wynikami badań zespołu Xue i in. (2020a), jak i kolejnych badań Xue i in. (2020b). W cytowanych badań określono degradację *in vitro* SM kiszonki z lucerny z kupkówką pospolitą na poziomie 65 – 71% i 68 – 74%, odpowiednio. W badaniach Purwin i in., (2014a) wartości podane dla rozkładalności BO po 48 h inkubacji (71,50%) był zbliżone do własnych dla kiszonek z lucerny 0 h z dodatkiem 2 g suchego lodu, wariantów 12 h z dodatkiem 1 g i/lub 2 g suchego lodu oraz kiszonki z lucerny 24 h z dodatkiem 1 g i/lub 2 g suchego lodu. Pozostałe warianty doświadczalne charakteryzowały się wyższą rozkładalnością BO w porównaniu wyników podanych przez Purwin i in. (2014a). Mustafa, Christensen, McKinnon (2000) ocenili rozkładalność kiszonki z lucerny przy zastosowaniu techniki *in situ*, rozkładalność SM była również porównywalna do wyników własnych, wynosiła 66,40%. Natomiast degradacja żwaczowa BO była znacznie wyższa i wynosiła 87,90%. W badaniach własnych zaprezentowano zakres wartości od 68,00% do 79,00% BO rozłożonego *in vitro* w czasie 48 h inkubacji.

Podczas więdnięcia lucerny zwiększa się część BO należącego do frakcji rozpuszczalnej i zwiększa udział frakcji potencjalnie ulegającej rozkładowi w żwaczu (Hristov, Sandev, 1998; Makoni i in., 1997). W przypadku mieszaniny lucerny z trawami Campbell, Buchanan-Smith (1991) również odnotowali niższą rozkładalność BO w żwaczu dla przewiędniętego materiału roślinnego w porównaniu do kiszonek sporządzonych z zielonek świeżych. Porównywalny wpływ więdnięcia na zmiany w rozkładalności BO wykazali Petit, Tremblay (1992). W kiszonkach z lucerny 0 h

wyższą ilość BO rozłożonego po 48h inkubacji, można wytłumaczyć również najwyższą zawartością frakcji PA2, która charakteryzuje się zaraz po frakcji PA1 najwyższym wskaźnikiem degradacji (10 – 40%·h^{-1}) (Van Amburgh i in., 2015). Pozostałe grupy kiszonek z lucerny 12 h i 24 h uzyskały statystycznie niższą ilość frakcji PA2, przy jednocześnie wyższej zawartości BO należącego do frakcji PB1, której znaczna część przechodzi do trawienia jelitowego (Higgs i in., 2015). Pośród analizowanych frakcji CNCPS v 6.5 najwyższym wskaźnikiem degradacji (200 %·h^{-1}) charakteryzuje się frakcja PA1, w całości fermentowana przez mikroorganizmy żwacza, której największe ilości uzyskano w grupie kiszonek z lucerny 0 h i 12 h. Jednak różnice w końcowej rozkładalności *in vitro* BO między grupami kiszonek z lucerny 12 h i 24 h nie były znaczne (71,44% i 71,25%, odpowiednio), a wytłumaczyć można było to faktem, że nie stwierdzono między tymi grupami istotnych różnic w pozostałych frakcjach BO (Higgs i in., 2015; Van Amburgh i in., 2015).

Badania wcześniejsze określiły szereg właściwości fizykochemicznych roślin strączkowych, w tym również lucerny, które wpływają na wzorce degradacji składników pokarmowych w żwaczu. Wykazano wyższe tempo przejścia przez żwacz świeżej lucerny w porównaniu do nieprzewiędniętej zielonki z traw. Cząsteczki kiszonki z lucerny rozkładają się szybko, tak że pomimo dużej szybkości przejścia przez żwacz, w żwaczu znajduje się duży udział cząstek o średnicy mniejszej niż 2 mm (Dewhurst i in., 2003; Wilson i Kennedy, 1996). Jednakże wysoki współczynnik pasażu i nieodłącznie niższa strawność kiszonki z lucerny łącznie dają niższy stopień efektywności wykorzystania składników pokarmowych paszy, które przekładają się następnie na niższe efekty produkcyjne zwierząt. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi przez Dewhurst i in. (2003) efektywność energetyczna drobnoustrojów żwaczowych była najwyższa dla kiszonki z lucerny, pomimo znacznie niższe stopnia rozkładu MO, co doprowadziło do ogólnej niskiej konwersji N rozkładalnego w żwaczu do N mikrobiologicznego.

Reasumując uzyskane wyniki analizy rozkładalności *in vitro* i kinetyka rozkładu SM i BO kiszonek doświadczalnych wskazują na wpływ obu czynników doświadczalnych, zarówno dodatku suchego lodu (1 g i/lub 2 g), jak i przewiędnięcia na wyższym poziomie (24 h). Wskazane warianty doświadczalne potencjalnie mogłyby poprawić efektywność wykorzystania BO kiszonek z lucerny, co przełożyło by się na wyższą dostępność składnika w dalszych odcinkach przewodu pokarmowego. Uzyskane różnice w ilości rozłożonej SM i BO, jak i również dysproporcje w tempie degradacji

wynikać mogą ze zmiany warunków gazowych masy roślinnej podczas procesu fermentacji, a także ograniczenia proteolizy w lucernie przewiędniętej z wyższymi poziomami suchego lodu. Zależności te zaobserwowano w grupie kiszonek z lucerny po 0 h więdnięcia, w której to stwierdzono najszerszy zakres proteolizy, wskazując na najwyższy udział frakcji PA1 i PA2 w stosunku do pozostałych grup, przy jednocześnie najwyższej średniej końcowej ilości rozłożonego *in vitro* BO. Najniższą rozkładalność żwaczową *in vitro* BO stwierdzono w kiszonkach z lucerny 24 h, w których stwierdzono najwyższą zawartość TP. Mniejsza ilość rozłożonego BO poza hamującym działaniem czynników doświadczalnych na przemiany proteolityczne, mogła wynikać z większego udziału frakcji ADICP (Mustafa i in., 2000; Edmunds i in., 2012; Purwin i in., 2014a). Ponadto różnice w składzie węglowodanów strukturalnych również mogły pośrednio na zakres i tempo rozkładu składników pokarmowych. W kiszonkach z lucerny 12 h i 24 h stwierdzono najniższe rozkładalności końcowe SM, co było być wynikiem znacznie wyższej koncentracji ligniny w stosunku do kiszonek z lucerny 0 h.

7.3.4. Mikrobiom kiszonek doświadczalnych

Kiszenie opiera się na aktywności naturalnie występujących zbiorowisk drobnoustrojów, obecność powietrza podczas zakiszania powoduje proliferację drożdży, pleśni i bakterii tlenowych (Kraut-Cohen i in., 2016). Ładunek drożdży oraz pleśni w kiszonkach z lucerny rośnie wraz ze wzrostem zawartości SM (Wang i in., 2022; Wu i in., 2021;). Tendencję tę zaobserwowano także w badaniach własnych dla całkowitej liczebności grzybów, a różnice były potwierdzone statystycznie. Całkowitą liczebność grzybów uzyskaną w kiszonkach doświadczalnych należało uznać za wysoką w stosunku do wyników zgłoszonych przez Fijałkowska i in. (2019) w trawie zakiszonej bez dodatków (poniżej 4,0 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM). Wyższe wartości liczbowe zostały zgłoszone przez Autorów w kiszonkach z traw z dodatkiem inokulantów, jednak nie przekraczały poziomu 4,5 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM (Fijałkowska i in., 2019). Kiszonki sporządzone z lucerny 24 h wyróżniały się najwyższą liczebnością grzybów, co potwierdza wpływ przewiędnięcia oraz niedostatecznej ilości kwasu octowego (Kung i in., 2018).

Zastosowanie suchego lodu w badaniach własnych miało na celu skrócenie fazy tlenowej fermentacji lucerny, a oczekiwanym skutkiem była niższa liczebność grzybów i drożdży. W badaniach przeprowadzonych nad zakiszaniem kukurydzy z dodatkiem suchego lodu Nussbaum (1996) stwierdził brak wpływu czynnika doświadczalnego na

liczebność poszczególnych grup drobnoustrojów zasiedlających kiszonkę. Liczebność drożdży oznaczona w kiszonce z kukurydzy w pracy Nussbaum (1996) z dodatkiem suchego lodu miała dwukrotnie wyższe wartości w stosunku do kukurydzy zakiszonej bez dodatku. Literatura wcześniejsza wskazuje na przesłanki, że zamiar wyparcia tlenu z silosu poprzez zastosowanie CO_2 w formie stałej lub gazowej nie okazała się skuteczna.

Całkowita liczebność bakterii stwierdzona w kiszonkach doświadczalnych była porównywalna do wyników przedstawionych w pracy Fijałkowska i in. (2019), którzy dla kiszonki z traw z dodatkiem inokulantu stwierdzili najwyższą liczebność bakterii (9,1 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM). Hartinger i in. (2020) w kiszonce z lucerny odnotowali zbliżone wartości, na poziomie 9,4 log10 liczby kopii genu·g^{-1} SM. Zgodnie z literaturą całkowita liczebność bakterii nie jest jednoznacznym odzwierciedleniem jakości mikrobiologicznej kiszonek, a dopiero informacje o bakteriach co najmniej na poziomie rodzaju, czy też na poziomie gatunku, szczepu (Peng i in., 2018; Hartinger i in., 2020). Różnice w ilości produktów procesu fermentacji uzyskane w kiszonkach nie wynikały jednoznacznie z całkowitej liczebności bakterii, ale z różnic struktury mikrobiomu bakteryjnego na poziomie rodzaju (Hartinger i in., 2020).

W badaniach własnych stwierdzono obecność wariantów kiszonek, w których względna liczebność bakterii kwasu mlekowego wynosiła ponad 95% ogółu zdefiniowanych rodzajów mikroorganizmów. W literaturze taki poziom dominacji jest określany jako nieczęsty ze względu na wysokie zróżnicowanie środowiska zielonek przed zakiszeniem (Kraut-Cohen i in., 2016). Ten poziom dominacji struktury mikrobiomu bakteryjnego kiszonek powiązany jest zwykle z ekstremalnie kwasowym pH i dużą ilością kwasów kiszonkarskich. W badaniach własnych kiszonki z lucerny przewiędniętej (12 h i 24 h) pomimo dominującego udziału bakterii fermentacji mlekowej uzyskał stosunkowo niską koncentrację kwasu mlekowego i za wysokie pH względem wartości optymalnych (Kung i in., 2018). Można to wytłumaczyć etapem przejściowym, w którym to kiszonka nie jest w pełni dojrzała w momencie wykonania analizy i/lub skarmiania, bądź też alternatywnie może to sugerować redundancję funkcjonalną, czyli nadmiarowość pewnych grup drobnoustrojów, które pełnią funkcje podobne do pałeczek kwasu mlekowego. Badania Ogiy, Chen, Pasvolsky, Weinberg, Shemesh (2015) wykazały, że dynamika gatunków bakterii fermentacji mlekowej jest bardzo złożona, a poszczególne szczepy są w stanie ze są konkurować, podobnie jak z innymi członkami społeczności bakteryjnej i mogą zmniejszyć liczebność *Lactobacillus plantarum*,

Lactobacillus brevis czy *Lactobacillus lactis*, wpływając przy tym na właściwości fizykochemiczne kiszonek (Eikmeyer i in., 2013).

Główne rodzaje bakterii biorące udział w fermentacji mlekowej podczas zakiszania lucerny to *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* i *Leuconostoc* (Ni i in., 2018; Pang i in., 2011), co zaobserwowano również w strukturze mikrobiomu bakteryjnego kiszonek własnych. W badaniach Yang, Wang, Zhao, Feng, Fan (2022) wykazano, że proces więdnięcia spowodował zmianę głównego rodzaju bakterii uczestniczących w fermentacji mlekowej w grupie kontrolnej kiszonki z lucerny z *Lactobacillus* na *Pediococcus*. Natomiast w badaniach własnych zaobserwowano zmianę dominacji *Lactobacillus* na *Weissella* w grupie kiszonek z lucerny po 12 h i 24 h więdnięcia z dodatkiem 0,5 g i 1 g suchego lodu.

Według Kung i in. (2003a; 2003b) bakterie rodzaju *Pediococcus* rosną szybko podczas zakiszania, gdy pH mieści się w zakresie od 5,0 do 6,5. Uzyskane w badaniu własnym wyższe udziału rodzaju *Lactobacillus* w kiszonce z lucerny 0 h, można wytłumaczyć tym, że bakterie te mogły być bardziej konkurencyjne niż pozostałe bakterie fermentacji mlekowej w warunkach wyższej wilgotności w stosunku do grupy kiszonek z lucerny przewiędniętej, co zaobserwowano również w badaniach Yang i in. (2022). Podobnie jak w badaniach własnych Yang i in. (2022) stwierdzili wyraźny udział rodzaju *Enterococcus* w kiszonce z lucerny przewiędniętej w stosunku do lucerny świeżej. Dominującym w kiszonkach własnych z lucerny przewiędniętej był również rodzaj *Weissella*, który jest rodzajem heterofermentacyjnym i jest uważany za wrażliwy w stosunku do niższych wartości pH w kiszonce (Yang i in., 2019), co by tłumaczyło niższy udział tego rodzaju w kiszonkach z lucerny świeżej, które uzyskał niższe wartości pH względem kiszonek z lucerny przewiędniętej. Według danych zgłoszonych przez zespół Drouin, Tremblay, da Silva, Apper (2022) w pociętej zielonce przed zakiszeniem dominował *Pseudomonas* spp., ale już po pierwszym dniu kiszenia rodzaj *Weissella* stał się głównym rodzajem społeczności bakteryjnej. *Weissella* spp. podczas fermentacji wytwarza głównie D-mleczan, kwas octowy i CO_2, przyczyniając się w ten sposób do spontanicznej fermentacji kiszonki (Fessard, Remize, 2017). Ponadto z niedawnego przeglądu literatury wynika, że ten rodzaj bakterii może być bezpiecznie stosowany w paszach dla zwierząt (Sturino, 2018). W lucernie o zawartości SM na poziomie 270 $g \cdot kg^{-1}$ FM, Wang i in. (2022) zaobserwowali, że po trzech dniach kiszenia bakterie rodzaju *Weissella* stanowiły mniej niż 10% całkowitej populacji, podczas gdy *Lactobacillus* był obecny przy wysokim udziale, około 40%. Wśród ostatnich badań

mikroflory kiszonki z lucerny kilka wykazało, że rodzaje *Weissella* i *Pediocccus* często występują bardzo obficie na wczesnych etapach fermentacji (Ogunade i in., 2018a; Ogunade i in., 2018b; Yuan i in., 2020). W niniejszych badaniach własnych oba rodzaje były obecne po 90 dniach kiszenia. W kiszonkach z grupy lucerny 12 h *Weissella* spp. stanowił od 31,07 do 53,74% społeczności bakteryjnej, co należało uznać za wysokie wartości. Dla porównania Drouin i in. (2022) zgłosili udział tego rodzaju bakterii na poziomie 45% w próbach kontrolnych po 64 dniach fermentacji. Według Zhang i in. (2018) na obecność tego rodzaju wpływa wiele czynników, w tym poziom SM lucerny, temperatura inkubacji prób. Wyniki sekwencjonowania amplikonu wykazały, że rodzaj *Weissella* stanowił około 25% w próbkach inkubowanych w temperaturze 30°C, a także w wyniku spadku temperatury do 20°C odnotowano brak tego rodzaju w kiszonkach (Yang i in., 2022). Zmiany temperatury podczas fermentacji w kiszonce wynikać też mogą z zakiszanego surowca, poziomu SM, zastosowania dodatków, jak i wpływu czynników otoczenia (Kung i in., 2018).

Wcześniejsze badania Ogunade i in. (2018a; 2018b) oraz Yang i in. (2019) wykazały pozytywny wpływ rodzaju *Lactobacillus* na właściwości fermentacyjne kiszonki z lucerny, w tym na obniżenie pH, wyższą produkcję kwasu mlekowego i hamowanie produkcji kwasu masłowego oraz N-NH_3, czego nie potwierdziły w całości badania własne. W grupie kiszonek z lucerny świeżej o najwyższym udziale bakterii rodzaju *Lactobacillus* uzyskano najniższe pH i najwyższą koncentracją kwasu mlekowego, ilość powstałego kwasu masłowego była ograniczona, jednak kiszonki te charakteryzowały się jednocześnie najwyższą zawartością N-N-NH_3. *Lactobacillus* spp. jest uważany za jednego z głównych producentów kwasu mlekowego w kiszonce i odgrywa ważną rolę w obniżaniu pH i hamowaniu wzrostu mikroorganizmów proteolitycznych podczas zakiszania (Cai, Benno, Ogawa, Ohmomo, Kumai, 1998). Chociaż *Leuconostoc* jest również uważany za główny rodzaj biorący udział w fermentacji mlekowej podczas kiszenia, w tym badaniu występował w niewielkiej ilości w kiszonkach z lucerny świeżej i po 24 h więdnięcia w zbiorowiskach bakterii poniżej 1% (Yang i in., 2022).

Lucerna jest rośliną trudną do fermentacji, dlatego jeśli ilość lub aktywność bakterii fermentacji mlekowej nie jest wystarczająca do zapoczątkowania procesu, mogą rozwinąć się *Clostridium* spp. i obniżyć jakość kiszonki. Ponadto proces więdnięcia lucerny może zwiększać liczbę drożdży i powodować niestabilność tlenową (Lin i in., 1992). Każda modyfikacja podczas procesu fermentacji lucerny może doprowadzić do

punktu, w którym poziom kwasowości jest wystarczająco wysoki aby otworzyć specyficzne nisze metaboliczne dla różnych gatunków mikroorganizmów, ale także ograniczając funkcje metaboliczne dotychczas rozwiniętych gatunków i zmniejszyć ilość produkowanych przez nie bakteriocyn (Ge, Kang, Ping, 2019). Następstwem może być wzrost bakterii *Clostridium* spp., co zaobserwowano w badaniach własnych dla kilku wariantów, a w największym stopniu dla kiszonki z lucerny 0 h bez dodatku suchego lodu. Bakterie rodzaju *Clostridium* występują głównie w kiszonkach z bobowatych nie poddanych wcześniej więdnięciu, zanieczyszczonych glebą lub obornikiem i mogą powodować proteolizę, wytwarzać toksyczne aminy biogenne oraz mieć działanie toksyczne na organizm zwierzęcy (Queiroz i in., 2018). W związku z tym obecność bakterii tego rodzaju jest jednym z głównych kryteriów oceny jakości mikrobiologicznej kiszonek. Jednakże tylko w jednym wariancie doświadczalnym wykryto ilości *Clostridium* spp. (> 1%).

Porównanie struktury mikrobiomu bakteryjnego kiszonek na poziomie rodzajów dowiodło, że niezależnie od dawki suchego lodu wystąpiła duża zmienność taksonów eudominujących w kiszonkach z lucerny 0 h i 24 h. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim bakterii kwasu mlekowego, co świadczyło o losowej, wewnętrznej konkurencji pomiędzy taksonami wykorzystującymi te same substraty pokarmowe. Efektem tej konkurencji może mogą być zmiany w profilu metabolitów kiszonki, co wynika ze specyfiki różnych taksonów bakterii mlekowych. Na poziomie rodzaju zaobserwowano zmiany w składzie taksonomicznym bakterii pod wpływem dawki suchego lodu. Zgrupowanie wszystkich trzech wariantów nietraktowanych suchym lodem w jednej grupie wskazuje na ich odmienność od kiszonek z każdą dawką, oprócz wariantu 0 h z dodatkiem 0,5 g suchego lodu. Należy zwrócić uwagę, że w pozostałych grupach, tj. kiszonek z lucerny po 0 h więdnięcia z dodatkiem 1 g i 2 g suchego lodu, kiszonek z lucerny 12 h z dodatkiem 0,5 g, 1 g, 2 g suchego lodu i kiszonek z lucerny 24 h z dodatkiem 0,5 g, 1 g oraz 2 g suchego lodu, nie wykazano żadnej tendencji w stosunku do dawki dodatku suchego lodu, co wpłynęło na otrzymanie niskiego współczynnika determinacji. Wyniki te świadczą o zmianie warunków procesu zakiszania po dodaniu suchego lodu, ale też wskazują na zmniejszenie stabilności mikrobiologicznej po zastosowaniu suchego lodu. Porównując wyniki na poziomie rodzajów, świadczące o podobieństwie mikrobiomów pod względem czasu więdnięcia można wywnioskować, że przetasowania taksonomiczne zachodziły tylko w obrębie dominujących rodzajów (*Lactobacillus* spp. i *Weissella* spp.).

W kilku badaniach oceniano skład społeczności bakteryjnej kiszonek w warunkach laboratoryjnych dla różnych roślin pastewnych (Eikmeyer i in., 2013). Według ich autorów konfiguracje na skalę laboratoryjną często nie są w stanie uwzględnić czynników, które mogą lub też nie, wystąpić podczas zwiększenia skali produkcji, dlatego też potrzebne są badania oceniające skład mikrobiomu bakteryjnego kiszonek w takim samym układzie doświadczalnym w skali produkcyjnej. Mikroflora kiszonki odgrywa ważną rolę w ułatwieniu procesu zakiszania, a dynamika zmian mikroflory w procesie fermentacji kiszonki jest jednym z kluczowych czynników determinujących jakość kiszonek. Zatem dobre zrozumienie procesu powstawania kiszonki może służyć jako cenna podstawa naukowa do poprawy jakości kiszonki i minimalizacji strat zepsucia podczas procesu (Drouin i in., 2022; Yang i in., 2022).

8. Podsumowanie

Zadanie badawcze I

Parametry fermentacji sporządzonych kiszonek lucerny z różnymi poziomami komonicy zwyczajnej przedstawiały model ekstensywnej fermentacji mlekowej, ze stosunkowo niskim poziomem N-NH_3 i niską sumą LKT. Najwyższą jakość fermentacyjną uzyskały kiszonki lucerny z 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej.

Jakość BO kiszonek lucerny z 30%, 40% i 50% udziałem komonicy zwyczajnej była wyższa według systemu CNCPS v 6.5 w stosunku do samodzielnie zakiszonej lucerny. Charakteryzowały się one niższym udziałem frakcji PA2 i najwyższym poziomem wartościowych frakcji PB1 oraz PB2. Stwierdzono wpływ zastosowania 40% i 50% komonicy zwyczajnej w zakiszaniu lucerny na ograniczenie degradacji TP.

W analizie rozkładalności *in vitro* i kinetyki rozkładu BO kiszonek wykazano, że zakiszenie lucerny z 50% udziałem komonicy zwyczajnej może potencjalnie wpłynąć na poprawę efektywności wykorzystania składnika w żywieniu przeżuwaczy.

Odnotowane wyniki dla rozkładalności *in vitro* SM kiszonek charakteryzowały się zróżnicowaną kinetyką rozkładu, jednak ilość rozłożonej SM po 48 h inkubacji była zbieżna dla wszystkich kiszonek, niezależnie od udziału komonicy zwyczajnej.

Struktura mikrobiomu bakteryjnego sporządzonych kiszonek była zdominowana przez bakterie fermentacji mlekowej rodzajów *Weissella*, *Loigolactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lentilactobacillus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Levilactobacillus* oraz *Latilactobacillus*. Największe zróżnicowane społeczności bakteryjnej stwierdzono w kiszonce lucerny z 50% udziałem komonicy zwyczajnej.

Zadanie badawcze II

Dodatek łuski bobiku do zakiszanej lucerny wpłynął na obniżenie wartości pokarmowej kiszonek poprzez obniżenie zawartości BO oraz zwiększeniu udziału ligniny. Wzrost SM kiszonek wpłynął natomiast na poprawę profilu fermentacji oraz ograniczenie liczebności i aktywności zarodników *Clostridium* spp.

Najkorzystniejszym składem BO według systemu CNCPS v 6.5 odznaczały się warianty kiszonki lucerny z 18,0% i 24,0% łuski bobiku, w których stwierdzono niższą zawartość frakcji PA2 i najwyższe udziały frakcji PB1. Odnotowano istotne interakcje rodzaju i dawki zastosowanego dodatku na skład BO kiszonek doświadczalnych.

Zastosowanie łuski bobiku w ilości 12,0%, 18,0% i 24,0% wpłynęło na obniżenie tempa degradacji *in vitro* BO w porównaniu z zastosowanymi analogicznymi dodatkami słomy pszennej w zakiszaniu lucerny, co potwierdziło aktywność tanin zawartych w łusce.

Analiza mikrobiomu bakteryjnego kiszonek doświadczalnych wykazała dominację rodzajów *Weissella*, *Lactiplantibacillus*, *Pantoea*, *Loigolactobacillus*, *Latilactobacillus* i *Levilactobacillus*, co wskazywało na dominującą w kiszonkach fermentację mlekową. Wpływ na skład i różnorodność mikrobiomu kiszonek miał również poziom wilgotności, który zmieniał się wraz ze wzrastającym udziałem dodatków. Większą różnorodność struktury społeczności bakteryjnej zaobserwowano w kiszonkach lucerny z dodatkiem łuski bobiku w porównaniu do zastosowania dodatku słomy pszennej.

Zadanie badawcze III

Zastosowanie suchego lodu podczas zakiszania lucerny nie wpłynęło na przebieg fermentacji. Różnice wynikały wyłącznie z wpływu więdnięcia, lub były efektem wpływu obu czynników doświadczalnych. W sporządzonych kiszonkach uzyskano dwa typy fermentacji mlekowej. Kiszonki z lucerny 0 h więdnięcia wyróżniała fermentacja ekstensywna z wysoką zawartością kwasu mlekowej i niską sumą LKT. Kiszonki z lucerny 12 h i 24 h więdnięcia natomiast wykazywały typ fermentacji ograniczonej z niską ilością kwasu mlekowego i wyższą pozostałością WSC.

W wyniku dodatku 1 g i/lub 2 g suchego lodu do zakiszanej lucerny po 12 h i 24 h więdnięcia stwierdzono ograniczenie hydrolizy TP. Najszerszy zakres proteolizy został odnotowany w kiszonkach z lucerny świeżej (0 h) w grupie kontrolnej bez dodatku (0 g) lub z najniższym dodatkiem suchego lodu (0,5 g). Kiszonki z lucerny przewiędniętej przez 24 h niezależnie od zastosowania suchego lodu charakteryzował najkorzystniejszy skład BO według systemu CNCPS v 6.5. W oparciu o uzyskane wyniki rozkładalności, jak i kinetyki rozkładu BO, warianty kiszonek z lucerny 12 h i 24 h z dodatkiem 1 g i/lub 2 g suchego lodu mogłyby potencjalnie poprawić efektywność wykorzystania składnika kiszonek.

Analiza struktury mikrobiomu bakteryjnego kiszonek doświadczalnych wykonana na poziomie rodzaju wykazała, że niezależnie od ilości zastosowanego suchego lodu zanotowano znaczną zmienność eudominantów w grupie 0 h i 24 h. Zaobserwowane zmiany obejmowały głównie rodzaje bakterii fermentacji mlekowej, na podstawie czego można było stwierdzić o losowym, wewnętrznym oddziaływaniu pomiędzy taksonami,

które metabolizowały te same grupy substratów. Najbardziej znaczące przegrupowania taksonomiczne miały miejsce w obrębie rodzajów *Lactobacillus* i *Weissella*. Najmniej zróżnicowaną społeczność bakteryjną odnotowano w grupie kiszonek przygotowanych z lucerny świeżej, która charakteryzowała się najwyższą zawartością wody.

9. Uogólnienia i wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić, że:

1. Współzakiszanie lucerny z komonicą zwyczajną w stosunku 50:50 pozwoliło na ograniczenie hydrolizy białka właściwego.
2. Dodatek 18,0% oraz 24,0% łuski bobiku do zakiszanej lucerny zahamował proteolizę, jednocześnie zwiększył udział niestrawnej frakcji białka ogólnego oraz obniżył wartość pokarmową kiszonki.
3. Łuska bobiku miała większy wpływ na proces zakiszania lucerny jako dodatek o charakterze absorbentu niż nośnika tanin.
4. Pośród zastosowanych dwóch źródeł tanin, skuteczniejszym i korzystniejszym pod względem paszowym okazała się komonica zwyczajna aniżeli łuska bobiku.
5. Łuska bobiku jako produkt uboczny obłuszczania nasion może zostać wykorzystana do produkcji kiszonek, w tym również z lucerny, pełniąc przede wszystkim rolę absorbentu, w określonych ilościach.
6. Zakiszenie lucerny z 50% udziałem komonicy zwyczajnej wpłynęło na wyższą różnorodność struktury mikrobiomu bakteryjnego kiszonek przy dominującym udziale bakterii fermentacji mlekowej, co przyczyniło się do intensywności przebiegu fermentacji.
7. Zastosowanie suchego lodu w zakiszaniu lucerny niezależnie od stopnia przewiędnięcia zielonki przed zakiszeniem nie wpłynęło na zmianę składu chemicznego, ani przebieg fermentacji, natomiast ograniczyło przemiany proteolityczne.
8. Kiszonki sporządzone z lucerny po 24 h więdnięcia niezależnie od poziomu zastosowanego suchego lodu prezentowały najkorzystniejszy skład frakcji białka ogólnego, najniższe ilości frakcji PA1 i PA2, przy najwyższej zawartości PB1.
9. Zastosowanie suchego lodu wpłynęło na ograniczenie degradacji białka właściwego podczas zakiszania lucerny, udział poszczególnych frakcji białka ogólnego był zależny od dawki suchego lodu i stopnia przewiędnięcia lucerny.
10. Kiszonki z lucerny przewiędniętej niezależnie od dawki suchego lodu uzyskały bardziej zróżnicowaną strukturę mikrobiomu bakteryjnego z dominacją bakterii fermentacji mlekowej.

Reasumując najskuteczniejszymi rozwiązaniami chroniącymi białko lucerny podczas zakiszania były współzakiszanie z 50% udziałem komonicy zwyczajnej lub dodatek suchego lodu do przewiędniętej zielonki.

10. Spis literatury

1. Aerts R.J., Barry T.N., McNabb W.C. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. Review Paper. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *75*, 1-12.
2. Aguerre M.J., Capozzolo M.C., Lencioni P., Cabral C., Wattiauxn M.A. (2016). Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *99* (6), 4476-4486.
3. Alzueta C., Caballero R., Rebole A., Trevino J., Gil A. (2001). Crude protein fractions in common vetch (*Vetch sativa* L.) fresh forage during pod filling. *Journal of Animal Science*, 79, 2449-2455.
4. Annicchiarico P., Barrett B., Brummer E.C., Julier B., Marshall A.H. (2015). Achievements and challenges in improving temperate perennial forage legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *34* (1-3), 327-380.
5. Arlabosse P., Blanc M. (2011). Thermo-mechanical fractionation of green biomass: optimisation of the processing conditions according to the water potential of the tissue. European Drying Conference, 26-28 październik, Palma, Spain.
6. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th ed., AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.
7. Auerbach H., Weiss K., Nadeau E. (2012). Benefits of using silage additives. W: Auerbach H., Luckstandt C., Weissbach F. (red.). Proceedings of the First International Silage Summit, Leipzig, Saxony, Germany, Anytime Publishing Services, Worthington, UK, 75-144.
8. Bai J., Xu D., Xie D., Wang M., Li Z., Guo X. (2020). Effects of antibacterial peptide-producing *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability, andmicrobial community of alfalfa silage. *Bioresource Technology*, *315*, 123881.
9. Bao W., Mi Z., Xu H., Zheng Y., Kwok L.Y., Zhang H., Zhang W. (2016). Assessing quality of *Medicago sativa* silage by monitoring bacterial composition with single molecule, real-time sequencing technology and various physiological parameters. *Scientific Reports*, *6*, 28358.

10. Barna D., Alshaal T., Tóth I.O., Cziáky Z., Fári M.G., Domokos-Szabolcsy É., Bákonyi N. (2022). Bioactive metabolite profile and antioxidant properties of brown juice, a processed alfalfa (*Medicago sativa*) by-product. *Heliyon, 8,* 11.
11. Besharati M., Palangi V., Salem A.Z.M., De Palo P., Lorenzo J.M., Maggiolino A. (2022). Substitution of raw lucerne with raw citrus lemon by-product in silage: *In vitro* apparent digestibility and gas production. *Frontiers in Veterinary Science*, *9,* 1006581.
12. Bhatta R., Uyeno Y., Tajima K., Takenaka A., Yabumoto Y., Nonaka I., Enishi O., Kurihara M. (2009). Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, *92,* 5512-5522.
13. Bhattarai S., Biswas D., Fu Y.B., Biligetu B. (2020). Morphological, physiological, and genetic responses to salt stress in alfalfa: a review. *Agronomy*, *10* (4), 577.
14. Bittner S. (2006). When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids*, *30*, 205-224.
15. Blume L., Hoischen-Taubner S., Sundrum A. (2021). Alfalfa – a regional protein source for all farm animals. *Landbauforschung: Journal of Sustainable and Organic Agricultural Systems*, *71* (1), 1-13.
16. BN-90/79160-62. Metoda kolorymetryczna. Oznaczanie tanin.
17. Bora K.S., Sharma A. (2011a). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharmaceutical biology*, *49* (2), 211-220.
18. Bora K.S., Sharma A. (2011b). Evaluation of antioxidant and cerebroprotective effect of *Medicago sativa* Linn. against ischemia and reperfusion insult. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 792167.
19. Borreani G., Tabacco E., Schmidt R.J., Holmes B.J., Muck R.E. (2018). Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, *101* (5), 3952-3979.
20. Bouton J.H. (2012). An overview of the role of lucerne (*Medicago sativa* L.) in pastoral agriculture. *Crop and Pasture Science*, *63* (9), 734-738.
21. Box G.E.P., Cox D.R. (1964). An analysis of transformations. *Journal of the Royal Society*, *26*, 211-252.
22. Brillard J. (2015). Role of fatty acids in bacillus environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1– 20.

23. Brink G., Hall M., Shewmaker G., Undersander D., Martin N., Walgenbach R. (2010). Changes in alfalfa yield and nutritive value within individual harvest periods. *Agronomy Journal, 102* (4), 1274-1282.
24. Broderick G.A., Yang J.H., Koegel R.G. (1993). Effect of steam heating alfalfa hay on utilization by lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science, 76*, 165.
25. Broderick G.A., Albrecht K.A. (1997). Ruminal in vitro degradation of protein in tannin-free and tannin-containing forage legume species. *Crop Science, 37*, 1884-1891.
26. Broderick G.A., Walgenbach R.P., Maignan S. (2001). Production of lactating dairy cows fed alfalfa or red clover silage at equal dry matter or crude protein contents in the diet. *Journal of Dairy Science, 84*, 1728-1737.
27. Broderick G.A., Brito A.F., Olmos Colmenero J.J. (2007). Effects of feeding formate-treated alfalfa silage or red clover silage on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science, 90* (3), 1378-1391.
28. Brzóska F., Pieszka M., Sala K. (1999). Wpływ suchej masy i dodatków fermentacyjnych na skład chemiczny i rozkład białka kiszonek z lucerny. *Roczniki Naukowe Zootechniki, 26*, 231-242.
29. Buxton D.R., O'Kiely P. (2003). Preharvest plant factors affecting ensiling. W: Buxton D.R., Muck R.E., Harrison J.H. (red.). Silage Science and Technology. Wisconsin, USA, American Society of Agronomy, 199–250.
30. Cai Y., Benno Y., Ogawa M., Ohmomo S., Kumai S. (1998). Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. *Applied and Environmental Microbiology, 64*, 2982–2987.
31. Callieri C. (2017). Synechococcus plasticity under environmental changes. *Environmental Microbiology, 364*, 229.
32. Camacho L.M., Rojo R., Salem A.Z.M., Provenza F.D., Mendoza G.D., Avilés F., Montañez-Valdez O.D. (2010). Effect of season on chemical composition and in situ degradability in cows and in adapted and unadapted goats of three Mexican browse species. *Animal Feed Science and Technology, 155*, 206–212.
33. Campbell C.P., Buchanan-Smith J.G. (1991). Effect of alfalfa grass silage dry matter content on ruminal digestion and milk production in lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science, 71* (2), 457-467.

34. Carlsson G., Huss-Danell K. (2003). Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. *Plant and Soil, 253,* 353–372.
35. Carmo C.S., Silventoinen P., Nordgard C.T., Poudroux C., Dessev T., Zobel H., Holtekjølen A.K., Draget K.I., Holopainen-Mantila U., Knutsen S.H., Sahlstrøm S. (2020). Is dehulling of peas and faba beans necessary prior to dry fractionation for the production of protein- and starch-rich fractions? Impact on physical properties, chemical composition and techno-functional properties. *Journal of Food Engineering, 278,* 109937.
36. Cavallarin L., Tabacco E., Borreani G. (2007). Forage and grain legume silages as a valuable source of proteins for dairy cows. *Italian Journal of Animal Science, 6* (1), 282-284.
37. Ceballos A., Noguera R.R., Bolivar D.M., Posada S.L. (2008). Comparison of the nylon bag in situ technique and *in vitro* (Daisy II) to estimate the kinetics of degradation of feeds for ruminants. *Livestock Research for Rural Development, 20* (7), 108.
38. Charmley E., Veira D.M. (1990a). Inhibition of proteolysis in alfalfa silages using heat at harvest: effects on digestion in rumen, voluntary intake and animal performance. *Journal of Animal Science, 68,* 2042-2051.
39. Charmley E., Veira D.M. (1990b). Inhibition of proteolysis at harvest using heat in alfalfa silages: effects on silage composition and digestion by sheep. *Journal of Animal Science, 68,* 758-766.
40. Chen Y., Sharma-Shivappa R.R., Chen Ch. (2007). Ensiling Agricultural Residues for Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 143,* 80-92.
41. Chen L., Guo G., Yuan X., Shimojo M., Yu C., Shao T. (2014). Effect of applying molasses and propionic acid on fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage prepared with whole-plant corn in Tibet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27,* 349– 356.
42. Chen L., Zhang X. (2014). A review study of solid-gas sublimation flow refrigeration: From basic mechanism to alications. *International Journal od Refrigeration, 40,* 61-83.
43. Chen L., Bao X., Guo G., Huo W., Li Q., Xu Q., Wang C., Liu Q. (2021a). Evaluation of gallnut tannin and *Lactobacillus plantarum* as natural modifiers for alfalfa silage: Ensiling characteristics, *in vitro* ruminal methane production, fermentation profile and microbiota. *Journal of Applied Microbiology, 132* (2), 907-918.

44. Chen L., Bao X., Guo G., Huo W., Xu Q., Wang C., Liu Q. (2021b). Treatment of alfalfa silage with tannin acid at different levels modulates ensiling characteristics, methane mitigation, ruminal fermentation patterns and microbiota. *Animal Feed Science and Technology*, *278*, 114997.
45. Chen L., Bao X., Guo G., Huo W., Xu Q., Wang C., Li Q., Liu Q. (2021c). Effects of hydrolysable tannin with or without condensed tannin on alfalfa silage fermentation characteristics and in vitro ruminal methane production, fermentation patterns, and microbiota. *Animals*, *11*, 1967.
46. Chiesa S., Gnansounou E. (2011). Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery–possible dietary applications: Use as animal feed and potential extension to human consumption. *Bioresource Technology*, *102* (2), 427–436.
47. Chrenková M., Formelová Z., Poláčiková M., Čerešňáková Z., Weisbjerg M.R., Chrastinová Ľ. (2012). Influence of hydrothermic processing of cereals on their nutritive value in ruminants. W: Proceedings 63th Annual Meeting, European Association for Animal Production, Bratislava, Republic, 56.
48. Chrenková M., Čerešňáková Z., Weisbjerg M.R., Formelová Z., Poláčiková M., Vondráková M. (2014). Characterization of proteins in feeds according to the CNCPS and comparison to in situ parameters. *Czech Journal of Animal Science*, *59*, 288–295.
49. Coblentz W.K., Abdelgadir I.E.O., Cochran R.C., Fritz J.O., Fick W.H., Olson K.C., Turner J.E. (1999). Degradability of forage proteins by *in situ* and *in vitro* enzymatic methods. *Journal of Dairy Science*, *82*, 343–354.
50. Coblentz W.K., Brink G.E., Martin N.P., Undersander D.J. (2008). Harvest timing effects on estimates of rumen degradable protein from alfalfa forages. *Crop Science*, *48* (2), 778-788.
51. Coblentz W.K., Fritz J.O., Fick W.H., Cochran R.C., Shirley J.E. (1998). *In situ* dry matter, nitrogen, and fiber degradation of alfalfa, red clover, and eastern gamagrass at four maturities. *Journal of Dairy Science*, *81*, 150–161.
52. Coblentz W.K., Grabber J.H. (2013). *In situ* protein degradation of alfalfa and birdsfoot trefoil hays and silages as influenced by condensed tannin concentration. *Journal of Dairy Science*, *96*, 3120–3137.
53. Coblentz W.K., Hoffman P.C., Martin N.P. (2010). Effects of spontaneous heating on forage protein fractions and in situ disappearance kinetics of crude protein for alfalfa-orchardgrass hays packaged in large round bales. *Journal of Dairy Science*, *93*, 1148-1169.

54. Coblentz W.K., Turner J.E., Scarbrough D.A., Lesmeister K.E., Johnson Z.B., Kellogg D.W., Coffey K.P., McBeth L.J., Weyers J.S. (2000). Storage characteristics and quality changes in bermudagrass hay as affected by moisture content and density of rectangular bales. *Crop Science, 40,* 1375–1383.
55. Colombari G., Crovetto G.M., Borreani G., Tabacco E., Zapparoli G.A. (2005). The addition of tannins to improve alfalfa silage. *Information Processing in Agriculture, 61*, 51-56.
56. Cope W.A., Burns J.C. (1971). Relationship between tannin levels and nutritive value of sericea. *Crop Science, 11*, 231-233.
57. Cruz R.H., Hoffmann T., Marino M., Nedjari H., Presecan-Siedel E., Dreesen O., Glaser P., Jahn D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of Bacteriology, 182*, 3072– 3080.
58. Czachorowski S. (2006). Opisywanie biocenozy – zoocenologia, skrypt elektroniczny dla magistrantów. Maszynopis dostępny w formacie PDF na www.uwm.edu.pl/czachor/publik/pdf-inne/zoocenozy (data dostępu: 16.08.2023 r.).
59. Ćwintal M., Wilczek M. (2008). Agrotechnika lucerny. W: Lucerna w żywieniu ludzi i zwierząt. Monografie pod redakcją Eugeniusza R. Greli. Studia regionalne i lokalne Polski południowo-wschodniej, Tom III, 3rd International Conference "Feed and Food Additives", Stowarzyszenie Rozwoju Regionalnego i Lokalnego "PROGRESS" w Dzierdziówce, 7-18.
60. Damborg V.K., Stødkilde L., Jensen S.K., Weisbjerg M.R. (2018). Protein value and degradation characteristics of pulp fibre fractions from screw pressed grass, clover, and lucerne. Animal Feed Science and Technology, 244: 93-103.
61. Das L.K., Kundu S.S., Kumar D., Datt Ch. (2015). Fractionation of carbohydrate and protein content of some forage feeds of ruminants for nutritive evaluation. *Vet World, 8* (2), 197-202.
62. Dawson L.E.R., Ferris C.P., Steen R.W.J., Gordon F.J., Kilpatric D.J. (1999). The effects of wilting grass before ensiling on silage intake. *Grass and Forage Science, 54*, 237-247.
63. Dear B.S., Moore G.A., Hughes S.J. (2003). Adaptation and potential contribution of temperate perennial legumes to the Southern Australian Wheatbelt: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture, 43* (1), 1-18.

64. Dechorgnat J., Nguyen Ch.T., Armengaud P., Jossier M., Diatloff E., Filleur S., Daniel-Vedele F. (2011). From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany, 62* (4), 1349-1359.
65. Dentinho M.T.P., Portugal K.P.V., Moreira O.C., Santos-Silva J., Bessa R.J.B. (2018). Proteolysis and in situ ruminal degradation of lucerne ensiled with *Cistus ladanifer* tannins. *Grass and Forage Science, 74* (1), 78-85.
66. Dewhurst R.J., Scollan N.D., Moorby J.M., Evans R.T., Merry R.J., Wilkins R.J. (2003). Comparison of grass and legume silages for milk production. 2. *In vivo* and in sacco evaluations of rumen function. *Journal of Dairy Science, 86,* 2612-2621.
67. Ding W.R., Guo X., Ataku K. (2013a). Characterization of peptides in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Animal Science Journal, 84* (12), 774-781.
68. Ding W.R., Long R.J., Guo X.S. (2013b). Effects of plant enzyme inactivation or sterilization on lipolysis and proteolysis in alfalfa silage. *Journal of Dairy Science, 96* (4), 2536–2543.
69. Dong Z., Chen L., Li J., Yuan X., Shao T. (2019). Characterization of nitrogen transformation dynamics in alfalfa and red clover and their mixture silages. *Grassland Science, 65* (2), 109-115.
70. Driehuis F., Elferink S.J.W.H.O. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. *Veterinary Quarterly, 22* (4), 212-216.
71. Driehuis F., Wilkinson J.M., Jiang Y., Ogunade I., Adesogan A.T. (2018). Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science, 101* (5), 4093-4110.
72. Drouin P., Tremblay J., da Silva EB., Apper E. (2022). Changes to the microbiome of alfalfa during the growing season and after ensiling with *Lentilactobacillus buchneri* and *Lentilactobacillus hilgardii* inoculant. *Journal of Applied Microbiology, 133* (4), 2331–2347.
73. Duc G., Marget P., Esnault R., Guen J.L., Bastiannelli D. (1999). Genetic variability for feeding value of faba bean seeds (*Vicia faba*) : Comparative chemical composition of isogenics involving zero-tannin and zero-vicine genes. *Journal of Agricultural Science, 133*, 185-196.
74. Duniére L., Sindou J., Chaucheyras-Durand F., Chevallier I., Thévenot-Sergentet D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable macroorganisms. *Animal Feed Science and Technology, 184* (4), 1-15.

75. Edmunds B., Spiekers H., Südekum K-H., Nussbauma H., Schwarza F.J., Bennetta R. (2014). Effect of extent and rate of wilting on nitrogen components of grass silage. *Grass and Forage Science, 69*, 140–152.
76. Edmunds B., Südekum K.H., Spiekers H., Schwarz F.J. (2012). Estimating ruminal crude protein degradation of forages using *in situ* and *in vitro* techniques. *Animal Feed Science and Technology, 175*, 3-4, 95-105.
77. Eikmeyer F.G., Köfinger P., Poschenel A., Jünemann S., Zakrzewski M., Heinl S., Mayrhuber E., Grabherr R., Pühler A., Schwab H., Schlüter A. (2013). Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. *Journal of Biotechnology, 167*, 334-343.
78. Eisenhardt Jr.W.A., Saleeb F.Z., McKay R.P., Zeller B.L. (2009). Method for producing dried citrus pulp. *US Patent, 4*, 477-481.
79. Elferink S.J.W.H.O., Driehuis F., Gottschal J.C., Spoelstra S.F. (2000). Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Plant Production and Protection Papers*, *161*, 17–30.
80. Elferink S.J.O., Krooneman J., Gottschal J.C., Spolestra S.F., Faber F., Driehuis F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, *67* (1), 125–132.
81. Fan X., Xie Z., Cheng Q., Li M., Long J., Lei Y., Jia Y., Chen Y., Chen Ch., Wang Z. (2022). Fermentation quality, bacterial community, and predicted functional profiles in silage prepared with alfalfa, perennial ryegrass and their mixture in the karst region. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1062515.
82. FAO. (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Alfalfa. Rome: FAO.
83. Farha A.K., Yang Q.Q., Kim G., Li H.B., Zhu F., Liu H.Y., Gan R.Y., Corke H. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, *38*, 100751.
84. Fessard A., Remize F. (2017). Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation? *Fermentation*, *3*, 38.
85. Fijałkowska M., Pysera B., Lipiński K., Strusińska D. (2015). Changes of nitrogen compounds during ensiling of high protein herbages – a review. *Annals of Animal Science, 15* (2), 289-305.
86. Fijałkowska M., Przemieniecki S.W., Purwin C., Lipiński K., Kurowski T.P., Karwowska A. (2019). The effect of an additive containing three *Lactobacillus*

species on the fermentation pattern and microbiological status of silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 100* (3), 1174-1184.

87. Filya I., Muck R.E., Contreras-Govea F.E. (2007). Inoculant effects on alfalfa silage: Fermentation products and nutritive value. *Journal of Dairy Science*, *90*, 5108–5114.
88. Fox D.G., Tedeschi L.O. (2003). Predicting dietary amino acid adequacy for ruminants. W: Amino acids in animal nutrition. Second Edition. D'Mello J.P.F. (red.). Formerly of the Scottish Agricultural College Edinburgh, UK, 389-410.
89. Fox D.G., Tedeschi L.O., Tylutki T.P., Russell J.B., Van Amburgh M.E., Chase L.E., Pell A.N., Overton T.R. (2004). The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Animal Feed Science and Technology, 112* (1-4), 29-78.
90. Fraser M.D., Fychan R., Jones R. (2000). Voluntary intake, digestibility and nitrogen utilization by sheep fed ensiled forage legumes. *Grass and Forage Science, 55* (3), 271-279.
91. Fu G., Grbic V., Ma S., Tian L. (2015). Evaluation of somatic embryos of alfalfa for recombinant protein expression. *Plant Cell Reports*, *34*, 211-221.
92. Furgał W., Milik K. (2008). Studium przypadków zastosowania koncentratu białkowo-ksantofilowego z lucerny jako suplementu diety ludzi. Application of a protein-xanthophyll lucerne concentrate as a diet suplement for humans – a case study. W: Alfalfa in Human and Animals Nutrition. Wydawnictwo Stowarzyszenia Rozwoju Regionalnego i Lokalnego Progress, Dzierdziówka – Lublin, *3*, 49-58.
93. Fychan R., Winters A., Roberts J., Evans S.T., Fraser M.D., Jones R. (1998) Establishment and production of alternative crops for ensiling. Proceedings of the British Grassland Society Winter Meeting, Peebles.
94. Gao R., Wang B., Jia T., Luo Y., Yu Z. (2021). Effects of different carbohydrate sources on alfalfa silage quality at different ensiling days. *Agriculture*, *11* (1), 58.
95. Gaweł E., Grzelak M., Janyszek M. (2017). Lucerne (*Medicago sativa* L.) in the human diet—Case reports and short reports. *Journal of Herbal Medicine*, *10*, 8-16.
96. Gąsior R. (2002). Oznaczanie lotnych kwasów tłuszczowych i kwasu mlekowego w kiszonkach i w treści żwacza. *Biuletyn Informacyjny Instytutu Zootechniki*, Balice.
97. Ge J., Kang J., Ping W. (2019). Effect of acetic acid on bacteriocin production by gram-positive. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29* (9), 1341-1348.
98. Getachew G., Dandekar A.M., Pittroff W., DePeters E.J., Putnam D.H., Goyal S., Teuber L., Uratsu S. (2009). Impacts of polyphenol oxidase enzyme expression in

transgenic alfalfa on *in vitro* gas production and ruminal degradation of protein, and nitrogen release during ensiling. *Animal Feed Science and Technology*, *151* (1-2), 44-54.

99. Getachew G., Pittforr W., Putnam D.H., Dandekar A., Goyal S., DePeters E.J. (2008). The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal Feed Science and Technology, 140* (3-4), 444-461.
100. Givens D.I., Rulquin H. (2004). Utilization by ruminants of nitrogen compounds in silage–based diets. *Animal Feed Science and Technology*, *114* (1-4), 1–18.
101. Goławska S., Łukasik I., Kapusta I., Janda B. (2010). Analysis of flavonoids content in alfalfa. *Ecological Chemistry and Engineering, 17* (2-3), 261-267.
102. Gotlieb A. (2016). Mycotoxins in silage: A silent loss in profits. Accessed Feb. 8, https://www.uvm.edu/pss/vtcrops/articles/Mycotoxins.html (dostęp: 20.05.2023 r.).
103. Grabber J.H. (2008). Mechanical maceration divergently shifts protein degradability in condensed-tannin vs. o-quinone containing conserved forages. *Crop Science, 48,* 804-813.
104. Grabber J.H. (2009). Protein fractions in forage legumes containing protein-binding polyphenols: Freeze-drying vs. conservation as hay or silage. *Animal Feed Science and Technology, 151* (3-4), 324-329.
105. Grabber J.H., Coblentz W.K. (2009). Polyphenol, conditioning, and conservation effects on protein fractions and degradability in forage legumes. *Crop Science*, *49* (4), 1511-1522.
106. Graf K., Ulrich A., Idler C., Klocke M. (2016). Bacterial community dynamics during ensiling of perennial ryegrass at two compaction levels monitored by terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Applied Microbiology, 120,* 1479-1491.
107. Grant R. (2013). Using forage fiber analyses to get the most from your cows. *World Dairy Expo Dairy Forage Seminar*, 2-5 październik, Madison.
108. Guo X., Zhou H., Yu Z., Zhang Y. (2007). Changes in the distribution of nitrogen and plant enzymatic activity during ensilage of lucerne treated with different additives. *Grass and Forage Science, 62* (1), 35-43.
109. Guo X.S., Ding W.R., Han J.G., Zhou H. (2008). Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Animal Feed Science and Technology*, *142* (1-2), 89-98.

110. Guo X.S., Cheng W., Yang F.Y., Zhou H. (2011). Contribution of endopeptidase to the formation of nonprotein nitrogen during the ensiling process of alfalfa. *Animal Feed Science and Technology, 168* (1-2), 42-50.

111. Guo X.S., Ke W.C., Ding W.R., Ding L.M., Xu D.M., Wang W.W., Zhang P., Yang F.Y. (2018). Profiling of metabolome and bacterial community dynamics in ensiled *Medicago sativa* inoculated without or with *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus buchneri*. *Scientific Reports, 8*, 357.

112. Guo X.S., Bai J., Li F.H., Xu D.M., Zhang Y.X., Bu D.P., Zhao L.S. (2020). Effects of malate, citrate, succinate and fumarate on fermentation, chemical composition, aerobic stability and digestibility of alfalfa silage. *Animal Feed Science and Technology, 268*, 114604.

113. Haarman M., Knol J. (2006). Quantitative real-time PCR analysis of fecal Lactobacillus species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology, 72*, 2359-2365.

114. Hadidi M., Palacios J.C.O., McClements D.J., Mahfouzi M., Moreno A. (2023). Alfalfa as a sustainable source of plant-based food proteins. *Trends in Food Science and Technology, 135*, 202-214.

115. Haefner J.W. (2005). Modeling Biological Systems Principles and Applications. 2nd ed. Springer, New York.

116. Halmemies-Beauchet-Filleau A., Rinne M., Lamminen M., Mapato C., Ampapon T., Wanapat M., Vanhatalo A. (20180. Review: Alternative and novel feeds for ruminants: nutritive value, product quality and environmental aspects. *Animal, 12* (2), 295-309.

117. Hartinger T., Gresner N., Südekum K-H. (2019). Effect of wilting intensity, dry matter content and sugar addition on nitrogen fractions in lucerne silages. *Agriculture, 9* (1), 11.

118. Hartinger T., Kube K., Gresner N., Südekum K.H. (2020). Varying ensiling conditions affect the fermentation quality and abundance of bacterial key players in lucerne silage. *The Journal of Agricultural Science, 158* (4), 297-303.

119. Hashemzadeh-Cigari F., Khorvash M., Ghorbani GR., Taghizadeh A. (2011). The effects of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerne silage. *South African Journal of Animal Science, 41*, 4.

120. He L., Zhou W., Wang Y., Wang C., Chen X., Zhang Q. (2018). Effect of applying lactic acid bacteria and cellulase on the fermentation quality, nutritive value, tannins

profile and in vitro digestibility of *Neolamarckia cadamba* leaves silage. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *102* (6),1429-1436.

121. He L., Wang Ch., Xing Y., Zhou W., Pian R., Yang F., Chen X., Zhang Q. (2019). Dynamics of proteolysis, protease activity and bacterial community of *Neolamarckia cadamba* leaves silage and the effects of formic acid and *Lactobacillus farciminis. Bioresource Technology*, *294*, 122127.

122. He L., Lv H., Xing Y., Chen X., Zhang Q. (2020). Intrinsic tannins affect ensiling characteristics and proteolysis of *Neolamarckia cadamba* leaf silage by largely altering bacterial community. *Bioresource Technology*, *311*, 123496.

123. Heberline J.A. (2017). Cyanobacteria: omics and manipulation. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, *36*, 980.

124. Hedqvist H., Mueller-Harvey I., Reed J.D., Krueger Ch.G., Murphy M. (2000). Characterisation of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology*, *87* (1-2), 41-56.

125. Hedqvist H., Udén P. (2006). Measurement of soluble protein degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, *126* (1-2), 1-21.

126. Hemkemeyer M., Christensen B.T., Martens R., Tebbe C.C. (2015). Soil particle size fractions harbour distinct microbial communities and differ in potential for microbial mineralisation of organic pollutants. *Soil Biology and Biochemistry*, *90*, 255-265.

127. Herremans S., Decruyenaere V., Beckers Y., Froidmont E. (2018). Silage additives to reduce protein degradation during ensiling and evaluation of *in vitro* ruminal nitrogen degradability. *Grass and Forage Science*, *74* (1), 86-96.

128. Herrero M., Henderson B., Havlík P., Thornton P.K., Conant R.T., Smith P., Wirsenius S., Hristov A.N., Gerber P., Gill M., Butterbach-Bahl K., Valin H., Garnett T., Stehfest E. (2016). Greenhouse gas mitigation potentials in the livestock sector. *Nature Climate Change*, *6*, 452-461.

129. Hierro N., Esteve-Zarzoso B., Gonzalez A., Mas A., Guillamon J.M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcriptionQPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, *72* (11), 7148-7155.

130. Higgs R.J., Chase L.E., Ross D.A., Van Amburgh M.E. (2015). Updating the Cornell Net Carbohydrate and Protein System feed library and analyzing model sensitivity to feed inputs. *Journal of Dairy Science*, *98* (9), 6340-6360.

131. Hoedtke S., Gabel M., Zeyner A. (2010). Protein degradation in feedstuffs during ensilage and changes in the composition of the crude protein fraction. Der Proteinabbau im Futter während der Silierung und Veränderungen in der Zusammensetzung der Rohproteinfraktion. *Übersichten zur Tierernährung, 38,* 157-179.

132. Hofmann T., Engling A.Ch., Martens S., Steinhöfel O., Henle T. (2020). Quantification of Maillard reaction products in animal feed. *European Food Research and Technology, 246,* 253-256.

133. Hou Z., Zheng X., Zhang X., Chen Q., Wu D. (2022). Efects of urea supplementation on the nutritional quality and microbial community of alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage. *Archives of Microbiology, 204,* 414.

134. Hrbáčková M., Dvořák P., Takáč T., Tichá M., Luptovčiak I., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2020). Biotechnological perspectives of omics and genetic engineering methods in alfalfa. *Frontiers in Plant Science, 11,* 592.

135. Hristov A.N., Sandev S.G. (1998). Proteolysis and rumen degradability of protein in alfalfa preserved as silage, wilted silage or hay. *Animal Feed Science and Technology, 72,* 175-181.

136. Hu Z., Niu H., Tong Q., Chang J., Yu J., Li S., Zhang S., Ma D. (2020). The microbiota dynamics of alfalfa silage during ensiling and after air exposure, and the metabolomics after air exposure are affected by *Lactobacillus casei* and cellulase addition. *Frontiers in Microbiology, 11,* 519121.

137. Huang R., Zhang F., Wang T., Zhang Y., Li X., Chen Y., Ma Ch. (2022). Effect of intrinsic tannins on the fermentation quality and associated with the bacterial and fungal community of sainfoin silage. *Microorganisms, 10* (5), 844.

138. Huang X.D., Liang J.B., Tan H.Y., Yahya R., Khamseekhiew B., Ho Y.W. (2010). Molecular weight and protein binding affinity of Leucaena condensed tannins and their effects on *in vitro* fermentation parameters. *Animal Feed Science and Technology, 159,* 81-87.

139. Huhtanen P., Nousiainen J.I., Khalili H., Jaakkola S., Heikkilä T. (2003). Relationships between silage fermentation characteristics and milk production parameters: analyses of literature data. *Livestock Production Science, 81,* 57-73.

140. Huhtanen P., Rinne M., Nousiainen J. (2007). Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal, 1,* 758-770.

141. Huhtanen P., Nousiainen J.I., Rinne M., Kytölä K., Khalili H. (2008). Utilization and partition of dietary nitrogen in dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science, 91* (9), 3589-3599.

142. Huo W., Zhang Y., Zhang L., Shen Ch., Chen L., Liu Q., Zhang S., Wang C., Guo G. (2022). Effect of lactobacilli inoculation on protein and carbohydrate fractions, ensiling characteristics and bacterial community of alfalfa silage. *Frontiers in Microbiology, 13*, 1070175.

143. Huyghe C. (2003). Les fourrages et la production de protéines. *Fourrages, 174*, 145-162.

144. Hymes-Fecht U.C., Broderick G.A., Muck R.E., Grabber J.H. (2013). Replacing alfalfa or red clover silage with birdsfoot trefoil silage in total mixed rations increases production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science, 96* (1), 460-469.

145. INRA. (2009). Normy żywienia przeżuwaczy. Wartość pokarmowa francuskich i krajowych pasz dla przeżuwaczy, IŻ PIB, Kraków, Polska.

146. Ivarsson E., Grudén M., Södergren J., Hultberg M. (2021). Use of faba bean (*Vicia faba* L.) hulls as substrate for Pleurotus ostreatus – potential for combined mushroom and feed production. *Journal of Cleaner Production, 313*, 127969.

147. Jansman A.J., Verstegen M.W., Huisman J., van den Berg J.W. (1995). Effects of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low or high content of condensed tannins on the apparent ileal and fecal digestibility of nutrients and the excretion of endogenous protein in ileal digesta and feces of pigs. *Journal of Animal Science, 73*, 118–127.

148. Jayanegara A., Goel G., Makkar H.P., Becker K. (2015). Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology, 209*, 60–68.

149. Jayet P.A., Isbasoiu A., de Cara S. (2020). Slaughter cattle to secure food calories and reduce agricultural greenhouse gas emissions? Some prospective estimates for France. *Review of Agricultural, Food and Environmental Studies, 101*, 67-90.

150. Jones B.A., Muck R.E., Hatfield R.D. (1995). Red clover extracts inhibit legume proteolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 67*, 329-333.

151. Jones R. (2000). Understanding the processes of protein degradation in forage crops provide opportunities for improved sillage quality and enhahanced animal

production. Proceedings of the Alltech's Sixteenth Annual Symposium, Lyons T.P. and Jacques K.A. (red.). Nottingham University Press, 423-437.

152. Kaiser E., Polip I.V., Weiz K. (2002). The role of nitrate content in herbage to fermentability. XIIIth International Silage Conference, Auchincruive, Scotland, 412-413.

153. Kang J., Tang S., Zhong R., Tan Z., Wu D. (2021). Alfalfa silage treated with sucrose has an improved feed quality and more beneficial bacterial communities. *Frontiers in Microbiology, 12*, 670165.

154. Karimi E., Oskoueian E., Oskoueian A., Omidvar V., Hendra R., Nazeran H. (2013). Insight into the functional and medicinal properties of *Medicago sativa* (alfalfa) leaves extract. *Journal of Medicinal Plants Research, 7* (7), 209-297.

155. Ke W.C., Yang F.Y., Undersander D.J., Guo X.S. (2015). Fermentation characteristics, aerobic stability, proteolysis and lipid composition of alfalfa silage ensiled with apple or grape pomace. *Animal Feed Science and Technology, 202*, 12-19.

156. Ke W.C., Ding W.R., Xu D.M., Ding L.M., Zhang P., Li F.D., Guo X.S. (2017). Effects of addition of malic or citric acids on fermentation quality and chemical characteristics of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science, 100* (11), 8958-8966.

157. Ke W., Ding W., Xu D., Shah M.N., Zhang P., Guo X. (2018). Influences of addition of malic acid or citric acid, *Lactobacillus plantarum* and their mixtures on fermentation quality, proteolysis and fatty acid composition of ensiled alfalfa. *Archives of Animal Nutrition, 72* (6), 492-502.

158. Ke W., Zhang H., Li S., Xue Y., Wang Y., Dong W., Cai Y., Zhang G. (2022). Influence of condensed and hydrolysable tannins on the bacterial community, protein degradation, and fermentation quality of alfalfa silage. *Animals, 12* (7), 831.

159. KEGG. (2023). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. https://www.genome.jp/kegg/ (data dostępu: 12.08.2023 r.).

160. Keshri J., Chen Y., Pinto R., Kroupitski Y., Weinberg Z.G., Sela S. (2018). Microbiome dynamics during ensiling of corn with and without plantarum inoculant. *Applied Microbiology Biotechnology, 102*, 4025-4037.

161. Khan T.S., Mubeen U. (2012). Wheat Straw: A pragmatic overview. *Current Research Journal of Biological Sciences, 4* (6), 673-675.

162. Khanal A.R., Mishra A.K. (2017). Enhancing food security: Food crop portfolio choice in response to climatic risk in India. *Global Food Security, 12*, 22-30.

163. Kleinschmit D.H., Kung L.Jr. (2006). A meta-analysis of the effects of Lactobacillus buchneri on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages. *Journal of Dairy Science, 89*, 4005-4013.

164. Knapp J.R., Laur G.L., Vadas P.A., Weiss W.P., Tricarico J.M. (2014). Invited review: enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science, 97* (6), 3231-3261.

165. König W., Lamminen M., Weiss K., Tuomivirta T.T., Sanz Muñoz S., Fritze H., Elo K., Puhakka L., Vanhatalo A., Jaakkola S. (2017). The effect of additives on the quality of white lupin–wheat silage assessed by fermentation pattern and qPCR quantification of clostridia. *Grass and Forage Science, 72*, 757-771.

166. Kostulak–Zielińska M., Potkański A. (2001). Quality of baled grass-clover silages ensiled with chemical additives. Chemical composition. *Annals of Animal Science, 1* (1), 153-165.

167. Kowalski Z.M., Strzetelski J.A., Niwińska B., Nowak W., Pająk J., Szyszkowska A. (2008). Standardowe metody oznaczania rozkładu białka pasz w przewodzie pokarmowym zwierząt przeżuwających. *Wiadomości Zootechniczne, 46* (4), 53-58.

168. Kraut-Cohen J., Tripathi V., Chen Y., Gatica J., Volchinski V., Sela S., Weinberg Z., Cytryn E. (2016). Temporal and spatial assessment of microbial communities in commercial silages from bunker silos. *Applied Microbiology and Biotechnology, 100*, 6827-6835.

169. Krawielitzki K., Schmidt T., Voight J., Kowalczyk J., Gabel M. (2006). Dynamics of microbial contamination of protein during ruminal in situ incubation of feedstuffs. *Journal of Animal and Feed Sciences, 15*, 313-328.

170. Krenz L.M.M., Grebenteuch S., Zocher K., Rohn S., Pleissner D. (2023). Valorization of faba bean (*Vicia faba*) by-products. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-18.

171. Krzywiecki S., Preś J., Bodarski R. (2008). Znaczenie mikrobiologicznych i fizykochemicznych procesów w praktyce kiszenia pasz w świetle badań niemieckich. *Pamiętnik Puławski, 147*, 139-150.

172. Kulkarni K.P., Tayade R., Asekova S., Song J.T., Shannon J.G., Lee J.D. (2018). Harnessing the potential of forage legumes, alfalfa, soybean, and cowpea for sustainable agriculture and global food security. *Frontiers in Plant Science, Plant Breeding, 9*, 1314.

173. Kume S., Toharmat T., Nonaka K., Oshita T., Nakui T., Ternouth J.H. (2001). Relationships between crude protein and mineral concentrations in alfalfa and value of alfalfa silage as a mineral source for periparturient cows. *Animal Feed Science and Technology*, *93* (3-4), 157-168.

174. Kung L.Jr., Sheperd A.C., Smagala A.M., Endres K.M., Bessett C.A., Ranjit N.K., Glancey J.L. (1998). The effect of pre-servatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, *81*, 1322-1330.

175. Kung L.Jr., Robinson J.R., Ranjit N.K., Chen J.H., Golt C.M., Pesek J.D. (2000). Microbial populations, fermentation endproducts, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. *Journal of Dairy Science, 83*, 1479-1486.

176. Kung L.Jr., Shaver R.D. (2001). Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on Forage*, *3*, 13.

177. Kung L.Jr., Stockes M.R., Lin C.J. (2003a). Silage Additives. In: Buxton D.R., Muck R.E., Harrison J.H. (red.) Agronomy Series, 42, Silage Science and Technology, Madison, Wisconsin, USA, 305-360.

178. Kung L.Jr., Taylor C.C., Lynch M.P., Neylon J.M. (2003b). The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *86* (1), 336-343.

179. Kung L.Jr., Muck R.E. (2006). Preservation of protein during harvest and storage. *Journal of Dairy Science*, *89*, 449.

180. Kung, L.Jr., Bedrosian M.D. (2010). How well do we really understand silage fermentation? W: Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Cornell University, Ithaca, NY, 87-93.

181. Kung L.Jr., Shaver R.D., Grant R.J., Schmidt R.J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silage. *Journal of Dairy Science*, *101*, 4020-4033.

182. Kyntäjä S., Partanen K., Siljander-Rasi H., Jalava T. (2014). Tables of composition and nutritional values of organically produced feed materials for pigs and poultry. *MTT Report*, 164.

183. Larsen S.U., Hjort-Gregersen K., Heidarzadeh-Vazifehkhoran A., Triolo J.M. (2017). Co-ensiling of straw with sugar beet leaves increases the methane yield from straw. *Bioresource Technology*, *245*, 106-115.

184. Lazarević Đ., Stevović V., Lugić Z., Tomić D., Marković J., Zornić V., Prijović M. (2023). Quality of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and red clover (*Trifolium pratense* L.) mixture silages depending on the share in the mixture and additives. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *51* (1), 12954-12954.

185. Lee M.R.F., Winters A.L., Scollan N.D., Dewhurst R.J., Theodorou M.K., Minchin F.R. (2004). Plant-mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84* (13), 1639-1645.

186. Lee M.R.F., Colmenero J.J.O., Winters A.L., Scollan N.D., Minchin F.R. (2006). Polyphenol oxidase activity in grass and its effect on plant-mediated lipolysis and proteolysis of *Dactylis glomerata* (cocksfoot) in a simulated rumen environment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86* (10), 1503-1511.

187. Lee M.R.F., Scott M.B., Tweed J.K.S., Minchin F.R., Davies D.R. (2008). Effects of polyphenol oxidase on lipolysis and proteolysis of red clover silage with and without a silage inoculant (*Lactobacillus plantarum* L54). *Animal Feed Science and Technology*, *144* (1-2), 125-136.

188. Li P., Ji S., Hou Ch., Tang H., Wang Q., Shen Y. (2016). Effects of chemical additives on the fermentation quality and N distribution of alfalfa silage in south of China. *Animal Science Journal*, *87* (12), 1472-1479.

189. Li X., Tian J., Zhang Q., Jiang Y., Wu Z., Yu Z. (2018a). Effects of mixing red clover with alfalfa at different ratios on dynamics of proteolysis and protease activities during ensiling. *Journal of Dairy Science*, *101* (10), 8954-8964.

190. Li J., Guo X., Zhang M., Wang X., Zhao Y., Yin Z., Zhang Z., Wang Y., Xiong H., Zhang H., Todorovska E., Li Z. (2018b). OsERF71 confers drought tolerance via modulating ABA signaling and proline biosynthesis. *Plant Science, 270,* 131–139.

191. Li D., Wang Y., Zhang Y., Lin Y., Yang F. (2018c). Evaluation of lactic acid bacteria isolated from alfalfa for silage fermentation. *Japanese Society of Grassland Science, 64* (3), 190-198.

192. Li R., Zheng M., Jiang D., Tian P., Zheng M., Xu Ch. (2021). Replacing alfalfa with paper mulberry in total mixed ration silages: Effects on ensiling characteristics, protein degradation, and *in vitro* digestibility. *Animals*, *11* (5), 1273.

193. Li Y., Du S., Sun L., Cheng Q., Hao J., Lu Q., Ge G., Wang Z., Jia Y. (2022). Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on dynamic fermentation quality and microbial community of native grass silage. *Frontiers in Microbiology, 13*, 830121.

194. Licitra G., Hernandez T.M., Van Soest P.J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology, 57* (4), 347-358.

195. Lin C., Bolsen K.K., Brent B.E., Hart R.A., Dickerson J.T., Feyerherm A.M., Aimutis W.R. (1992). Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *Journal of Dairy Science, 75* (9), 2484-2493.

196. Lin L.C., Kuo Y.C., Chou C.J. (2002). Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis. Journal of Natural Products, 65* (4), 505-508.

197. Lin J., Li G., Sun L., Wang S., Meng X., Sun L., Yuan L., Xu L. (2023). Varieties and ensiling: Impact on chemical composition, fermentation quality and bacterial community of alfalfa. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1091491.

198. Lind, H., Jonsson, H. and Schnürer, J. (2005). Antifungal effect of dairy propionibacteriacontribution of organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, *98* (2), 157-165.

199. Liu Y., Maruyama H., Matsusaka S. (2010). Agglomeration process of dry ice particles produced by expanding liquid carbon dioxide, *Advanced Powder Technology*, *21*, 652-657.

200. Liu H., Vaddella V., Zhou D. (2011). Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *Journal of Dairy Science, 94* (12), 6069-6077.

201. Liu Q., Wang C., Li H.Q., Guo G., Huo W.J., Pei C.X., Zhang S.L., Wang H. (2017). Effects of dietary protein levels and rumen-protected pantothenate on ruminal fermentation, microbial enzyme activity and bacteria population in Blonde d'Aquitaine x Simmental beef steers. *Animal Feed Science and Technology, 232*, 31-39.

202. Loaiza P.A., Balocchi O., Bertrand A. (2016). Carbohydrate and crude protein fractions in perennial ryegrass as affected by defoliation frequency and nitrogen application rate. *Grass and Forage Science, 72*, 556-567.

203. Lorenz M.M., Eriksson T., Udén P. (2010). Effect of wilting, silage additive, PEG treatment and tannin content on the distribution of N between different fractions after

ensiling of three different sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties. *Grass and Forage Science*, *65*, 175-184.

204. Lund M.N., Ray C.A. (2017). Control of Maillard reactions in foods: strategies and chemical mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65* (23), 4537-4552.

205. Luo R., Zhang Y., Wang F., Liu K., Huang G., Zheng N., Wang J. (2021). Effects of sugar cane molasses addition on the fermentation quality, microbial community, and tastes of alfalfa silage. *Animals*, *11*, 355.

206. Lüscher A., Mueller-Harvey I., Soussana J.F., Rees R.M., Peyraud J.L. (2014). Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science, 69* (2), 206-228.

207. Lynch J.P., Baah J., Beauchemin K.A. (2015). Conservation, fiber digestibility, and nutritive value of corn harvested at 2 cutting heights and ensiled with fibrolytic enzymes, either alone or with a ferulic acid esterase-producing inoculant. *Journal of Dairy Science, 98* (2), 1214-1224.

208. Lynch J.P., Jin L., Lara E.C., Baah J., Beauchemin K.A. (2014). The effect of exogenous fibrolytic enzymes and a ferulic acid esterase-producing inoculant on the fibre degradability, chemical composition and conservation characteristics of alfalfa silage. *Animal Feed Science and Technology*, *193*, 21-31.

209. Makkar H.P.S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research, 49*, 241-256.

210. Makoni N.F., Broderick G.A., Muck R.E. (1997). Effect of modified atmospheres on proteolysis and fermentation of ensiled alfalfa. *Journal of Dairy Science, 80*, 912-920.

211. Marković J., Petrović M., Terzić D., Vasić T., Kostić I., Štrbanović R., Grubić G. (2022). Protein fractions as influenced by cultivars, stage of maturity and cutting dates in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Legume Research - An International Journal, 45* (1), 46-51.

212. Marley C.L., Fychan R., Fraser M.D., Winters A., Jones R. (2003). Effect of sowing ratio and stage of maturity at harvest on yield, persistency and chemical composition of fresh and ensiled red clover/lucerne bi-crops. *Grass and Forage Science, 58* (4), 397-406.

213. Marley C.L., Fychan R., Jones R. (2006). Yield, persistency and chemical composition of Lotus species and varieties (birdsfoot trefoil and greater birdsfoot trefoil) when harvested for silage in the UK. *Grass and Forage Science*, *61* (2), 134-145.

214. Martin K.J., Rygiewicz P.T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, *18*, 28.

215. Martineau R., Lapierre H., Ouellet D.R., Pellerin D., Berthiaume R. (2007). Effects of the method of conservation of timothy on nitrogen metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science, 90* (6), 2870-2882.

216. Mazzoldi A., Hill T., Colls J. (2008). CO_2 transportation for carbon capture and storage: Sublimation of carbon dioxide from a dry ice bank. *International Journal of Greenhouse Gas Control, 2*, 210-218.

217. McAllister T.A., Duniere L., Drouin P., Xu S., Wang Y., `Munns K., Zaheer R. (2018). Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *Journal of Dairy Science, 101*, 4060-4074.

218. McCord P., Gordon V., Saha G., Hellinga J., Vandemark G., Larsen R., Smith M., Miller D. (2014). Detection of QTL for forage yield, lodging resistance and spring vigor traits in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, *200*, 269-279.

219. McDonald P., Henderson A.R. (1962). Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *13* (7), 395-400.

220. McDonald P., Henderson A.R., Heron S.J.E. (1991). The Biochemistry of Silage. 2nd edition, Chalcombe Publications, Marlow Bucks, UK.

221. McEniry J., O'Kiely P., Clipson N.J.W., Forristal P.D., Doyle E.M. (2008). The microbiological and chemical composition of silage over the course of fermentation in round bales relative to that of silage made from unchopped and precision-chopped herbage in laboratory silos. *Grass and Forage Science*, *63*, 407-420.

222. McGarvey J.A., Franco R.B., Palumbo J.D., Hnasko R., Stanker L., Mitloehner, F.M. (2013). Bacterial population dynamics during the ensiling of *Medicago sativa* (alfalfa) and subsequent exposure to air. *Journal of Applied Microbiology, 114*, 1661-1670.

223. McMahon L.R., McAllister T.A., Berg B.P., Majak W., Acharya S.N., Popp J.D., Coulman B.E., Wang Y., Cheng K.J. (2000). A review of the effects of forage

condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, *80*, 469-485.

224. McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M., Krause D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology, 91*, 83-93.

225. Mentler L. (1962). Role of pulping and of dry ice in making lucerne silage. *Allattenyesztes*, *11*, 307-315.

226. Michalski J.P., Borsuk M., Nogalski Z., Baranowska M., Krawczyńska A., Purwin C. (2020). Ruminal degradability of Virginia fanpetals (*Sida hermaphrodita*) herbage and silage depending on the harvest time. *Journal of Animal and Feed Sciences, 29* (4), 316-322.

227. Milczarek A., Osek M. (2016). Partial replacement of soya bean with low-tannin faba bean varieties (Albus or Amulet): effects on growth traits, slaughtering parameters and meat quality of Pulawska pigs. *Annanls of Animal Science, 16* (2), 477-487.

228. Mills J.A., Kung J.L. (2002). The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid-based additive on the fermentation of barley silage. *Journal of Dairy Science, 85* (8), 1969-1975.

229. Min B.R., Barry T.N., Attwood G.T., McNabb W.C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutritional and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, *106*, 3-19.

230. Minakowski D., Skórko-Sajko H., Falkowska A. (1996). Nutritive value of faba bean hulls for ruminants. *Journal of Animal and Feed Science*, *5*, 225–233.

231. Moorby J.M., Fraser M.D. (2021). Review: New feeds and new feeding systems in intensive and semi-intensive forage-fed ruminant livestock systems. *Animal*, *15* (1), 100297.

232. Mora I., Cabrefiga J., Montesinos E. (2011). Antimicrobial peptide genes in Bacillus strains from plant environments. *International Microbiology*, *14*, 213-223.

233. Morin Ch., Bélanger G., Tremblay G.F., Bertrand A., Castonguay Y., Drapeau R., Michaud R., Berthiaume R., Allard G. (2011). Diurnal variations of nonstructural carbohydrates and nutritive value in alfalfa. *Crop Science*, *51* (3), 1297-1306.

234. Mottet A., de Haan C., Falcucci A., Tempio G., Opio C., Gerber P. (2017). Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security*, *14*, 1-8.

235. Mould F.L., Morgan R., Kliem K.E., Krystallidou E. (2005). A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. *Animal Feed Science and Technology*, *123-124* (1), 155-172.

236. Mu L., Xie Z., Hu L., Chen G., Zhang Z. (2021). *Lactobacillus plantarum* and molasses alter dynamic chemical composition, microbial community and aerobic stability of mixed (amaranth and rice straw) silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101* (12), 5225-5235.

237. Muck R.E., Kung L.Jr. (1997). Effect of silage additives on ensiling. W: Procceding Silage Field to Feedbunk North America Conference, Hershey, PA. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY, 187-210.

238. Muck R.E., Moser L.E., Pitt R.E. (2003). Postharvest factors affecting ensiling. Buxton D.R., Muck R.E., Harrison J.H. (red.), Silage Science and Technology, American Sciety of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI, *42*, 251-304.

239. Muck R.E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *Forage Crops Revista Brasileira de Zootecnia*, *39*, 183-191.

240. Muck R.E., Nadeau E.M.G., McAllister T.A., Contreras-Govea F.E., Santos M.C., Kung L.Jr. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, *101* (5), 3980-4000.

241. Mueller-Harvey I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86* (13), 2010-2037.

242. Mustafa A.F., Christensen D.A., McKinnon J.J. (2000). Effects of pea, barley, and alfalfa silage on ruminal nutrient degradability and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *83* (12), 2859-2865.

243. Nadeau E., Hallin O., Auerbach H., Jakobsson J., Arnesson A. 2013. Quality of baled grass-clover silage as affected by additives and harvest methods. W: Michalk D.L., Millar G.D., Badgery W.B., Broadfoot K.M. (red.). Proceedings of 22nd International Grassland Congress, Sydney, NSW, Australia, New South Wales Department of Primary Industry, NSW, Australia, 744-745.

244. Nadeau E.M.G., Buxton D.R., Lindgren E., Lingvall P. (1996). Kinetics of cell-wall digestion of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase and formic acid 1,2. *Journal of Dairy Science*, *79* (12), 2207-2216.

245. Nadeau E.M.G., Russell J.R., Buxton D.R. (2000). Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase, inoculant, and formic acid fed to lambs. *Journal of Animal Science*, *78* (11), 2980-2989.

246. Nadeau E., Richardt W., Murphy M., Auerbach H. (2012). Protein quality dynamics during wilting and preservation of grass-legume forage. W: Proceedings of the XVIth International Silage Conference, Hämeenlinna, Finland, 2-4 lipiec, 56-57.

247. Naydenova Y., Kyuchukova A., Pavlov D. (2013). Plant cell walls fiber component analysis and digestibility of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) in the vegetation. *Agricultural Science and Technology*, *5* (2), 164-167.

248. Neacsu M., McBey D., Johnstone A.M. (2017). Meat reduction and plant-based food: replacement of meat: nutritional, health, and social aspects. *Sustainable Protein Sources*, 359-375.

249. Nešić Z., Tomić Z., Žujović M., Krnjaja V. (2005). Production characteristics of domestic alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars in agroecological conditions of Srem district. *Biotechnology in Animal Husbandry*, *21* (5-6), 169-173.

250. Neugart S., Baldermann S., Hanschen F.S., Klopsch R., Wiesner-Reinhold M., Schreiner M. (2018). The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia Horticulturae*, *233*, 460-478.

251. Ni K., Wang Y., Pang H., Cai Y. (2014). Effect of cellulase and lactic acid bacteria on fermentation quality and chemical composition of wheat straw silage. *American Journal of Plant Sciences*, *5* (13), 46748.

252. Ni K., Wang F., Zhu B., Yang J., Zhou G., Pan Y., Tao Y., Zhong J. (2017). Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. *Bioresource Technology*, *238*, 706-715.

253. Ni K., Zhao J., Zhu B., Su R., Pan Y., Ma J., Zhou G., Tao Y., Liu X., Zhong J. (2018). Assessing the fermentation quality and microbial community of the mixed silage of forage soybean with crop corn or sorghum. *Bioresource Technology*, *265*, 563-567.

254. Ni K., Wang X., Lu Y., Guo L., Li X., Yang F. (2020). Exploring the silage quality of alfalfa ensiled with the residues of astragalus and hawthorn. *Bioresource Technology*, *297*, 122249.

255. Nirola R., Megharaj M., Beecham S., Aryal R., Thavamani P., Vankateswarlu K., Saint Ch. (2016). Remediation of metalliferous mines, revegetation challenges and

emerging prospects in semi-arid and arid conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 20131–20150.

256. Nishino N., Uchida S. (2000). Disappearance of Maillard reaction products during ensilage and rumen fermentation *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81* (2), 275-280.

257. Nishino N., Hattori H. (2007). Resistance to aerobic deterioration of total mixed ration silage inoculated with and without homofermentative or heterofermentative lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *87* (13), 2420-2426.

258. Nowak J., Šařec P. (2001).Wybrane czynniki decydujące o jakości kiszonek w belach cylindrycznych. *Postępy Nauk Rolniczych, 5,* 95-110.

259. Nussbaum H. (1996). Maize silage with dry ice - Feed and fermentation quality will not improve by carbon dioxide. Landwirtschaftliches Wochenblatt. Organ des Landesbauernverbandes in Baden - Wuerttemberg. *Ausg. WWL, 163* (35), 14-15.

260. Ogiy, S., Y. Chen, R. Pasvolsky, Z. G. Weinberg, Moshe M. (2015). High resolution melt analysis to confirm the establishment of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* from silage inoculants during ensiling of wheat. *Grassland Science, 62,* 29-36.

261. Ogunade I.M., Martines-Tuppia C., Queiroz O.C.M., Jiang Y., Drouin P., Wu F., Vyas D., Adesogan A.T. (2018a). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, *101* (5), 4034-4059.

262. Ogunade I.M., Jiang Y., Pech Cervantes A.A., Kim D.H., Oliveira A.S., Vyas D., Weinberg Z.G., Jeong K.C., Adesogan A.T. (2018b). Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing: Effects of *Escherichia coli* O157:H7 and silage additives. *Journal of Dairy Science*, *101* (3), 2048-2059.

263. Ohshima M., McDonald P. (1978). A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 29,* 497-505.

264. Owens V.N., Albrecht K.A., Muck R.E., Duke S.H. (1999). Protein degradation and fermentation characteristics of red clover and alfalfa silage harvested with varying levels of total non-structural carbohydrates. *Crop Science, 39* (6), 1873-1880.

265. Özogul F., Toy N., Özogul Y., Hamed I. (2017). Function of cell-free supernatants of *Leuconostoc, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus* strains on histamine

formation by foodborne pathogens in histidine decarboxylase broth. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41* (5), 13208.

266. Pagella J., Mayes R., Pérez-Barbería F., Ørskov E. (2018). The development of an intraruminal nylon bag technique using non-fistulated animals to assess the rumen degradability of dietary plant materials. *Animal*, *12* (1), 54-65.

267. Pahlow G., Muck R.E., Driehuis F., Oude Elferink S.J.W.H., Spoelstra S.F. (2003). Microbiology of Ensiling. W: Silage Science and Technology. Buxton D.R., Muck R.E., Harrison J.H. (red.). American Society of Agronomy, Madison, WI, 42, 31-93.

268. Pang H., Qin G., Tan Z., Li Z., Wang Y.C.Y. (2011). Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, *34*, 235-241.

269. Parks D.H., Beiko R.G. (2010). Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics*, *26* (6), 715-721.

270. Parvin S., Nishino N. (2009). Bacterial community associated with ensilage process of wilted guinea grass. *Journal of Applied Microbiology*, *107*, 2029-2036.

271. Patra A.K., Min B-R., Saxena J. (2012). Dietary tannins on microbial ecology of the gastrointestinal tract in ruminants. W: Dietary phytochemicals and microbes: Springer, Netherlands, 237-262.

272. Patra K., Kamra D.N., Agarwal N. (2006). Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of Buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, *128*, 276-291.

273. Paya H., Taghizadeh A., Lashkari S. (2015). Effects of *Lactobacillus plantarum* and hydrolytic enzymes on fermentation and ruminal degradability of orange pulp silage. *Journal of BioScience and Biotechnology*, *4* (3), 349– 357.

274. Peng K., Jin L., Niu Y.D., Huang Q., McAllister T.A., Yang H.E., Denise H., Xu Z., Acharya S., Wang S. (2018). Condensed tannins affect bacterial and fungal microbiomes and mycotoxin production during ensiling and upon aerobic exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, *84* (5), 02274-17.

275. Petit H.V., Tremblay G.F. (1992). *In situ* degrad-ability of fresh grass and grass conserved under different harvesting methods. *Journal of Dairy Science*, *75*, 774.

276. Popovic S., Grljusic S., Cupic T., Tucak M., Stjepanovic M. (2001). Protein and fiber contents in alfalfa leaves and stems. W: Delgado I., Lloveras J. (red.). Quality

in Lucerne and Medics for Animal Production. CIHEAM Options Méditerranéennes, Série A, Séminaires Méditerranéens, 45, 215-218.

277. Porqueddu C., Maltoni S., McIvor J.G. (2005). Strategies to mitigate seasonality of production in grassland-based systems. W: Grassland: A Global Resource. McGilloway, D.A. (ed.), Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 111-122.

278. Porter M.G., Murray R.S. (2001). The volatility of components of grass silage on oven drying and the inter-relationship between dry-matter content estimated by diferent analytical methods. *Grass and Forage Science, 56* (4), 405-411.

279. Przywitowski M., Mikulski D., Zduńczyk Z., Rogiewicz A., Jankowski J. (2016). The effect of dietary high-tannin and low-tannin faba bean (*Vicia faba* L.) on the growth performance, carcass traits and breast meat characteristics of finisher turkeys. *Animal Feed Science and Technology, 221,* 124-136.

280. Purwin C. (2007). Jakość kiszonek z traw i mieszanek traw z roślinami motylkowatymi produkowanych prasami zwijającymi. Rozprawy i Monografie – Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn, Polska.

281. Purwin C., Pysera B., Żuk-Gołaszewska K., Antoszkiewicz Z., Gołaszewski J., Fijałkowska M., Lipiński K. (2011). Fermentation and proteolysis during the ensilage of wilted and unwilted diploid and tetraploid red clover. *Journal Central European Agriculture, 12* (1), 179-194.

282. Purwin C., Fijałkowska M., Kowalik B., Skórko-Sajko H., Nogalski Z., Pysera B. (2014a). The effect of bale density and the addition of formic acid on the in situ dry matter and crude protein degradation of lucerne, red clover and red fescue silages. *Journal of Animal and Feed Science, 23,* 177-184.

283. Purwin C., Fijałkowska M., Pysera B., Lipiński K., Sienkiewicz S., Piwczyński D., Puzio N. (2014b). Nitrogen fractions and amino acid content in alfalfa and red clover immediately after cutting and after wilting in the field. *Journal of Elementology, 19* (3), 723-734.

284. Purwin C., Fijałkowska M., Lipiński K., Wierzbowska J., Kobzhassarov T.Z., Michalski J. (2015). Changes in amino acid composition during ensiling lucerne and red clover in round bales. *Journal of Elementology, 20* (4), 965-973.

285. Purwin C., Nogalski Z., Starczewski M., Czurgiel S., Fijałkowska M., Momot M., Borsuk M. (2020). Effects of dietary substitution of alfalfa silage with Virginia

fanpetals silage in lactating polish holstein friesian dairy cows. *Animals*, *10* (10), 1746.

286. Queiroz O.C., Arriola K.G., Daniel J.L., Adesogan A.T. (2013). Effects of 8 chemical and bacterial additives on the quality of corn silage. *Journal of Dairy Science*, *96* (9), 5836– 5843.

287. Queiroz O.C.M., Ogunade I.M., Weinberg Z., Adesogan A.T. (2018). Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. *Journal of Dairy Science*, *101* (5), 4132-4142.

288. Radović J., Lugić Z., Ignjatović S., Delić D. (2004). Prinos i kvalitet suve materije genotipova lucerke (*Medicago sativa* L.) različitog porekla. *Acta Agriculturae Serbica*, *17*, 109-114.

289. Rafińska K., Pomastowski P., Wrona O., Górecki R., Buszewski B. (2017). *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochemistry Letters*, *20*, 520-539.

290. Rasmussen J., Søegaard K., Pirhofer-Walzl K., Eriksen J. (2012). N_2-fixation and residual N effect of four legume species and four companion grass species. *European Journal of Agronomy*, *36* (1), 66–74.

291. Repetto J.L., Echarri V., Aguerre M., Cajarville C. (2011). Use of fresh cheese whey as an additive for lucerne silages: effects on chemical composition: conservation quality and ruminal degradation of cell walls. *Animal Feed Science and Technology*, *170*, 160-164.

292. Ripple W.J., Smith P., Haberl H., Montzka S.A., McAlpine C., Boucher D.H. (2014). Ruminants, climate change and climate policy. *Nature Climate Change*, *4*, 2-5.

293. Röös E., Bajželj B., Smith P., Patel M., Little D., Garnett T. (2017). Protein futures for Western Europe: potential land use and climate impacts in 2050. *Regional Environmental Change*, *17*, 367–377.

294. Salawu M.B., Acamovic T., Stewart C.S., Hvelplund T., Weisbjerg M.R. (1999). The use of tannins as silage additives: effects on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein. *Animal Feed Science and Technology*, *82* (3-4), 243-259.

295. Salvagiotti F., Cassman K.G., Specht J.E., Walters D.T., Weiss A., Dobermann A. (2008). Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research*, *108* (1), 1-13.

296. Samac D.A., Jung H.J.G., Lamb J.A.F.S. (2016). Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) as a feedstock for production of ethanol and other bioproducts. *Alcoholic fuels*, *5*, 79-98.

297. Santos M.C., Lock A.L., Mechor G.D., Kung L.Jr. (2015). Effects of spoilage yeast from silage on *in vitro* ruminal fermentation. *Journal of Dairy Science*, *98*, 2603–2610.

298. Schmidt R.J., Hu W., Mills J.A., Kung L.Jr. (2009). The development of lactic acid bacterial and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, *92* (10), 5005-5010.

299. Schmidt R.J., Hall T., Charley R.C. (2017). The pickle of high-acetic acid silages. http://www.progressivedairy.com/topics/feed-nutrition/the-pickle-of-high-acetic-acid-silages (dostęp: 10.08.2023 r.).

300. Schwab C.G., Tylutki T.P., Ordway R.S., Sheaffer C., Stern M.D. (2003). Characterization of Proteins in Feeds. *Journal of Dairy Science*, *86*, 88-103.

301. Schwenninger S.M., Meile L. (2004). A mixed culture of Propionibacterium jensenii and Lactobacillus paracasei subs. paracasei inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, *27*, 229-237.

302. Sewalt V.J.H., Ni W., Jung H.G., Dixon R.A. (1997). Lignin impact on fiber degradation: Increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems reduced in lignin content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 1977-1983.

303. Shao T., Zhang Z.X., Shimojo M., Wang T., Masuda Y. (2005). Comparison of fermentation characteristics of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) during the early stage of ensiling. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *18* (12), 1727-1734.

304. Singh B., Singh J.P., Shevkani K., Singh N., Kaur A. (2017). Bioactive constituents in pulses and their health benefits. *Journal of Food Science and Technology*, *54*, 858-870.

305. Slottner D., Bertilsson J. (2006). Effect of ensiling on protein degradation during ensilage. *Animal Feed Science and Technology*, *127* (1-2), 101-111.

306. Song Y., Liu C., Finegold S.M. (2004). Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Applied and Environmental Microbiology*, *70* (11), 6459–6465.

307. Sousa D.O., Hansen H.H., Hallina O., Nussio L.G., Nadeau E. (2020). A two-year comparison on nutritive value and yield of eight lucerne cultivars and one red clover cultivar. *Grass and Forage Science, 75* (1), 76-85.

308. Stepanova G.V., Volovik M.V. (2021). Dependence of the buffer capacity on the hemical composition of dry matter of alfalfa. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 901, Second All-Russian conference with international participation "Economic and Phytosanitary Rationale for the Introduction of Feed Plants" First session 17-20 lipiec, Second session 22-23 lipiec, in Russia, Moscow Oblast, Bol'shie Vyazemy.

309. Striker G.G., Insausti P., Grimoldi A.A., Ploschuk E.L., Vasellati V. (2005). Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. *Plant and Soil, 276,* 301-311.

310. Sturino J.M. (2018). Literature-based safety assessment of an agriculture- and animal-associated microorganism: Weissella confusa. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, 95,* 142-152.

311. Su R., Ni K., Wang T., Yang X., Zhang J., Liu Y., Shi W., Yan L., Jie Ch., Zhong J. (2019). Effects of ferulic acid esterase-producing *Lactobacillus fermentum* and cellulase additives on the fermentation quality and microbial community of alfalfa silage. *Peer Journal for Life and Environment, Section Microbiology,* 7712.

312. Sullivan M.L., Hatfield R.D. (2006). Polyphenol oxidase and o–diphenols inhibit postharvest proteolysis in red clover and alfalfa. *Crop Science, 46* (2), 662-670.

313. Sullivan M.L., Zeller W.E. (2013). Efficacy of various naturally occurring caffeic acid derivatives in preventing post-harvest protein losses in forages. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 93* (2), 219-226.

314. Śliwiński B.J., Soliva C.R., Machmüller A., Kreuzer M. (2002). Efficacy of plant extracts in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology, 101,* 101-104.

315. Świątkiewicz M., Księżak J., Hanczakowska E. (2018). The effect of feeding native faba bean seeds (*Vicia faba* L.) to sows and supplemented with enzymes to piglets and growing pigs. *Annals of Animal Science, 18* (4), 1007-1027.

316. Tabacco E., Borreani G., Crovetto G.M., Galassi G., Colombo D., Cavallarin L. (2006). Effect of chestnut tannin on fermentation quality, proteolysis, and protein rumen degradability of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science, 89* (12), 4736-4746.

317. Tao L., Zhou H., Guo X.S., Long R.J., Zhu Y. (2011). Contribution of exopeptidase to the formation of nonprotein nitrogen during the ensiling process of alfalfa. *Journal of Dairy Science, 94* (8), 3928-3935.

318. Tao L., Guo X.S., Zhou H., Undersander D.J., Nandety A. (2012). Short communication: Characteristics of proteolytic activities of endo- and exopeptidases in alfalfa herbage and their implications for proteolysis in silage. *Journal of Dairy Science, 95* (8), 4591-4595.

319. Tao L., Zhou H., Zhang N., Si B., Tu Y., Ma T., Diao Q. (2017). Effects of different source additives and wilt conditions on the pH value, aerobic stability, and carbohydrate and protein fractions of alfalfa silage. *Animal Science Journal, 88,* 99-106.

320. Tao Y., Sun Q., Li F., Xu Ch., Cai Y. (20190. Comparative analysis of ensiling characteristics and protein degradation of alfalfa silage prepared with corn or sweet sorghum in semiarid region of Inner Mongolia. *Animal Science Journal, 91,* 13321.

321. Tao X., Chen S., Zhao J., Wang S., Dong Z., Li J., Sun F., Shao T. (2020a). Effects of citric acid residue and lactic acid bacteria on fermentation quality and aerobic stability of alfalfa silage. *Italian Journal of Animal Science, 19* (1), 744-752.

322. Tao X., Wang S., Zhao J., Dong Z., Li J., Liu Q., Sun F., Shao T. (2020b). Effect of ensiling alfalfa with citric acid residue onfermentation quality and aerobic stability. *Animal Feed Science and Technology, 269,* 114622.

323. Tava A., Scotti C., Avato P. (2011). Biosynthesis of saponins in the genus *Medicago. Phytochemistry Reviews, 10,* 459-469.

324. Tavendale M.H., Meagher L.P., Pacheco D., Walker N., Attwood G.T., Sivakumaran S. (2005). Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa,* and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology, 123-124* (1), 403-419.

325. Tedeschi L.O., Muir J.P., Riley D.G., Fox D.G. (2015). The role of ruminant animals in sustainable livestock intensification programs. *International Journal of Sustainable Development and World Ecology, 22* (5), 452-465.

326. Thaysen J. (1996). How to produce quality silage? - Basics in the preparation of fermented feed. DLZ Agrarmagazin: *Die landwirtschaftliche Zeitschrift fuer Management, Produktion, Technik, 46* (4), 26-31.

327. Thers H., Stødkilde L., Jensen SK., Eriksen J. (2021). Linking Protein Quality in Biorefnery Output to Forage Crop Crude Protein Input via the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*, 2471–2482

328. Thomas T.A. (1977). An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *28*, 639-642.

329. Tohno M., Tanizawa Y., Sawada H., Sakamoto M., Ohkuma M., Kobayashi H. (2022). A novel species of lactic acid bacteria, Ligilactobacillus pabuli sp. nov., isolated from alfalfa silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *72* (10), 005587.

330. Tremblay G.F., Belanger G., McRae K.B., Michaud R. (2001). Proteolysis in alfalfa silages made from different cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, *81*, 685-692.

331. Tremblay G.F., Belanger G., McRae K.B., Michaud R. (2002). Leaf and steam dry matter digestibility and ruminal undegraded proteins of alfalfa cultivars. *Canadian Journal of Plant Science*, *82* (2), 383.

332. Trujillo A.I., Marichal M. de J., Carriquiry M. (2010). Comparison of dry matter and neutral detergent fibre degradation of fibrous feedstuffs as determined with in situ and in vitro gravimetric procedures. *Animal Feed Science and Technology*, *161* (1-2), 49-57.

333. Tylutki T.P., Fox D.G., Durbal V.M., Tedeschi L.O., Russell J.B., Van Amburgh M.E., Overton T.R., Chase L.E., Pell A.N. (2008). Cornell Net Carbohydrate and Protein System: A model for precision feeding of dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, *143* (1-4), 174-202.

334. Tyrolová Y., Výborná A. (2008). Effect of the stage of maturity on the leaf percentage of lucerne and the effect of additives on silage characteristics. Czech *Journal of Animal Science*, *53* (8), 330-335.

335. Undersander D., Becker R., Cosgrove D., Cullen E., Doll J., Grau C., Kelling K., Rice M., Schmitt M., Sheaffer C., Shewmaker G., Sulc M. (2004). Alfalfa management guide. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, USA.

336. Van Amburgh M., Chase L., Overton T., Ross D., Recktenwald E., Higgs R., Tylutki T. (2010). Updates to the Cornell Net Carbohydrate and Protein System v 6.1

and implications for ration formulation. Proceedings 2010 Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 72nd Meeting, 19-21 październik, 2010, East Syracuse, New York, 144-159.

337. Van Amburgh M.E., Collao-Saenz E.A., Higgs R.J., Ross D.A., Recktenwald E.B., Raffrenato E., Chase L.E., Overton T.R., Mills J.K., Foskolos A. (2015). The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: Updates to the model and evaluation of version 6.5. *Journal of Dairy Science*, *98* (9), 6361-6380.

338. van der Poel A.F.B., Gravendeel S., Boer H. (1991). Effect of different processing methods on tannin content and in vitro protein digestibility of faba bean (*Vicia faba* L.). *Animal Feed Science and Technology*, *33* (1-2), 49-58.

339. Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Ithaca, NY, USA: Comstock Publishing Associates, Cornell University Press.

340. Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991). Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*, 199.

341. van Vuuren, A.M. (1993). Digestion and nitrogen metabolism of grass fed dairy cows. Ph.D. diss. Landbouwuniversiteit te Wageningen, The Netherlands.

342. Waghorn G.C., Jones W.T., Shelton I.D., McNabb W.C. (1990). Condensed tannins and the nutritive value of herbage. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, *51*, 171-176.

343. Waghorn G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, *147*, 116-139.

344. Wang Y., Barbieri L.R., Berg B.P., McAllister T.A. (2007). Effects of mixing sainfoin with alfalfa on ensiling, ruminal fermentation and total tract digestion of silage. *Animal Feed Science and Technology*, *135*, 296-314.

345. Wang H., Gao J., Kou J., Zhu D., Yu B. (2008). Anti-inflammatory activities of tripernoid saponins from *Polygala japonica*. *Phytomedicine*, *15* (5), 321-326.

346. Wang Y.Y., Hsu P.K., Tsay Y.F. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*, *17* (8), 458-467.

347. Wang Y., McAllister T.A., Acharya S. (2015). Condensed tannins in sainfoin: composition, concentration, and effects on nutritive and feeding value of sainfoin forage. *Crop Science*, *55*, 13–22.

348. Wang M., Yu Z., Wu Z., Hannaway D.B. (2017). Effect of *Lactobacillus plantarum* 'KR107070' and a propionic acid-based preservative on the fermentation characteristics, nutritive value and aerobic stability of alfalfa-corn mixed silage ensiled with four ratios. *Japanese Society of Grassland Science, Grassland Science*, *64*, 51-60.

349. Wang C., He L., Xing Y., Zhou W., Yang F., Chen X., Zhang Q. (2019). Effects of mixing *Neolamarckia cadamba* leaves on fermentation quality, microbial community of high moisture alfalfa and stylo silage. *Microbial Biotechnology*, *12* (5), 869-878.

350. Wang B., Gao R., Wu Z., Yu Z. (2020). Functional analysis of sugars in modulating bacterial communities and metabolomics profiles of *Medicago sativa* silage. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 641.

351. Wang S., Li J., Zhao J., Dong Z., Dong D., Shao T. (2022). Dynamics of the bacterial communities and predicted functional profiles in wilted alfalfa silage. *Journal of Applied Microbiology*, *132* (4), 2613-2624.

352. Watson C.A., Reckling M., Preissel S., Bachinger J., Bergkvist G., Kuhlman T., Lindström K., Nemecek T., Topp C.F.E., Vanhatalo A., Zander P., Murphy-Bokern D., Stoddard F. (2017). Chapter four-grain legume production and use in European agricultural systems. *Advances in Agronomy*, *144*, 235-303.

353. Weinberg Z.G., Ashbel G. (2003). Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*, *13*, 181-188.

354. Weissbach F., Honig H. (1992). Ein neuer Schlüssel zur Beurteilung der Gärfutterqualität von Silagen auf der Basis der chemischen Analyse. Kongressband, 104. VDLUFA−Kongress, 14−19 wrzesień, Göttingen, 489-493.

355. Weissbach F., Auerbach H. (2013). Hay-crop silages and the problem of fermentation quality. *International Dairy Topics*, *12* (2), 11-15.

356. Wheeler T., von Braun J. (2013). Climate Change Impacts on Global Food Security. *Science*, *341* (6145), 508-513.

357. Windle M.C., Kung L.Jr. (2013). The effect of a feed additive on the feeding value of a silage-based TMR exposed to air. *Journal of Dairy Science, 96* (1), 16.

358. Winters A.L., Cockburn J.E., Dhanoa M.S., Merry R.J. (2000). Effects of lactic acid bacteria in inoculants on changes in aminoacid composition during ensilage of sterile and non-sterile ryegrass. *Journal of Applied Microbiology*, *89* (3), 442-451.

359. Winters A.L., Fychan R., Jones R. (2001). Effect of formic acid and a bacterial inoculant on the amino acid composition of grass silage and on animal performance. *Grass and Forage Science, 56* (2), 181-192.

360. Winters A.L., Minchin F.R. (2001). Red clover and the future for pasture legumes as an alternative protein source for ruminants. *IGER Innovations, 5*, 30-33.

361. Witte A., Bobal M., David R., Blattler B., Schoder D. Rossmanith P. (2017). Investigation of the potential of dry ice blasting for cleaning and disinfection in the food production environment. *LWT - Food Science and Technology, 75*, 735-741.

362. Wojciechowski K., Kezwon A., Lewandowska J., Marcinkowski K. (2014). Effect of β-casein on surface activity of Quillaja bark saponin at fluid/fluid interfaces. *Food Hydrocolloids, 23*, 208-216.

363. Woodward S.L., Laboyrie P.J., Jansen E.B.L. (2000). *Lotus corniculatus* and condensed tannins—Effects on milk production by dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Science, 13*, 521-525.

364. Wu M., Wang Y., Wang Y., Wang X., Yu M., Liu G., Tang H. (2021). Study on the diversity of epiphytic bacteria on corn and alfalfa using Illumina MiSeq/NovaSeq high-throughput sequencing system. *Annals of Microbiology*, *71*, 38.

365. Xue Z., Liu N., Wang Y., Yang H., Wei Y., Moriel P., Palmer E., Zhang Y. (2020a). Combining Orchardgrass and Alfalfa: Effects of Forage Ratios on *In Vitro* Rumen Degradation and Fermentation Characteristics of Silage Compared with Hay. *Animals*, *10* (1), 59.

366. Xue Z., Wang Y., Yang H., Li S., Zhang Y. (2020b). Silage Fermentation and *In Vitro* Degradation Characteristics of Orchardgrass and Alfalfa Intercrop Mixtures as Influenced by Forage Ratios and Nitrogen Fertilizing Levels. *Animals, 12* (3), 871.

367. Yan Z., Zheng X., Chen J., Han J. (2013). Effect of different bacillus strains on the profile of organic acids in a liquid culture of Daqu. *Journal of the Institute of Brewing, 119*, 78-83.

368. Yang J., Cao Y., Cai Y., Terada F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science, 93*, 3136-3145.

369. Yang L., Yuan X., Li J., Dong Z., Shao T. (2019). Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant. *Bioresource Technology, 275*, 280-287.

370. Yang F., Wang Y., Zhao S., Wang Y. (2020). *Lactobacillus plantarum* inoculation delay spoilage of high moisture alfalfa silages by redulating bacterial community composition. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1989.

371. Yang F., Wang Y., Zhao S., Feng C., Fan X. (2022). Dynamics of the Fermentation Products, Residual Non-structural Carbohydrates, and Bacterial Communities of Wilted and Non-wilted Alfalfa Silage With and Without *Lactobacillus plantarum* Inoculation. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 824229.

372. Yari M., Valizadeh R., Naserian A.A., Ghorbani G.R., Rezvani Moghaddam P., Jonker A., Yu P. (2012). Botanical traits, protein and carbohydratefractions, ruminal degradability and energy contents of alfalfa hay harvestedat three stages of maturity and in the afternoon and morning. *Animal Feed Science and Technology*, *172*, 162-170.

373. Yin X., Wu J., Tian J., Wang X., Zhang J. (2021). Dried soybean curd residue: A promising absorbent for cleaner production of high-quality silage. *Journal of Cleaner Production*, *324*, 129300.

374. You L., Bao W., Yao C., Zhao F., Jin H., Huang W., Li B., Kwok L-Y., Liu W. (2022). Changes in chemical composition, structural and functional microbiome during alfalfa (*Medicago sativa*) ensilage with *Lactobacillus plantarum* PS-8. *Animal Nutrition*, *9*, 100-109.

375. Yuan H.J., Wen A., Desta S.T., Dong Z.H., Shao T. (2016). Effects of four short-chain fatty acids or salts onthe dynamics of nitrogen transformations andintrinsic protease activity of alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97* (9), 2759-2766.

376. Yuan L., Loqué D., Kojima S., Rauch S., Ishiyama K., Inoue E., Takahashi H., von Wirén N. (2007). The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *The Plant Cell*, *19* (8), 2636-2652.

377. Yuan X., Yu C., Shimojo M., Shao T. (2012). Improvement of fermentation and nutritive quality of straw-grass silage by inclusion of wet hulless-barley distillers' grains in Tibet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *25* (4), 479-485.

378. Yuan X., Wen A., Dong Z., Desta S.T., Shao T. (2017). Effects of formic acid and potassium diformate on the fermentation quality, chemical composition and aerobic stability of alfalfa silage. *Grass and Forage Science*, *72* (4), 833-839.

379. Yuan X.J., Li J.F., Dong Z.H., Shao T. (2020). The reconstitution mechanism of napier grass microiota during the ensiling of alfalfa and their contributions to fermentation quality of silage. *Bioresource Technology*, *297*, 122391.

380. Zhang T., Li L., Wang X.F., Zeng Z.H., Hu Y.G., Cui Z.J. (2009). Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*, 965-971.

381. Zhang Y., Xin H., Hua J. (2010). Effects of treating whole-plant or chopped rice straw silage with different levels of lactic acid bacteria on silage fermentation and nutritive value for lactating Holsteins. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *23* (12), 1601-1607.

382. Zhang H.J. (2011). The dynamic changes of microbial flora in forage silage and identification and screening of lactic acid bacteria species isolated from forage silage. Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences.

383. Zhang S.J., Chaudhry A.S., Osman A., Shi Ch.Q., Edwards G.R., Dewhurst R.J., Cheng L. (2015a). Associative effects of ensiling mixtures of sweet sorghum andalfalfa on nutritive value, fermentation and methanecharacteristics. *Animal Feed Science and Technology*, *206*, 29-38.

384. Zhang O., Yu Z., Yang H., Na R.S. (2015b). The effects of stage of growth and additives with or without cellulase on fermentation and *in vitro* degradation characteristics of Leymus chinensis silage. *Grass and Forage Science*, *71*, 595-606.

385. Zhang Q., Yu Z., Wang X., Tian J. (2018). Effects of inoculants and environmental temperature on fermentation quality and bacterial diversity of alfalfa silage. *Animal Science Journal*, *89*, 1085–1092.

386. Zhao S.S., Wang Y.P., Yang F.Y., Wang Y., Zhang H. (2020). Screening a *Lactobacillus plantarum* strain for good adaption in alfalfa ensiling and demonstrating its improvement of alfalfa silage quality. *Journal of Applied Microbiology*, *129* (2), 233-242.

387. Zhao S., Yang F., Wang Y., Fan X., Feng C., Wang Y. (2021). Dynamics of fermentation parameters and bacterial community in high-moisture alfalfa silage with or without lactic acid bacteria. *Microorganisms*, *9*, 1225.

388. Zheng M.L., Niu D.Z., Jiang D., Zuo S.S., Xu C.C. (2017). Dynamics of microbial community during ensiling direct-cut alfalfa with and without LAB inoculant and sugar. *Journal of Applied Microbiology*, *122*, 1456-1470.

389. Zheng M., Niu D., Zuo S., Mao P., Meng L., Xu Ch. (2018). The effect of cultivar, wilting and storage period on fermentation and the clostridial community of alfalfa silage. *Italian Journal of Animal Science, 17* (2), 336-346.

390. Ziebell A., Gracom K., Katahira R., Chen F., Pu Y., Ragauskas A., Dixon R.A., Davis M. (2010). Increase in 4-Coumaryl Alcohol Units during Lignification in Alfalfa (*Medicago sativa*) Alters the Extractability and Molecular Weight of Lignin. *Plant Biology*, *285* (50), 38961-38968.

391. https://www.xlstat.com/en/solutions/features/anova-analysis-of-variance

392. https://www.xlstat.com/en/solutions/features/linear-regression

393. https://www.xlstat.com/en/solutions/features/linear-regression

11. Spis schematów, tabel i wykresów

Schemat 1. Proporcje różnych białek występujących w zielonce

Schemat 2. Rozdział frakcji białka ogólnego według The Cornell Net Carbohydrate and Protein

Schemat 3. Schemat doświadczenia realizowanego w zadaniu badawczym I

Schemat 4. Schemat doświadczenia realizowanego w zadaniu badawczym II

Schemat 5. Schemat doświadczenia realizowanego w zadaniu badawczym III

Tabela 1. Zakres wykonanych analiz chemicznych

Tabela 2. Skład chemiczny i przydatność do zakiszania zielonki z lucerny i komonicy zwyczajnej

Tabela 3. Skład chemiczny i wybrane parametry fermentacji kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej

Tabela 4. Frakcje białkowe zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej (% białka ogólnego)

Tabela 5. Frakcje białkowe zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej (% białka ogólnego) według CNCPS v 6.5

Tabela 6. Parametry modelu kinetyki rozkładu in vitro suchej masy i białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej

Tabela 7. Liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny i komonicy zwyczajnej (log10 liczby kopii genu·g-1 SM)

Tabela 8. Struktura mikrobiomu bakteryjnego zasiedlającego kiszonki z lucerny i komonicy zwyczajnej przedstawiona jako procentowy udział rodzajów w zbiorowości

Tabela 9. Skład chemiczny i przydatność do zakiszania zielonki z lucerny oraz łuski bobiku

Tabela 10. Skład chemiczny kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Tabela 11. Wybrane parametry fermentacji kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Tabela 12. Frakcje białkowe zielonki i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej

Tabela 13. Frakcje białkowe zielonki i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej według CNCPS v 6.5

Tabela 14. Parametry modelu kinetyki rozkładu suchej masy i białka ogólnego zielonki i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej
Tabela 15. Liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej (log10 liczby kopii genu·g-1 SM)
Tabela 16. Struktura mikrobiomu bakteryjnego zasiedlającego kiszonki z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej przedstawiona jako procentowy udział rodzajów w zbiorowości
Tabela 17. Skład chemiczny i przydatność do zakiszania zielonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia
Tabela 18. Skład chemiczny kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu
Tabela 19. Wybrane parametry fermentacji kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu
Tabela 20. Frakcje białkowe zielonek i kiszonek lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu
Tabela 21. Frakcje białkowe zielonek i kiszonek lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu według CNCPS v 6.5
Tabela 22. Parametry modelu kinetyki rozkładu suchej masy i białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu
Tabela 23. Liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu (log10 liczby kopii genu·g-1 SM)
Tabela 24. Struktura mikrobiomu bakteryjnego zasiedlającego kiszonki z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu przedstawiona jako procentowy udział rodzajów w zbiorowości
Tabela 25. Rozkładalność żwaczowa in vitro suchej masy i białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej
Tabela 26. Rozkładalność żwaczowa in vitro suchej masy i białka ogólnego zielonki i kiszonek z lucerny z różnym udziałem łuski bobiku lub słomy pszennej
Tabela 27. Rozkładalność żwaczowa in vitro suchej masy i białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

Wykres 1. Regresja liniowa analizy kowariancji dla frakcji białkowych kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej
Wykres 2. Rozkładalność żwaczowa in vitro i kinetyka rozkładu suchej masy zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej
Wykres 3. Rozkładalność żwaczowa in vitro i kinetyka rozkładu białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej
Wykres 4. Wykres pudełkowy przedstawiający liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny i komonicy zwyczajnej
Wykres 5. Analiza interakcji dla frakcji białkowych kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej
Wykres 6. Rozkładalność żwaczowa in vitro i kinetyka rozkładu suchej masy zielonki z lucerny i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej
Wykres 7. Rozkładalność żwaczowa in vitro i kinetyka rozkładu białka ogólnego zielonki z lucerny i kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku i słomy pszennej
Wykres 8. Wykres pudełkowy przedstawiający liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej
Wykres 9. Dendrogram AHC zróżnicowania mikrobiomu dla poszczególnych wariantów doświadczalnych kiszonek z lucerny z różnymi udziałami łuski bobiku lub słomy pszennej utworzony na podstawie charakterystyki mikrobiomu; linia odciętych i jednakowy kolor linii wskazuje na brak istotnego zróżnicowania w obrębie grup doświadczalnych
Wykres 10. Regresja liniowa analizy kowariancji dla frakcji białkowych kiszonek lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu
Wykres 11. Rozkładalność żwaczowa in vitro i kinetyka rozkładu suchej masy i białka ogólnego zielonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia
Wykres 12. Rozkładalność żwaczowa in vitro i kinetyka rozkładu suchej masy kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu
Wykres 13. Rozkładalność żwaczowa in vitro i kinetyka rozkładu białka ogólnego kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu
Wykres 14. Wykres pudełkowy prezentujący liczebność wybranych grup mikroorganizmów zasiedlających kiszonki z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia (0 h, 12 h, 24 h) z dodatkiem suchego lodu (0 g, 0,5 g, 1 g, 2 g)

Wykres 15. Dendrogram zróżnicowania AHC dla poszczególnych wariantów doświadczalnych kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia (0 h, 12 h, 24 h) z dodatkiem suchego lodu (0 g, 0,5 g, 1 g, 2 g); linia odciętych i jednakowy kolor linii wskazuje na brak istotnego zróżnicowania w obrębie grup doświadczalnych

12. Załączniki

Tabela 25. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* suchej masy i białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny i komonicy zwyczajnej

Wyszczególnienie	Zielonki		Kiszonki					
	Lucerna	Komonica zwyczajna	G0	G1	G2	G3	G4	G5
Rozkładalność suchej masy, %								
0 h	8,10	17,89	28,80	30,48	31,07	32,87	31,91	31,34
2 h	29,17	32,91	32,92	34,13	35,71	35,60	37,81	37,10
4 h	31,23	33,70	35,64	36,61	37,55	37,90	39,54	38,71
8 h	37,72	40,03	44,93	38,29	40,91	40,63	41,00	43,90
24 h	60,17	65,02	49,88	48,67	52,80	63,32	64,34	65,16
48 h	74,36	83,47	71,55	68,68	71,48	71,49	72,08	73,14
Rozkładalność białka ogólnego, %								
0 h	8,33	10,22	15,43	11,94	15,16	13,59	10,30	13,62
2 h	14,82	12,23	20,82	20,43	21,50	27,27	17,62	18,76
4 h	19,75	15,30	36,53	35,68	34,77	36,06	35,12	26,93
8 h	26,09	22,13	38,00	37,23	35,93	37,68	36,12	33,20
24 h	33,20	29,14	44,63	37,70	36,19	41,17	37,67	35,90
48 h	57,94	33,10	49,35	47,13	46,69	44,52	43,38	36,68

Kiszonki: G0 – lucerna 100%; G1 – lucerna 90%: komonica zwyczajna 10%; G2 – lucerna 80%: komonica zwyczajna 20%; G3 – lucerna 70%: komonica zwyczajna 30%; G4 – lucerna 60%: komonica zwyczajna 40%; G5 – lucerna 50%: komonica zwyczajna 50%.

Tabela 26. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* suchej masy i białka ogólnego zielonki i kiszonek z lucerny z różnym udziałem łuski bobiku lub słomy pszennej

Wyszczególnienie	Zielonka	Kiszonki																
		T0	T1	K1	T2	K2	T3	K3	T4	K4	T5	K5	T6	K6	T7	K7	T8	K8
Rozkładalność suchej masy, %																		
0 h	8,53	31,36	26,87	29,83	30,03	26,01	27,03	29,98	25,99	22,43	23,24	20,58	20,26	21,90	18,74	18,80	17,55	16,63
2 h	29,97	35,39	32,45	32,70	32,98	32,78	29,26	32,33	30,77	29,96	29,21	30,13	26,33	26,40	24,88	22,01	21,42	21,79
4 h	31,82	36,74	34,33	35,37	35,95	34,79	30,76	32,78	32,66	32,01	30,69	31,45	27,58	28,05	26,09	22,90	22,24	25,35
8 h	37,34	44,25	37,44	41,74	42,72	41,30	31,94	34,84	35,45	35,48	35,76	36,98	30,36	33,41	32,96	27,37	27,88	27,77
24 h	61,35	60,05	58,21	62,04	62,62	57,49	46,15	51,56	56,87	46,17	45,59	53,51	49,33	53,89	53,45	48,46	54,35	40,68
48 h	75,41	66,85	68,53	68,29	70,44	62,12	57,95	64,54	64,65	62,49	59,03	63,76	60,02	62,59	61,69	56,42	60,16	56,74
Rozkładalność białka ogólnego, %																		
0 h	10,49	40,04	37,49	42,08	40,49	36,95	38,51	43,49	31,13	31,43	34,40	31,41	29,94	38,93	26,34	34,80	38,10	33,37
2 h	18,50	50,57	51,79	52,30	51,50	53,31	49,67	53,80	47,06	47,66	48,86	50,96	43,79	51,37	38,99	44,40	40,67	52,29
4 h	42,93	54,03	56,35	58,58	61,15	61,90	54,78	57,37	54,45	52,74	51,50	61,48	49,34	55,91	43,40	49,75	47,09	55,37
8 h	48,51	59,53	59,47	66,17	65,47	64,76	58,69	61,30	58,35	59,50	59,88	64,12	52,93	58,35	51,96	52,57	51,64	59,16
24 h	57,86	62,11	65,83	75,40	73,10	67,69	61,98	66,05	61,71	63,66	63,65	69,00	59,85	67,27	59,80	60,82	58,67	63,30
48 h	67,87	70,18	78,18	81,80	80,83	75,51	64,60	70,91	68,59	71,93	68,59	75,17	61,80	72,78	60,35	67,50	59,24	70,81

Kiszonki: T0 – grupa kontrolna, lucerna bez dodatku łuski bobiku lub słomy pszennej; T1 – lucerna z 1,2% łuski bobiku; K1 – lucerna z 1,2% słomy pszennej; T2 – lucerna z 2,4% łuski bobiku; K2 – lucerna z 2,4% słomy pszennej; T3 – lucerna z 3,6% łuski bobiku; K3 – lucerna z 3,6% słomy pszennej; T4 – lucerna z 4,8% łuski bobiku; K4 – lucerna z 4,8% słomy pszennej; T5 – lucerna z 6,0% łuski bobiku; K5 – lucerna z 6,0% słomy pszennej; T6 – lucerna z 12,0% łuski bobiku; K6 – lucerna z 12,0% słomy pszennej; T7 – lucerna z 18,0% łuski bobiku; K7 – lucerna z 18,0% słomy pszennej; T8 – lucerna z 24,0% łuski bobiku; K8 – lucerna z 24,0% słomy pszennej.

Tabela 27. Rozkładalność żwaczowa *in vitro* suchej masy i białka ogólnego zielonek i kiszonek z lucerny o różnym stopniu przewiędnięcia z dodatkiem suchego lodu

Wyszczególnienie	Zielonki			Kiszonki											
stopień przewiędnięcia	0 h	12 h	24 h	0 h				12 h				24 h			
dodatek suchego lodu				0 g	0,5 g	1 g	2 g	0 g	0,5 g	1 g	2 g	0 g	0,5 g	1 g	2 g
Rozkładalność suchej masy, %															
0 h	22,73	21,06	12,02	31,21	40,69	36,02	38,10	26,51	35,47	32,56	30,50	35,15	34,39	30,49	29,01
2 h	39,55	33,87	30,67	37,10	44,67	39,39	41,82	33,56	37,35	36,37	35,34	36,80	35,93	33,19	35,75
4 h	43,02	37,47	33,98	42,43	47,58	42,76	47,32	36,24	39,27	38,49	38,76	39,20	38,72	38,51	38,93
8 h	50,60	41,89	40,26	47,10	54,85	47,89	48,02	40,26	41,51	41,88	40,20	42,73	42,08	45,10	41,70
24 h	68,56	65,53	59,74	55,47	63,63	59,18	57,50	53,25	54,69	57,82	46,60	55,53	55,40	60,33	50,87
48 h	81,19	75,43	72,57	70,07	74,77	69,62	70,21	66,48	65,94	67,79	65,22	66,69	63,90	69,22	67,36
Rozkładalność białka ogólnego, %															
0 h	26,94	21,84	10,53	50,43	63,09	53,50	47,83	49,79	61,84	49,69	44,70	49,79	50,74	38,14	35,64
2 h	48,72	46,66	42,30	57,77	66,54	58,05	57,63	53,45	63,82	51,12	56,47	53,45	54,31	45,81	49,17
4 h	55,24	50,81	45,74	62,76	69,32	59,50	60,69	55,06	65,39	56,16	59,36	55,06	56,44	51,15	51,60
8 h	60,83	56,24	50,62	67,47	70,95	62,37	63,28	58,72	66,61	58,42	60,74	58,72	58,00	56,77	57,60
24 h	75,78	65,26	58,74	71,47	73,99	68,69	63,36	62,53	68,45	64,40	63,03	62,53	62,00	60,86	62,77
48 h	89,22	86,22	80,64	77,02	78,89	75,80	69,61	73,17	75,98	69,28	67,36	73,17	72,86	70,55	68,41

Załącznik nr 2 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 10.11.2023 r.
(miejscowość, data)

prof. dr hab. Cezary Purwin
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko promotora/~~promotora pomocniczego~~*)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
zootechnika i rybactwo
prof. dr hab. Dorota Witkowska
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska Marty Borsuk-Stanulewicz pod tytułem „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny" została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

.....
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Załącznik nr 2 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 10.11.2023 r.
(miejscowość, data)

dr inż. Sebastian Wojciech Przemieniecki
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
~~promotora~~/promotora pomocniczego*)

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny
zootechnika i rybactwo
prof. dr hab. Dorota Witkowska
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
~~promotora~~/promotora pomocniczego* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska Marty Borsuk-Stanulewicz pod tytułem „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny" została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Przemieniecki S.
(podpis promotora pomocniczego)

** niepotrzebne skreślić*

Załącznik nr 3 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 10.11.2023 r.
(miejscowość, data)

Marta Borsuk-Stanulewicz
(imię i nazwisko kandydata)

zootechnika i rybactwo
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
zootechnika i rybactwo
prof. dr hab. Dorota Witkowska
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadoma(-y) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny" została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Borsuk-Stanulewicz Marta
(podpis kandydata)