

Prof. dr hab. Anna Chmielowiec-Korzeniowska
Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 15.02.2024 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani **mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz** pt. „Wpływ dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy na skład frakcji białkowych, mikrobiom kiszzonek oraz rozkładalność żwaczową białka lucerny” wykonanej pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Cezarego Purwina oraz Pana dr inż. Sebastiana Wojciecha Przemienieckiego.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani **mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz** obejmuje 238 stron maszynopisu. Na 37. stronach wyodrębniono spis piśmiennictwa (tu spis literatury) obejmujący obszerną bazę publikacji, tj. 393 pozycje, w większości oryginalnych, anglojęzycznych artykułów naukowych, z czego 55 artykułów opublikowano w ostatnich 4. latach. Praca zawiera 27 tabel, 5 schematów (rycin), 15 wykresów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Na początku rozprawy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w pracy, co ułatwia dalsze korzystanie z tekstu.

Układ rozprawy jest konwencjonalny i nie budzi zastrzeżeń. We wstępie Autorka wprowadza w tematykę związaną z przedmiotem pracy. „Przegląd piśmiennictwa” stanowi interesującą syntezę ważnych problemów związanych ze specyfiką uprawy lucerny siewnej, jej właściwości odżywczych i prozdrowotnych. Doktorantka wskazuje również czynniki utrudniające konserwację lucerny w procesie kiszenia, wskazuje krytyczne punkty zbioru i procesu zakiszania lucerny, w których następują zmiany ilościowe i jakościowe składu chemicznego roślin, głównie straty związków azotowych, tak istotnych w aspekcie żywieniowym. Ważnym elementem przeglądu piśmiennictwa jest omówienie metod ograniczenia przemian proteolitycznych w zakiszaniu roślin, a przede wszystkim produkcji kiszzonek z lucerny. Autorka powołując się na aktualne publikacje naukowe omawia mechanizmy chroniące białko roślinne podczas wędnięcia, czy podsuszania surowca (metody fizyczne), czy też wzbogacania materiału zakiszane go różnymi dodatkami chemicznymi i biologicznymi, które ograniczają hydrolizę białka lub poprawiają warunki procesu fermentacji. W ostatnim podrozdziale przeglądu Doktorantka odwołując się do dostępnych publikacji

zagranicznych i polskich podkreśla zasadność wprowadzenia dodatku do lucerny komonicy zwyczajnej i łuski bobika, surowców bogatych w taniny, czy lodu suchego przyspieszającego proces właściwej fermentacji kiszonki.

W tym kontekście, podjęte przez Panią **mgr inż. Martę Barbarę Borsuk-Stanulewicz** badania, których głównym celem była poprawa jakości kiszonki uzyskanej z lucerny poprzez wprowadzenie dodatków o różnych mechanizmach hamowania proteolizy uważam za zasadne i aktualne, a wybór tematu za trafny i celowy. Wybrane dodatki należy uznać za uzasadnione, gdyż wykazują duży potencjał korzystnego oddziaływania na produkt finalny. Autorka powołując się na dane polskie i zagraniczne dobrze uzasadniła potrzebę ich zastosowania. Tym bardziej, że takich układów podczas zakiszania lucerny nie badano, a w dostępnym piśmiennictwie nie ma doniesień na ten temat.

Należy podkreślić, że zagadnienia poruszane w pracy mieszczą się w dyscyplinie Zootechnika i Rybactwo, a podjęta tematyka badawcza jest ważna zarówno dla badań podstawowych, jak i aplikacyjnych. Przeprowadzone badania mogą przyczynić się do rozwoju nowych metod ograniczających straty białka zachodzących podczas zakiszania wysokobiałkowych pasz.

Autorka dokonując uzasadnienia wyboru problemu badawczego, a następnie przygotowując się do przeprowadzenia badań przyjęła cztery hipotezy badawcze i cztery cele pracy:

Hipotezy badawcze:

1. Współzakiszanie lucerny z komonicy 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 pełniące funkcję absorbentu może zredukować proteolizę białka lucerny, poprawiając przy tym parametry fermentacji kiszonek, a dodatkowo pozwolić na nowy kierunek zagospodarowania produktu ubocznego procesu obłuszczenia nasion bobiku;
3. Dinitlenek 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 pożądaných, 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.

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 przewędnięcia lucerny.

Podjętym w projekcie problem, przyjęte cele, jak również sam charakter aplikacyjny badań zdecydowały o wyborze metodyki badań. Autorka w rozdziale „Materiał i metody badań” przedstawiła ogólne założenia metodyczne realizowanych zadań.

Badania przeprowadzono 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 przewędnięcia surowca (zadanie badawcze III). W każdym zadaniu surowiec, tj. komonicę zwyczajną i łuskę bobika oraz produkt końcowy, tj. kiszonkę poddano analizom chemicznym, w tym oceniono poziom związków azotowych i udział poszczególnych frakcji białkowych, rozkładalność żwaczową uzyskanych kiszonek oraz badania mikrobiologiczne określające mikrobiom sporządzonych kiszonek.

W tym miejscu należy podkreślić kompleksowość wykonanych badań oraz wzajemną komplementarność poszczególnych elementów pracy. Zastosowane metody pomiarowe i analizy są nowoczesne i ogólnie przyjęte w tego typu badaniach naukowych. W pracy wykonano szereg badań z zastosowaniem najnowszej aparatury. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka wykorzystwała w swoich badaniach różnorodne techniki z zakresu analizy biochemicznej, chromatograficznej i zaawansowanej techniki molekularnej, w tym sekwencjonowania w technologii nanoporowej (MinION). Zastosowana analiza metagenomiczna składu mikrobioty na podstawie fragmentów genu 16S pozwoliła Autorce na ocenę złożoności taksonomicznej mikroorganizmów zasiedlających produkt końcowy zakiszania. Szkoda, że analizami tymi nie objęto również samego materiału roślinnego poddawanego zakiszaniu, zwłaszcza, że ilość i jakość mikroflory rozwijającej się w

fermentującej biomasy zależy od mikroflory epifitycznej zasiedlającej części wegetatywne roślin.

Mikroflorę tę, oprócz pozytywnych bakterii kwasu mlekowego inicjujących proces zakiszania, w tym pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*, paciorkowców z rodzaju *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Pediococcus* tworzą też mikroorganizmy niepożądane. Laseczki przetrwalnikujące *Clostridium* sp. i *Bacillus* sp., pałeczki z grupy coli, w tym *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., a także *Listeria* sp., drożdże i grzyby pleśniowe, mogą zakłócić prawidłowy przebieg procesu fermentacji, pogorszyć jakość paszy a także stworzyć poważne zagrożenie epizootyczne i epidemiologiczne.

Podrozdziały „Wyniki badań” i „Dyskusja” stanowią zasadniczą część dysertacji. W rozdziałach tych Doktorantka wykazała się znaczną wiedzą oraz umiejętnością interpretacji i konfrontowania uzyskanych wyników z rezultatami innych autorów.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań Doktorantka sformułowała 8 wniosków, z czego kluczowe, w moim odczuciu są:

- Współzakiszanie lucerny z komonicą zwyczajną w stosunku 50:50 pozwoliło na ograniczenie hydrolizy białka właściwego.
- 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.
- Pośród zastosowanych dwóch źródeł tanin skuteczniejszym i korzystniejszym pod względem paszowym okazała się komonica zwyczajna aniżeli łuska bobiku.
- 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.
- Kiszonki sporządzone z lucerny po 24 h wędnięcia niezależnie od poziomu zastosowanego suchego lodu prezentowały najkorzystniejszy skład frakcji białka ogólnego, najniższe ilości frakcji PA1 i PA2, przy najwyższej zawartości PB1.
- 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 przewędnięcia lucerny.
- Kiszonki z lucerny przewędniętej niezależnie od dawki suchego lodu uzyskały bardziej zróżnicowaną strukturę mikrobiomu bakteryjnego z dominacją bakterii fermentacji mlekowej.

Jednocześnie Doktorantka podkreśliła, że najskuteczniejszymi rozwiązaniami chroniącymi białko lucerny podczas zakiszania były współzakiszanie z 50% udziałem komonicy zwyczajnej lub dodatek suchego lodu do przewędniętej zielonki.

Uwagi o charakterze ogólnym i korektorskim

Moja ocena strony technicznej i redakcyjnej rozprawy Pani **mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz** jest wysoka. Praca została napisana poprawnym językiem, jest czytelna, a zawarta w niej ilość błędów stylistycznych i interpunkcyjnych marginalna.

Podczas czytania pracy nasuwa się jednak kilka uwag, które Doktorantka może wykorzystać podczas przygotowywania pracy do druku. Moje sugestie i zastrzeżenia pogrupowałam chronologicznie według rozdziałów pracy, których dotyczą.

Przegląd piśmiennictwa

Doktorantka w sposób syntetyczny dokonała przeglądu piśmiennictwa, co wskazuje na umiejętność selekcionowania informacji zamieszczonych w literaturze. Pewne wątpliwości budzi cytowanie niektórych artykułów sprzed 2000 roku. Taki dobór zaniża wartość przytaczanych źródeł, stąd część z nich powinna być pominięta i zastąpiona nowszymi publikacjami.

Autorka błędnie, jak się domyślam, przytaczając wyniki zakiszania lucerny wzbogacanej dodatkiem kukurydzy pisze "...Wzrastający udział kukurydzy w zakiszaniu lucerny znacząco poprawiał zakwaszenie masy roślinnej i gwarantował niższą koncentrację azotu amoniakalnego, a wartość odżywcza sporządzonych kiszzonek wykazywała tendencję spadkową..."

Cele pracy

Przeredagowania wymagają cele pracy, zwłaszcza cel 2. i 4. Cele te należy poszerzyć o pożądane właściwości, które w toku przeprowadzonych badań będzie można zweryfikować. W celu badań brakuje założeń, które by dotyczyły analiz mikrobiologicznych. Przecież wyniki z analiz mikrobiomu znalazły się w dwóch postawionych na końcu pracy wnioskach.

W pracy nie przeprowadzono porównania procesu zakiszania lucerny z dodatkiem komonicy zwyczajnej i łuski bobiku. Były to dwa niezależne zadania badawcze, stąd cel 3. powinien być usunięty lub przeredagowany np. wskazanie najlepszych technik zakiszania lucerny, gwarantujących najwyższą wartość pokarmową kiszzonek.

Materiał i metody badań

Doktorantka w poszczególnych podrozdziałach szczegółowo opisuje materiał i metodykę przeprowadzonych oznaczeń. W opisie zadań badawczych Autorka wskazuje częstotliwość pobieranych prób, ale całkowicie pomija liczbę próbek poddawanych analizie. Taka informacja, tj. „liczba n” powinna zostać uzupełniona w tabelach.

W II zadaniu badawczym oceniano wpływ łuski bobiku na przebieg zakiszania. W mojej opinii wprowadzenie siewki słomy pszennej jako grupy kontrolnej pozytywnej nie było konieczne, zwłaszcza, że podczas omawiania wyników tak duża liczba porównywanych grup utrudniała Doktorance dokonanie czytelnej analizy statystycznej.

Ze względu na złożoność badań i mnogość zastosowanych metod, dobrą praktyką jest gdy omawianie metod poprzedzone jest wykazem/listą wykonanych oznaczeń, zgodnie z zasadą „od ogółu do szczegółu”.

W badaniach mikrobiomu kiszonek wskazując jednostkę z oznaczeń należałoby zapisać „Całkowitą liczbę oznaczanych grup mikroorganizmów w badanych próbach wyrażano jako logarytm liczby kopii genów 16S rDNA tj. \log_{10} liczba kopii genu g^{-1} s.m a nie jako liczbę kopii.

Wyniki badań

Wyniki badań powinny być omawiane według schematu ujętego w rozdziale „Materiał i metody badań”.

Na stronie 56. Autorka dokonuje porównania zielonki i kiszonki, co nie było potwierdzone analizami statystycznymi.

Wątpliwości nasuwają również odwołania do wyników zestawionych na wykresie pudełkowym przedstawiającym liczebność mikroorganizmów zasiedlających tj. wykresy 4, 8, 14. Wykazując różnice statystyczne Autorka omawia wyniki zawarte w tabelach 7, 15, 23.

Omawiając strukturę mikrobiomu kiszonki (tab. 24) błędnie wskazano zakres wartości procentowego udziału bakterii z rodzaju *Weissella* (powinno być 31-53%). Bakterie z rodzaju *Enterococcus* tworzyły grupę eudominantów w grupie przesuszanej 12 h a nie 24 h.

Omawiając niski poziom oznaczanego etanolu w kiszonce Autorka uzasadnia niską aktywnością metaboliczną drożdży, jednak należy pamiętać, że również bakterie kwasu mlekowego należące do grupy heterofermentacyjnych również, choć w mniejszej ilości wytwarzają alkohol.

W pracy nie znalazłam omówienia tabel 24-27 dołączonych na końcu pracy.

Na stronie 163 zauważyłam mylne sformułowanie „...Dominujący udział rodzaju *Klebsiella* obok rodziny *Enterobacteriaceae* i rodzaju *Enterococcus* w kiszonce z lucerny...” Rodzaj *Klebsiella* należy do rodziny *Enterobacteriaceae*.

Zdecydowanie Autorka nie powinna używać w rozprawie doktorskiej pojęcia „ładunek bakterii”, czy „obfitość” w stosunku do dużego zróżnicowania identyfikowanych bakterii.

W przypadku bakterii przetrwalnikujących z rodzaju *Clostridium* formy uśpione nazywamy przetrwalnikami lub endosporami, a nie jak Autorka nazywa zarodnikami.

Dyskusja

O ile w „Omówieniu wyników” Doktorantka słusznie omawiała poszczególne zadania badawcze oddzielnie to w dyskusji wskazane wydaje się dokonanie oceny charakterystyki chemicznej, analizy mikrobiomu kiszonki oraz rozkładalności żywcowej paszy z uwzględnieniem wszystkich trzech zadań badawczych. Takie zestawienie, choć trudniejsze pozwoli wskazać różnice w przebiegu procesu zakiszania lucerny z różnym udziałem dodatków.

Podsumowanie i wnioski

Sugeruję ograniczenie liczby postawionych wniosków i ograniczenie się do głównych odpowiadających na postawione cele pracy. W tym miejscu zwracam uwagę, że wniosek nr 5 tj. „Zastosowanie suchego lodu w zakiszaniu lucerny niezależnie od stopnia przewodnictwa zielonki przed zakiszeniem nie wpłynęło na zmianę składu chemicznego, ani przebieg fermentacji, natomiast ograniczyło przemiany proteolityczne” powinien być przereklamowany, gdyż przemiany proteolityczne zachodzące w materiale roślinnym zawsze pociągają za sobą zmiany chemiczne, w tym zawartości białka właściwego, co w kolejnych wnioskach zostało wskazane.

Podsumowując ocenę pracy Pani **mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz** stwierdzam, że Autorka przedstawiła ważny z punktu widzenia nauki oraz praktyki problem. Oceniana praca mimo kilku krytycznych, ale i dyskusyjnych uwag wnosi wiele ciekawych elementów zarówno poznawczych, jak i praktycznych. Doktorantka w pełni zrealizowała postawione cele badawcze. Zebrane piśmiennictwo związane z tematyką pracy zostało poprawnie dobrane i wykorzystane zarówno we wstępie, jak i przy interpretacji uzyskanych wyników badań własnych. Na podkreślenie zasługują staranne i wykonane z dużym nakładem

pracy i osobistego zaangażowania badania, zwłaszcza w zakresie chemicznych parametrów doświadczalnych kiszonek.

Stwierdzam, że oceniana praca wnosi nowe elementy poznawcze oraz spełnia warunki stawiane pracom doktorskim, określonych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.), dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Marty Barbary Borsuk-Stanulewicz do publicznej obrony. Jednocześnie ze względu na staranność, bardzo wysoki poziom pracy i ogromny wysiłek, który Autorka włożyła w jej powstanie składam wniosek o jej wyróżnienie.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Anna Korzeniowska', is written in a cursive style.