

Kraków, dnia 31.01.2022 r.

Prof. dr hab. inż. Piotr Micek
Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Ocena
rozprawy doktorskiej Pani mgr Martyny Kozłowskiej
pt. "Effects of saponins from fresh and ensiled alfalfa (*Medicago sativa* L.)
on enteric methane emission and biohydrogenation in dairy cows"

Niniejszą ocenę wykonano na podstawie pisma Pani prof. dr hab. Agnieszki Wierzbickiej, Dyrektora Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu z dnia 1.12.2021 r. (SRN-0001/1/2022) informującego o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Martyny Kozłowskiej. Recenzja odnosi się do oceny osiągnięć naukowych Kandydatki w zakresie dziedziny nauk rolniczych, dyscypliny zootechnika i rybactwo, w oparciu o ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), w związku z ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018 r. poz. 1669) oraz rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r. poz. 261).

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Martyna Kozłowska wykonała w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu oraz w Katedrze Żywienia Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. inż. Artura Józwika, prof. IGiBZ oraz prof. dr hab. inż. Małgorzaty Szumacher.

W swojej rozprawie Doktorantka zajęła się lucerną, która ze względu na wysoką zawartość białka i przydatność paszową, bardzo chętnie stosowana jest w żywieniu wysoko wydajnych przeżuwaczy. Oprócz wysokiej zawartości składników odżywczych, lucerna jest bogatym źródłem także wtórnych metabolitów roślinnych, których rodzaj oraz ilość w materialne paszowym uzależnione są od odmiany, fazy rozwojowej, miejsca występowania w

roślinie czy wreszcie sposobu konserwacji zielonek. Do najbardziej znanych substancji tego typu występujących w lucernie zalicza się saponiny, uważane za związki antyodżywcze, a nawet szkodliwe dla zwierząt. W niektórych okolicznościach saponiny mogą jednak wykazywać korzystne działanie przeciwzapalne, przeciwwirusowe, antybakteryjne, przeciwgrzybiczne, czy wreszcie modulujące skład mikroorganizmów żwacza. W tym ostatnim przypadku ograniczający wpływ saponin na populację pierwotniaków w żwaczu pośrednio zmniejsza liczbę organizmów metanogennych a przez to może powodować zmniejszenie emisji metanu do środowiska. W żywieniu przeżuwaczy zmniejszenie produkcji metanu w żwaczu przekłada się na zmniejszenie strat składników odżywczych z dawki pokarmowej a to z kolei może ograniczać niedobór energii, np. u krów we wczesnej laktacji.

U krów mlecznych zmiana składu mikroorganizmów zasiedlających żwacz skutkuje zmianą przebiegu procesów trawiennych w tym odcinku przewodu pokarmowego i zmianą składu końcowych produktów fermentacji. W efekcie obserwowano powiązane z tym różnice w prozdrowotnych właściwościach fizyko-chemicznych mleka, zwłaszcza w profilu kwasów tłuszczowych spowodowane różną intensywnością przebiegu procesu biouwodorowania nienasyconych kwasów tłuszczowych. Dlatego uważa się, że przydatność żywieniowa i technologiczna mleka uzależniona jest nie tylko od ilości i wartości pokarmowej skarmianej paszy, ale także od obecności w niej wtórnych metabolitów roślinnych.

Badania podjęte przez mgr Martynę Kozłowską uważam za aktualne i uzasadnione. Wyniki zaplanowanych eksperymentów mogą przyczynić się bowiem zarówno do poszerzenia wiedzy z zakresu możliwości regulowania procesami biouwodorowania w żwaczu, jak również do lepszego poznania procesów metanogenezy zachodzących w żwaczu, w aspekcie zmniejszania strat energii z dawki pokarmowej oraz ograniczania emisji metanu do środowiska. Z naukowego, ale również praktycznego punktu widzenia szczegółowe poznanie wpływu procesu zakiszania zielonki z lucerny na zawartość, skład i aktywność biologiczną saponin wydaje się więc interesujące. Wszystkie te zagadnienia są przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Martyny Kozłowskiej, która zawiera oryginalne rozwiązanie problemu naukowego zdefiniowanego w hipotezach badawczych. Rozprawę przygotowano w formie spójnego tematycznie zbioru 3 prac twórczych opublikowanych w czasopiśmie naukowych zaliczanych do dyscypliny zootechnika i rybactwo. Od strony technicznej rozprawa składa się z kserokopii wspomnianych wyżej publikacji przygotowanych w języku angielskim oraz poprzedzającego je omówienia badań sporządzonego również w języku angielskim. Dodatkowo umieszczono 3 oświadczenia podpisane przez autora korespondencyjnego każdej z prac, który w imieniu współautorów

określa indywidualny (procentowy) wkład Doktorantki w ich powstanie oraz zakres wykonanych przez nią czynności.

Na rozprawę doktorską składają się następujące publikacje:

1. Szumacher-Strabel M., Stochmal A., Cieślak A., **Kozłowska M.**, Kuźnicki D., Kowalczyk M., Oleszek W. **2019**. Structural and quantitative changes of saponins in fresh alfalfa compared to alfalfa silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2243-2250. doi:10.1002/jsfa.9419. 100 pkt MEiN, IF 3,638.
2. **Kozłowska M.**, Cieślak A., Józwick A., El-Sherbiny M., Stochmal A., Oleszek W., Kowalczyk M., Filipiak W., Szumacher-Strabel M. **2020**. The effect of total and individual alfalfa saponins on rumen methane production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 1922-1930. doi:10.1002/jsfa.10200.1002/jsfa.9419. 100 pkt MEiN, IF 3,638.
3. **Kozłowska M.**, Cieślak A., Józwick A., El-Sherbiny M., Gogulski M., Lechniak D., Gao a M., Rizki Yanza Y. Vazirigohar M., Szumacher-Strabel M. **2021**. Effects of partially replacing grass silage by lucerne silage cultivars in a high-forage diet on ruminal fermentation, methane production, and fatty acid composition in the rumen and milk of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 277, 114959. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2021.114959. 200 pkt MEiN, IF 3,247.

W publikacji nr 1 Pani mgr Martyna Kozłowska jest czwartym autorem (na 7. współautorów) a Jej wkład w powstanie tej pracy Autor korespondencyjny określił na 15%. Z informacji zawartych w oświadczeniu wynika, że aktywność Doktorantki dotyczyła przede wszystkim współudziału w przygotowaniu koncepcji i metodyki badań, wykonania wybranych analiz chemicznych, zbierania literatury, opracowania rozdziału dyskusja oraz przygotowania manuskryptu do wymagań redakcyjnych czasopisma. Pomimo stosunkowo niewielkiego zaangażowania mgr Martyny Kozłowskiej w powstanie tej publikacji uważam, że jest ona ważnym elementem zbioru 3 prac twórczych, tematycznie mocno powiązanych z zakresem przeprowadzonych badań. Publikacja ta pozwala lepiej zrozumieć ciąg przyczynowo-skutkowy poszczególnych etapów badań i zapoznać się ze strukturalnymi oraz ilościowymi zmianami w zawartości saponin w świeżej i zakiszonej zielonce pochodzącej z 10 odmian lucerny.

Zdecydowanie większy wkład Pani mgr Martyna Kozłowska miała w powstanie 2 pozostałych publikacji wchodzących w skład cyklu monotematycznego. W publikacji nr 2 i 3 Doktoranta jest pierwszym autorem a Jej udział w opracowanie manuskryptów oceniano

odpowiednio na 59 i 61%, przy łącznej liczbie współautorów publikacji wynoszącej odpowiednio 9 i 10 osób. Zaangażowanie Doktorantki w powstanie tych publikacji dotyczyło między innymi przygotowania koncepcji i metodyki badań, zbierania literatury, napisania pierwszej wersji manuskryptu i jego dostosowania do wymogów czasopisma, wykonania analiz chemicznych czy wreszcie przygotowania odpowiedzi na uwagi recenzentów redakcyjnych. Warto podkreślić, że informacje zawarte w oświadczeniach świadczą o wiedzy i dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do prowadzenia eksperymentów badawczych oraz do zbierania i interpretacji danych na tle dostępnej literatury naukowej.

Podsumowując tę część recenzji należy stwierdzić, że z dołączonych oświadczeń wynika, iż wkład mgr Martyny Kozłowskiej w powstanie wymienionych wyżej publikacji naukowych był dominujący. Sumaryczny ich IF wynosi 10,523, zaś suma punktów MEiN 400. Dodatkowo Doktorantka samodzielnie przygotowała omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Dlatego w świetle powyższych faktów należy stwierdzić, że rozprawę doktorską stanowi samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, która zgodnie z obowiązującymi przepisami może stanowić podstawę do oceny merytorycznej wartości rezultatów badań przeprowadzonych w celu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk rolniczych. Znaczącą wartość naukową przeprowadzonych badań potwierdzają wysokie wartości wskaźników bibliometrycznych opublikowanych prac.

Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej liczy łącznie 43 strony i posiada układ typowy dla dysertacji naukowych. Kolejność poszczególnych rozdziałów jest logiczna i nie budzi zastrzeżeń. Tekst jest napisany starannie, językiem bogatym w specjalistyczne terminy i wyrażenia. Tytuł rozprawy: „**Effects of saponins from fresh and ensiled alfalfa (*Medicago sativa* L.) on enteric methane emission and biohydrogenation in dairy cows**” - w tłumaczeniu polskim „Świeża i zakiszana lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) jako źródło saponin oddziałujących na poziom produkcji metanu oraz proces biouwodorowania u krów mlecznych” w pełni odzwierciedla zagadnienia poruszane w opracowaniu.

W maszynopisie przekazanym do oceny wyodrębniono łącznie 8 rozdziałów wraz z podrozdziałami, poprzedzonych streszczeniem w języku angielskim i polskim, wykazem recenzentów oraz wykazem prac naukowych wchodzących w skład cyklu monotematycznego. W bardzo starannie przygotowanym opracowaniu pominięto podrozdział 4.4. lub też nastąpiła pomyłka w przyjętej numeracji. W dalszej części pracy Doktorantka umieściła krótki wstęp wprowadzający czytelnika w podejmowaną tematykę badawczą.

Zawarty we wstępie przegląd literatury zredagowano zwięźle na 4 stronach maszynopisu. Zawiera on wiele cennych informacji wprowadzających w szczegóły dotyczące znaczenia lucerny w żywieniu krów mlecznych oraz zagrożeń wynikających z antropologicznych źródeł emisji metanu do środowiskowych, w tym pochodzących z produkcji zwierzęcej. Doktorantka wiele miejsca poświęciła na omówienie możliwości ograniczania tworzenia się metanu w żwaczu przy wykorzystaniu czynników żywieniowych oraz znaczenia w tym procesie wtórnych metabolitów roślinnych, zwłaszcza saponin, obecnych w różnych częściach botanicznych lucerny. Omówiono także wpływ procesu zakiszania zielonek za zawartość saponin w uzyskanych kiszonkach. Warto podkreślić, że przegląd literatury przygotowano w taki sposób, aby merytorycznie uzasadnić prawidłowość kolejnych etapów badań, którymi Doktorantka zajmowała się w swojej dysertacji.

W kolejnych rozdziałach mgr Martyna Kozłowska sformułowała 6 hipotez oraz 7 celów badawczych, ściśle powiązanych z przedstawionymi wcześniej hipotezami. Dotyczyły one określenia: i/ wpływu procesu zakiszania na zawartość składników pokarmowych oraz na rodzaj i zawartość saponin w zielonkach i kiszonkach z lucerny różnych odmian, ii/ wpływu saponin pozyskanych ze świeżej lub zakiszonej lucerny na wskaźniki fermentacji w żwaczu metodą Hohenheim gas-test oraz na produkcję metanu i populację mikroorganizmów przy wykorzystaniu metody *in vitro* batch culture, iii/ wpływu zastąpienia kiszonki z traw kiszonką z lucerny w dawkach pokarmowych sporządzonych na bazie kiszonki z całych roślin kukurydzy na wskaźniki fermentacji w żwaczu metodą RUSITEC, iv/ wpływu udziału kiszonki z lucerny w dawkach pokarmowych dla krów wyposażonych w kaniule do żwacza na pobranie paszy, wskaźniki fermentacji w żwaczu oraz strawność w całym przewodzie pokarmowym, a także v/ wpływu saponin zawartych w kiszonce z lucerny na wydajność mleka oraz na skład kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka krów utrzymywanych w warunkach produkcyjnych. Zarówno hipotezy jak i cele badań sformułowano logicznie i precyzyjnie, chociaż pewną wątpliwość może budzić ostatni cel badawczy, ponieważ w trakcie doświadczenia produkcyjnego na krowach mlecznych badano wpływ na analizowane wskaźniki udziału w dawce pokarmowej nie saponin z lucerny a kiszonki z lucerny. Badania z tego zakresu, opisane w publikacji nr 3 (eksperymenty 3. i 4.) przeprowadzono na 6 krowach przetokowanych do żwacza oraz dodatkowo na 54 krowach produkcyjnych z udziałem kiszonki z lucerny o nieznannej zawartości saponin oraz nieznannej czytelnikowi technologii zakiszania (faza rozwojowa roślin, wielkość rozdrobnienia, rodzaj zastosowanych dodatków kiszonkarskich itp.). Z dużym prawdopodobieństwem można

założyć, że nie były to te same kiszonki eksperymentalne, które użyto do przeprowadzenia badań opisanych w publikacji 1. i 2.

Kolejny rozdział dysertacji *Materiały i metody* Autorka przedstawiła na 9 stronach maszynopisu. Rozdział ten zredagowano z dużą dbałością o szczegóły przeprowadzonych eksperymentów. Zawarto w nim informacje dotyczące pochodzenia materiału roślinnego i sposobu jego konserwacji, następnie sposobu ekstrakcji saponin, przebiegu eksperymentów *in vitro* (Hohenheim gas test, Batch culture experiment i Rumen simulation technique (RUSITEC)) i *in vivo* (na krowach wyposażonych w kaniule do żwacza oraz na krowach produkcyjnych). Precyzyjnie przedstawiono metodykę wykonanych analiz chemicznych pasz, w tym składu i zawartości saponin, następnie składu chemicznego mleka i płynu żwacza oraz oznaczeń koncentracji metanu. Uzyskane wyniki poddano właściwie dobranej i przeprowadzonej analizie statystycznej wykonanej przy wykorzystaniu procedur programu komputerowego SAS (SAS Institute Inc.). Doświadczenia wykonano zgodnie z obowiązującymi procedurami prowadzenia badań fizjologiczno-żywnieniowych, zatwierdzonymi przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (decyzja nr 25/2012).

Wyniki przeprowadzonych analiz i eksperymentów przedstawiono na 3 stronach maszynopisu. W rozdziale tym posłużono się wyłącznie tekstem, odwołując czytelnika do tabel i opisów umieszczonych w poszczególnych publikacjach. Rozdział *Wyniki* podzielono na logicznie następujące po sobie akapity, w których analizowano uzyskane dane ze wszystkich prac. Do najważniejszych osiągnięć eksperymentów opisanych w publikacji nr 1 należy zaliczyć wykazanie 2-3 krotnego zwiększenia zawartości saponin ogółem w kiszonce z lucerny w porównaniu z ich zawartością w zielonce oraz ujemnej korelacji pomiędzy zawartością białka i saponin w suchej masie kiszonek z lucerny. W kontekście tego odkrycia w trakcie publicznej obrony uprzejmie proszę Panią Doktorantkę o wyjaśnienie, co jest przyczyną obserwowanych różnic w koncentracji i składzie saponin w zielonce i kiszonce z lucerny i czy mógł mieć na to wpływ rodzaj inokulantu użytego w trakcie zakiszania. Wydaje się, że niedoskonałość metod analitycznych używanych do oznaczeń zawartości saponin w materiałach roślinnych nie jest jedynym logicznym uzasadnieniem tego faktu, podobnie jak zwiększenie zawartości suchej masy w kiszonkach.

Do znaczących osiągnięć Doktorantki opisanych w publikacji nr 2 należy zaliczeń przede wszystkim wykazanie różnic w zawartości saponin w kiszonkach sporządzonych z zielonek różnych odmian lucerny siewnej, które dodatkowo wykazują różną zdolność ograniczania produkcji metanu w żwaczu, bez negatywnego wpływu na przebieg pozostałych

procesów fermentacyjnych. Ponadto stwierdzono, że efektywność działania poszczególnych form saponin uzależniona była od części rośliny, z której dokonano ich ekstrakcji. W warunkach *in vitro* najbardziej widoczne efekty obserwowano po zastosowaniu saponin uzyskanych z korzenia. Ich ograniczające działanie na wytwarzanie metanu w żwaczu tłumaczono efektem bezpośrednim lub pośrednim wynikającym ze zmniejszenia udziału mikroorganizmów żwacza zaangażowanych w proces metanogenezy, zwłaszcza pierwotniaków. W tym kontekście rodzi się kolejne pytanie, czy saponiny zawarte w lucernie mogą zmniejszać wartość biologiczną białka mikroorganizmów przepływającego do jelit zwierząt przeżuwających (poprzez zmniejszenia populacji pierwotniaków w żwaczu), a tym samym ograniczać produktywność zwierząt najbardziej wydajnych?

Innym ciekawym zagadnieniem była interpretacja wyników eksperymentów przeprowadzonych na zwierzętach produkcyjnych (publikacja nr 3). W doświadczeniu na krowach mlecznych wykazano, że najlepsze efekty w zakresie zmniejszenia produkcji metanu w żwaczu i jego emisji do środowiska uzyskano po zastosowaniu w dawce pokarmowej kiszonki z lucerny odmiany Kometa. Niezależnie od odmiany, zastosowanie kiszonki z lucerny w miejsce kiszonki z traw w dawkach pokarmowych sporządzonych na bazie kiszonki z kukurydzy powodowało jednak niekorzystne zmiany w profilu kwasów tłuszczowych tłuszczu mleka polegające na zwiększeniu udziału nasyconych kwasów tłuszczowych.

Dobre przygotowanie merytoryczne do prowadzenia badań Pani mgr Martyna Kozłowska wykazała przygotowując rozdział *Dyskusja*. Ta licząca 4 strony część pracy oparta jest na głębokiej znajomości podjętej tematyki badawczej, popartej właściwie dobraną, wykorzystaną i starannie zestawioną bibliografią liczącą łącznie 51 pozycji. Dyskusję podzielono na akapity, które w swoim brzmieniu odpowiadają treściom zawartym w kolejnych publikacjach wchodzących w skład monotematycznego cyklu publikacji. Takie podejście ułatwiło Doktorantce interpretację wyników badań własnych na tle osiągnięć uzyskanymi przez innych autorów.

W kolejnym rozdziale *Wnioski* Doktorantka na jednej stronie maszynopisu dokonała podsumowania najważniejszych osiągnięć naukowych, które uzyskała w swojej pracy. Sformułowane przez Panią mgr Martynę Kozłowską wnioski są prawidłowe i mają uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych eksperymentów. Doktorantka stwierdziła w nich, że proces zakiszania zwiększa koncentracje saponin w kiszonce z lucerny a kiszonka sporządzona z roślin odmiany Kometa charakteryzuje się najwyższym, spośród badanych odmian, potencjałem do ograniczania emisji metanu do środowiska. Ten ostatni efekt odbywa

się jednak kosztem zmniejszenia sumy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, natomiast zwiększenia udziału nasyconych kwasów tłuszczowych w tłuszczu mleka. Wyżej opisane osiągnięcia z pewnością mają charakter użyteczny i wnoszą ważny wkład w rozwój dyscypliny zootechniki.

Podsumowując przeprowadzoną ocenę dysertacji należy podkreślić, że uzyskane przez Doktorantkę osiągnięcia dotyczące oceny przydatności kiszzonek z lucerny, jako źródła aktywnych saponin, w procesach modulowania przebiegu fermentacji w żwaczu u krów mlecznych i ograniczania emisji metanu do środowiska wnoszą nowe wartości poznawcze do aktualnego stanu wiedzy w dyscyplinie zootechniki i rybactwo i mają charakter poznawczy. Jednocześnie zwracam uwagę, że zakres przeprowadzonych badań i uzyskanych osiągnięć jest zgodny z wytycznymi zarówno dla oceny osiągnięć naukowych Doktorantki w zakresie dotychczasowej dyscypliny i dziedziny nauki (nauki rolnicze, dyscyplina zootechniki), w zakresie której wszczęto przewód doktorski, jak i osiągnięć wg nowej klasyfikacji (nauki rolnicze, dyscyplina zootechniki i rybactwo), w zakresie której może zostać nadany stopień naukowy doktora nauk rolniczych. Zatem stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja Pani mgr Martyny Kozłowskiej odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789). Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu wniosek o dopuszczenie mgr Martyny Kozłowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

