

Prof. dr hab. Roman A. Grzybowski  
ul. Nowoursynowska 129/1  
02-797 Warszawa

## Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Cioch pt. „Charakterystyka mikrobiologiczna i chemiczna procesu fermentacji spontanicznej winogron pochodzących z podkarpackich i małopolskich winnic” wykonanej w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie pod kierunkiem dr. hab. Inż. Pawła Satory.

Produkcja winiarska jest /obok wytwarzania piwa/ najstarszą znaną biotechnologią. Adaptacja winorośli na potrzeby człowieka miała miejsce ok. 10 tysięcy lat temu. Jak ważnym napojem było wino dla ówczesnych społeczeństw dowodzi stosowanie go jako napoju liturgicznego. Stąd m.in. rozwój winiarstwa na ziemiach słowiańskich nasilił się po przyjęciu chrześcijaństwa /1050 lat temu/.

Winiarstwo rozwijało się w okolicach o łagodniejszym klimacie, na stokach o dobrym nasłonecznieniu, m.in. na zboczach Wawelu /już w X wieku/, ale również na Podkarpaciu, na Śląsku, wzdłuż brzegów Wisły /Janowiec/ czy na Lubelszczyźnie /Zwierzyniec, Biłgoraj/. Duży zasięg upraw winorośli może świadczyć o łagodnym klimacie w okresie średniowiecza.

Wojny w XVII i XVIII w. oraz ochłodzenie klimatu zahamowały rozwój lub nawet położyły kres plantacjom winorośli. Powrót do upraw nastąpił w XIX w., szczególnie w zaborze austriackim, a więc w południowych rejonach Polski / na Podolu/. W okresie II Rzeczypospolitej, aż do II wojny światowej, winiarstwo dynamicznie rozwijało się w południowych rejonach kraju.

Po wojnie Polska straciła Podole, ale otrzymała winnice zielonogórskie, które w pierwszych latach dynamicznie rozwijały się, by w wyniku decyzji politycznych, ulec likwidacji z jednoczesnym nasileniem produkcji win owocowych.

Od lat 80. XX w. nastąpił powrót do uprawy winorośli i produkcji win gronowych z

własnych upraw m.in. w Małopolsce i na Podkarpaciu. Ta sytuacja stała się inspiracją do badań wspomagających raczkujący przemysł.

Przez tysiąclecia wino wytwarzano z użyciem naturalnej mikroflory bytującej na owocach, roślinach i w winiarniach. Była to mikroflora typowa dla danego regionu lub nawet winnicy. Fermentację taką nazywamy obecnie spontaniczną.

Dzięki pracom XIX w. mikrobiologów /głównie Pasteura i Kocha/, wyizolowano z fermentujących moszczów czyste kultury drożdży, stosowane z powodzeniem przez następne lata.

Fermentacja spontaniczna, jak i fermentacja z użyciem czystych kultur mają swoje wady i zalety. Która jest lepsza? Oto jest pytanie, z którym postanowiła się zmierzyć Autorka recenzowanej pracy, Pani mgr inż. Monika Cioch.

### **Formalna ocena**

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 197 numerowanych stron druku w tym 11 tabel /1-3,5,12,14,15,17-20/ oraz 41 rysunków /1-32 i 40-48/. W załącznikach znajduje się 16 tabel /4, 6-11,13,16,21-27/ oraz 7 rysunków /33-39/.

Sumując dokumentacja badań zawarta jest w 27 tabelach i 39 rysunkach.

Podkreślić należy staranność wykonania przedstawionych materiałów. Może tyko budzić zdziwienie takie rozczłonkowanie tych danych między tekst i załączniki. Nie ułatwia to czytania pracy i śledzenia postępów badań.

Przegląd literatury oparto na 189 tytułach. Około 51% stanowią pozycje z ostatnich 10 lat, a 97% to tytuły angielskojęzyczne. Można na podstawie przeglądu literatury wysnuć wniosek, że w Polsce niewiele się dzieje na tym polu.

Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich i zawiera:

25 stron przeglądu literatury i cel pracy,

17 stron – materiały i metody,

126 stron – wyniki i dyskusja,

29 stron – podsumowanie, wnioski i streszczenie /po polsku i angielsku/ oraz spis piśmiennictwa.

Dodatkowo na 34 nienumerowanych stronach – zatytułowanych załączniki- umieszczono wspomniane wyżej tabele/16/ i rysunki /7/.



Tak więc rzeczywista objętość pracy to 231 stron.

### **Ocena merytoryczna**

Podjęcie pracy na temat zagadnień krajowego winiarstwa Autorka uzasadnia rozwojem upraw winorośli, szczególnie w południowych i zachodnich rejonach Polski.

Do produkcji wina z krajowych winogron należałoby stosować rodzime szczepy drożdży występujące na owocach dojrzewających w specyficznych, dla danego regionu, warunkach klimatycznych. Jest to bardzo istotne założenie.

Doktorantka przewiduje, i to zasługuje na szczególne podkreślenie, że pozytywne wyniki pracy będą wdrożone w przemysłowej produkcji wina gronowego w Polsce. W dogłębnej analizie literatury, co należy docenić, ściśle związanej z przewidywanym zakresem badań, Autorka omawia spontaniczną fermentację moszczów wywołaną przez mikroflorę obecną na owocach gronowych i w całej winnicy. Są to drożdże należące do różnych rodzajów, także spoza *Saccharomyces*. Dla fermentacji spontanicznej charakterystyczne jest następstwo /sukcesja/ kolejnych grup drożdży, zakończona dominacją drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*.

Drożdże non-*Saccharomyces* wytwarzają szereg związków chemicznych, które zależnie od liczby i intensywności wzrostu, mogą wywierać korzystny lub niekorzystny wpływ na jakość wina. Wynikiem działalności wielu organizmów, także innych niż drożdże, są produkty występujące w różnych stężeniach. Obok najważniejszego, alkoholu etylowego oraz glicerolu, powstają alkohole wyższe, zwane fuzlami, mające istotny wpływ na bukiet wina. Na smak wina wpływają wyraźnie estry lotne i nielotne. Związki te wywierają dodatni wpływ na bukiet wina tylko w ograniczonym zakresie stężeń. Szczególne uzdolnienia do wytwarzania estrów mają drożdże spoza rodzaju *Saccharomyces*. Aldehydy i ketony powstające w czasie fermentacji i leżakowania wina, w odpowiednich stężeniach również przyczyniają się do właściwego smaku i bukietu wina. W moszczu gronowym, poza drożdżami, znajdują się inne mikroorganizmy pochodzące z owoców, gleby, powietrza, mogące wpływać istotnie na jakość wina. Czy Autorka nie znalazła informacji o bakterii kwasu mlekowego /LAB/, które mogą mieć korzystny wpływ na jakość wina przez jego biologiczne odkwaszenie. A może to mieć istotne znaczenie w przypadku kwaśnych owoców naszego klimatu.

Do mało istotnej niezręczności zaliczam umieszczenie w podrozdziale 2.3." Produkty



fermentacji alkoholowej” metanolu, z jednoczesną adnotacją, że „nie jest produktem fermentacji alkoholowej”.

Za co najmniej dyskusyjne uważam zamieszczenie w przeglądzie literatury „Charakterystyka badanych odmian winorośli” /2.2./. Czy nie lepiej byłoby zmieścić tę informację w rozdziale 4. Materiały ?

Doktorantka prowadziła badania posługując się bogatą i nowoczesną metodyką.

Do identyfikacji drożdży stosowała metodę PCR-RAPD oraz PCR-RFLP.

Chemiczną analizę fermentującego środowiska prowadzono metodami chromatograficznymi. Stosowane metody metody dokładnie opisano. Może niekoniecznie trzeba było poświęcić aż dwie strony / s.28 i 29/ na podanie pełnego składu podłoży mikrobiologicznych będących w obrocie handlowym, i których skład jest opisany, chyba, że skład modyfikowano, ale nie ma na ten temat informacji. Natomiast nieprecyzyjnie podano w metodyce przygotowanie moszczu do fermentacji /s.30/. Czy 500g jagód wprowadzono do kolby o poj. 500 cm<sup>3</sup> i podawano spontanicznej fermentacji bez rozdrobnienia ,czy po uprzednim rozdrobnieniu. A jeśli tak, to w jaki sposób rozdrabniano?

Można byłoby oczekiwać informacji skąd pozyskiwano moszcz gronowy Zweigelt.

W pierwszym etapie badań założono cyt. „ 5.1. Charakterystykę mikrobiologiczną i chemiczną spontanicznej fermentacji moszczów gronowych.....”. Zbadano zmiany ogólnej zawartości j.t.k. drożdży podczas 28 dobowej fermentacji moszczów otrzymanych z 6 szczepów winorośli uprawianych w 4 winnicach. Owoce pozyskiwano w dwóch sezonach wegetacyjnych. Daje to 48 kombinacji, co dowodzi rozmiaru eksperymentu. Jednocześnie należy zwrócić uwagę, że charakterystyka mikrobiologiczna moszczów gronowych ograniczyła się tylko do drożdży. Czyżby nie było tam innych, ważnych grup drobnoustrojów ?

Zawartość ogólnej liczby komórek drożdży w badanych moszczach zmieniała się zależnie od szczepu winorośli, winnicy i sezonu zbioru, co Autorka tłumaczy, i słusznie. warunkami lokalnego klimatu, składem gleby i wahaniami pogody /przymrozki, opady/. Wymienione czynniki wpłynęły na skład chemiczny i mikrobiologiczny owoców. O ile w pracy badano zawartość cukru i kwasowość moszczów, o tyle inne czynniki /glebowe, klimatyczne/ nie zostały udokumentowane i mogą być traktowane dyskusyjnie. Podobnie jak przypuszczalna obecność drożdży killerowych /s.48/.



Szczególną uwagę zwróciła Autorka na drożdże asymilujące kwas L-jabłkowy i drożdże rodzaju *Kloeckera/Hanseniaspora*.

Obecność tych pierwszych, w technologii winiarskiej, istotna jest z uwagi na zdolność odkwaszania wina i może być alternatywą dla bakterii kwasu mlekowego, stąd słuszne zainteresowanie Autorki tymi organizmami. Ich zawartość w fermentujących moszczach zależała od szczepu winnego, sezonu wegetacyjnego i pogody. Ciekawym spostrzeżeniem Doktorantki jest /s.70/ zależność między zawartością kwasów w moszczu, a zawartością drożdży utylizujących kwas jabłkowy. Wymagałoby to pogłębianych badań, czy jest to prawidłowość, czy tylko jednostkowe zdarzenie.

Drożdże z rodzaju *Kloeckera/Hanseniaspora* występowały w fermentujących moszczach w znaczących liczbach/nawet do 99% ogólnej zawartości drożdży/. Mogą one, zależnie od składu podłoża i środowiska, wywierać dodatni wpływ na aromat wina lub gdy wytwarzają zbyt dużo kwasu octowego pogarszają jakość wina. Rozmnażają się one w pierwszych dobach fermentacji, po czym ich liczba, po ok. 18 dobach, zmniejsza się do zera. Ta prawidłowość dotyczy wszystkich fermentujących spontanicznie moszczów.

Ogólna obserwacja wskazuje, że właściwe drożdże winiarskie /*Saccharomyces*/ pojawiają się w fermentacji spontanicznej w 9-13. dniu i ich udział wzrasta do blisko 80-90% przy zakończeniu procesu /28 dni/.

Analiza chemiczna przefermentowanych moszczów wykazała mało obiecujące poziomy alkoholu etylowego po czterech tygodniach fermentacji. Przy zawartości ok. 20% cukru w moszczu uzyskiwano ok. 5% alkoholu. Jednocześnie stwierdzono znaczne przyrosty zawartości glicerolu przy prawie niezmienionej kwasowości. Ponieważ stwierdzono powstawanie 11 innych związków chemicznych plus metanol, który nie jest produktem przemiany cukru, to może należałoby pokusić się o zbilansowanie procesu i określenie co się stało z cukrem lub dlaczego nie został on wykorzystany. Uzyskane wyniki nie zachęcają producentów wina do tej technologii.

W świetle dotychczasowych badań, tytuł rozdziału 5.1. „Charakterystyka mikrobiologiczna procesu fermentacji...” /s,42/ wydaje się zbyt daleko idący. Dotyczy on bowiem tylko drożdży, a przecież w fermentacji spontanicznej biorą udział również inne mikroorganizmy mogące mieć wpływ na przebieg procesu, chociażby bakterie kwasu



mlekowego. O udziale tych bakterii w odkwaszaniu win Autorka wspomina na s.138. Drożdże zużywające kwas jabłkowy mogłyby być alternatywą dla LAB, ale czy jest pewność, że jest to lepsze rozwiązanie, a poza tym jak w fermentacji spontanicznej kierować działalnością tych drobnoustrojów?

W pasteryzowanych moszczach przebadano właściwości fermentacyjne wyizolowanych szczepów drożdży. Najwyższą zawartość alkoholu wykazały wina otrzymane przy użyciu drożdży z rodzaju *Saccharomyces*. Zbadano również odporność drożdży na różne stężenia  $SO_2$  w zależności od stężenia alkoholu.

Praktycznym ukoronowaniem badań było otrzymanie win z moszczów winogron Johanniter i Regent przy zastosowaniu trzech wyizolowanych gatunków drożdży, dwóch z rodzaju *Saccharomyces* i jednego z rodzaju *Pichia*. W wyniku 28-dobowej fermentacji uzyskane wina poddano analizie chemicznej i organoleptycznej. Jak można było oczekiwać na podstawie literatury, najlepsze wino otrzymano przy użyciu drożdży *Saccharomyces*, wyizolowanych z moszczów rodzimych szczepów winorośli

Pracę podsumowuje 10 wniosków mających charakter rekapitulacji wyników badań. Streszczenie w polskiej i angielskiej wersji jest rozwinięciem i udowodnieniem tez sprecyzowanych w „Celu pracy”.

Praca napisana jest dobrym, jasnym językiem z precyzyjnym wykorzystaniem literatury, zarówno w przeglądzie, jak i w dyskusji wyników. Dyskusyjne może być tylko umieszczenie w dyskusji wyników akapitów, które mogłyby, z pożytkiem dla przejrzystości i objętości pracy, znaleźć się w przeglądzie literatury. Na podkreślenie zasługuje staranna korekta /brak błędów drukarskich/ i wysoki poziom edytorski, na jaki pozwoliła zastosowana technika komputerowa.

### **Uwagi krytyczne**

W trosce o przyszłość naukową Doktorantki i z uwagi na precyzję w komunikowaniu się /zwłaszcza, że dotyczy to inżynierów/ pozwalam sobie podnieść kilka kwestii /w tym o charakterze dyskusyjnym/.

„Próba kontrolna” to nie to samo co „kontrola” /s.36,133,152/. Ta ostatnia może być drogowa, skarbową i in.



Może zamiast obco brzmiącego imiesłowu „inhibowany” lepiej użyć swojskiego „hamowany”/ s.63,155/. Tym bardziej, że nie wiadomo czy ten imiesłów jest wyprowadzony z łacińskiego czasownika *inhibeo* – wstrzymywać czy z angielskiego *inhibit*-wstrzymywać. Jeśli z angielskiego to dlaczego nie „inhibitowany”?

Myślę, że dla określenia zawartości substancji lepiej jest używać bezpieczniejszego słowa „stężenie” zamiast „koncentracja”. Stężenie jest terminem chemicznym, gdy tymczasem koncentracja używana jest w fizyce, ekonomii, statystyce, psychologii i wojskowości. Mówimy wprawdzie o koncentratkach np. soku jabłkowego, ale trudno nazywać koncentratem kilkunastoprocentowe stężenia cukru w moszczu.

Powszechnie występującym błędem – nie tylko w tej pracy- jest zamienne używanie słów „ilość” i „liczba”. Przypomnę: liczba dotyczy rzeczowników policzalnych np. komórek, j.t.k., itp. Ilość odnosi się do niepoliczalnych jak np. wody, moszczu, mąki, soku, piasku. Czyli możemy mówić o dużej ilości mikroflory mierzonej liczbą komórek /s.11,43,45 i dalsze/.

Powszechnie spotykanym błędem /nagminnie w telewizji/ jest stosowanie zwrotu „odnośnie czegoś” zamiast poprawnego „odnośnie do czegoś” . S.6 „odnośnie wpływu”.

Na s.86 Autorka użyła określenia „aktywność wodna”. Czy nie chciała Pani napisać „aktywność wody” -/water activity/ ?

W spisie piśmiennictwa brak jest przywołanej na s.36 pozycji Godfrey i Thorton 2002 oraz na s.89 pozycji Wang i in.2013 /może chodzi o Wang i Liu 2013/.

Być może przez nieuwagę / proszę wybaczyć/ nie znalazłem w tekście odwołań do następujących pozycji spisu piśmiennictwa : 92,104,151,163,177.

Na koniec rozważań językowych, chciałbym zwrócić uwagę Autorki na drobną usterkę na stronie tytułowej.

Jeśli piszemy doktor habilitowany to skrót jest dr hab. Ale jeśli nie jest to mianownik, np. doktora habilitowanego, to są dwie możliwości : albo dr.hab. / z kropką/ albo dra hab. /bez kropki/. Podobnie na stronie następnej dr. hab/ilitowanmu/ i prof. dr. hab/ilitowanemu/. Drobiazg, ale warto pamiętać.

Wszystkie uwagi merytoryczne i redakcyjne mają charakter drugorzędny bądź dyskusyjny i nie wpływają na ostateczną, pozytywną ocenę pracy. Uważam, że recenzja jest okazją do wymiany poglądów, jej celem pomoc w podniesieniu jakości warsztatu na-

ukowego Doktorantki. Jeśli tak zostałem zrozumiany, to cel osiągnąłem.

### **Ogólna ocena pracy**

Pani mgr inż. Monika Cioch postawiła sobie ambitne zadanie naukowego rozwiązania zagadnień istotnych z praktycznego punktu widzenia. Po dogłębnym rozpoznaniu literaturowym, Autorka prawidłowo zaplanowała działania eksperymentalne. Wykazała się przy tym umiejętnością zastosowania nowoczesnych narzędzi badawczych i wprowadzenia analizy statystycznej. Wyniki przedstawiła w sposób przejrzysty, prowadząc jednocześnie dyskusję w nawiązaniu do przeczytanej literatury. Nie było to łatwe przy olbrzymiej liczbie wyników z doświadczeń.

Doktorantka osiągnęła cel, jaki sobie postawiła i zweryfikowała postawione tezy badawcze.

Podkreślić należy dojrzałość naukową Doktorantki, umiejętność interpretacji i przedstawiania wyników badań.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawiona analiza pracy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Cioch pt. „Charakterystyka mikrobiologiczna i chemiczna procesu fermentacji spontanicznej winogron pochodzących z podkarpackich i małopolskich winnic” upoważnia mnie do stwierdzenia, że praca spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003r. / Dz. U. 65 poz.595 z późn. zmianami/ i wnioskowania do Wysockiej Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony i dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, dn.15.02.2016r.

