

dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Łódź, 8.03.2016

Ocena

Pracy doktorskiej **mgr inż. Moniki Cioch**

nt. „**Charakterystyka mikrobiologiczna i chemiczna procesu fermentacji spontanicznej winogron pochodzących z podkarpackich i małopolskich winnic**”

wykonanej

w Katedrze Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej
na Wydziale Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja
w Krakowie

Promotor: dr. hab. inż. Paweł Satora

Polskie winiarstwo ma swoje korzenie w IX-X wieku i pomimo trudnych dla uprawy winorośli warunków klimatycznych i braku tradycji konsumpcji wina, nadal zajmuje ważne miejsce wśród przemysłów fermentacyjnych. W ostatnim dziesięcioleciu winiarstwo gronowe odradza się w Polsce nie tylko w odpowiedzi na trendy rynkowe i promowanie produktów regionalnych, ale przede wszystkim dzięki polskim winiarzom pasjonatom. O ile produkcja wina na skalę wielkoprzemysłową z inokulacją wyselekcjonowanymi rasami drożdży winiarskich jest w pełni kontrolowana mikrobiologicznie, to fermentacja moszczu gronowego w małych winiarniach jest znacznie trudniejsza do prowadzenia, a udział drożdży naturalne bytujących na gronach winnych jest znaczący. Podkarpackie i małopolskie winnice mają zwykle niewielki areał, od kilku arów do kilkunastu hektarów. Wina wytwarzane na drodze fermentacji spontanicznej są szczególnie cenione ze względu na charakter unikatowy dla każdej z lokalnych winiarni. Specyficzne mikroklimaty geograficznie nieodległych winnic, nawet w przypadku tych samych odmian winorośli, warunkują rozwój zróżnicowanych jakościowo i ilościowo konsorcjów drożdży, co z kolei umożliwia tworzenie unikatowego profilu sensorycznego wina, który może stanowić wizytówkę winnicy. Dobór natywnych szczepów drożdży dobrze zaadaptowanych do warunków środowiska staje się szansą na tworzenie wyjątkowego produktu - wina o specyficznym, identyfikowanym z konkretną winnicą, profilu organoleptycznym.

Podjęte przez Panią mgr inż. Monikę Cioch badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej są pierwszym w Polsce studium opisującym układ jakościowy i ilościowy konsorcjów natywnych drożdży selekcjonujących się w procesie spontanicznej fermentacji moszczy gronowych pozyskanych z odmian winorośli uprawianych na Podkarpaciu i w Małopolsce oraz charakteryzującym potencjał tych drożdży w tworzeniu komponentów bukietu i aromatu win. Doktorantka podjęła się weryfikacji tez wiążących profil konsorcjum drożdży natywnych w fermentacji spontanicznej moszczu gronowego, ze składem chemicznym moszczu oraz profilem sensorycznym otrzymanego wina. W założeniu, badania miały również zweryfikować możliwość wytwarzania win gronowych o prawidłowym profilu sensorycznym, z udziałem wyselekcjonowanych drożdży izolowanych z winogron pochodzących z polskich winnic. Ze względu na niezaprzeczalną rolę różnych gatunków drożdży w tworzeniu bukietu i aromatu wina wytwarzanego na drodze fermentacji spontanicznej, trudno jest wyznaczyć jednoznacznie granicę pomiędzy korzystnym i szkodliwym działaniem poszczególnych gatunków. Badania prowadzone w regionach winiarskich w różnych zakątkach świata dowodzą konieczności doboru szczepów najlepiej przystosowanych do lokalnych warunków środowiskowych. Przedstawiona do oceny praca doktorska wpisuje się w nurt tych badań i stanowi ich wartościowe uzupełnienie. Badania mają również wysoką wartość aplikacyjną, dostarczając polskim winiarzom cennych szczepów drożdży wraz z ich charakterystyką enologiczną.

Zamierzeniem pracy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Cioch była kompleksowa charakterystyka procesu spontanicznej fermentacji moszczy gronowych pozyskanych z winogron białych i czerwonych, odmian winorośli uprawianych w winnicach podkarpackich i małopolskich. Cenny element pracy stanowią badania zmierzające do wyselekcjonowania spośród natywnych drożdży, izolatów charakteryzujących się właściwościami enologicznymi zapewniającymi prawidłową produkcję win z surowca pozyskanego w tych winnicach, w tym odporności na ditlenek siarki i podwyższone stężenie etanolu. Na podkreślenie zasługuje wieloaspektowe podejście do tematu oraz szeroki warsztat badawczy. Przeprowadzenie eksperymentów wymagało znajomości przez Doktorantkę zarówno standardowych technik analizy mikrobiologicznej, jak i metod genetyki molekularnej w identyfikacji drożdży, a także obok rutynowych analiz chemicznych powszechnych w winiarstwie, umiejętności posługiwania się technikami instrumentalnej analizy chemicznej. Pani mgr inż. Monika Cioch założone cele konsekwentnie realizowała poprzez zaplanowanie i realizację szerokiego zakresu logicznego ciągu eksperymentów. O skali badań świadczy izolacja 375 kultur drożdży, selekcja prowadząca do identyfikacji 92 izolatów należących do 33 gatunków, konsekwentna ocena ich parametrów fermentacyjnych oraz następane etapy selekcji zawężające badania kolejno do 20, 10 i 3 szczepów. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że Pani mgr inż. Monika Cioch

wykazała, niezbędną w badaniach naukowych, umiejętność analizy wyników oraz ich uogólniania z wykorzystaniem metod statystycznych.

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 196 stron, w tym 178 stron tekstu i 18 stron wykazu literatury. Dokumentacja w postaci zestawień tabelarycznych i graficznych (27 tabel i 48 wykresów) została częściowo wprowadzona do omówienia wyników badań, 16 tabel i 7 wykresów szczegółowo dokumentujących wykonane eksperymenty zostało zamieszczonych jako załączniki. Rozprawa zawiera następujące części: Wstęp, Przegląd literatury, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Streszczenie oraz Literatura. Opracowanie charakteryzuje się właściwym układem, proporcja poszczególnych części jest odpowiednia. Połączenie omówienia wyników z ich dyskusją stanowi trzon rozprawy, liczący 117 stron. Wyniki badań własnych zostały przedstawione na tle obszernie przytaczanych danych literatury światowej, stanowiąc uzupełnienie wiedzy w obszarze tematycznym rozprawy i właściwie podsumowując rezultaty eksperymentów. Tekst został dobrze przygotowany pod względem edytorskim, a drobne błędy literowe i stylistyczne, które zaznaczyłam w pracy, nie wpływają na wartość naukową rozprawy.

OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Przegląd literatury jest zwięzły i ściśle dotyczy drożdży rozwijających się w procesie fermentacji spontanicznej i ich roli w kształtowaniu składu win gronowych oraz stanowi właściwe wprowadzenie do badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Drobna uwaga dotyczy rozdziału noszącego tytuł „Charakterystyka badanych odmian winorośli” (2.2., s. 12), składającego się jedynie z tabeli o tym samym tytule i odsyła do załączników internetowych. W mojej opinii, wybór odmian winorośli jest jednym z kluczowych elementów prezentowanych badań i jak Autorka kilkakrotnie podkreśla w rozprawie, ma znaczący wpływ na skład konsorcjum drożdży zasiedlających grona. Celowy i dokonany ze starannością wybór konkretnych odmian świadczy o doskonałej znajomości przedmiotu przez Panią mgr inż. Monikę Cioch, ale wprowadzenie w tym miejscu pracy np. nazw odmian rodzicielskich tych podwójnych lub potrójnych (odmiana Regent) hybryd, czy też nazw odmian uprawianych w cieplejszych regionach i które w praktyce zastępują, znacznie ułatwiłoby zrozumienie takiego wyboru. Uważam, że opis metod identyfikacji mikroorganizmów jest zbyt szczegółowy, tym bardziej, że stosowane techniki są standardowo stosowane w identyfikacji drożdży i ponownie opisane w części metodycznej. Moje wątpliwości budzi też stosowane konsekwentnie w całej rozprawie określenie „drożdżowy” (np. „mikoorganizm drożdżowy” - s.9, „kultur drożdżowych” - s. 25) zamiast po prostu „drożdże”.

Cel i zakres pracy zostały sformułowane właściwie, w pełni wprowadzając w koncepcję pracy doktorskiej. Część metodyczna jasno opisuje dobór materiału do badań i sposób poboru

próbek. Owoce winorośli pochodziły z czterech winnic, z dwóch zbiorów w każdej winnicy (2012 i 2013 lub 2013 i 2014) i należały do 6 mrozoodpornych odmian hybrydowych, najczęściej uprawianych w Polsce (Rondo, Regent, Johanniter, Seyval Blanc, Hiberna, Bianca). Zatem, badania obejmują trzy sezony wegetacyjne, a dobór materiału, liczba próbek i powtórzeń eksperymentów umożliwiają ocenę statystyczną i wskazanie natywnych gatunków drożdży stale bytujących na obszarach upraw winorośli. Wartość pracy podnosi rzetelne dokonanie statystycznej oceny wyników badań.

Pierwsza część pracy to ocena parametrów kinetycznych oraz układu drożdży w procesie fermentacji spontanicznej prowadzonej w skali laboratoryjnej. Jest to obszerny materiał, szczegółowo ilustrujący sukcesję gatunków do wyselekcjonowania się fermentujących drożdży z rodzaju *Saccharomyces*. Badania obejmowały izolację drożdży z powierzchni owoców oraz w 10 kolejnych punktach czasowych fermentacji spontanicznej, izolację czystych kultur oraz identyfikację izolatów. Równocześnie, określano parametry kinetyczne fermentacji oraz profil chemiczny na poszczególnych jej etapach. Analizowano dynamikę zmian czterech podstawowych parametrów: poziom cukru, etanolu, glicerolu, kwasowość ogólną. W uzyskanych winach określano poziom 12 produktów ubocznych fermentacji (wyższe alkohole - alkohole amyłowe, propanol, butanol, izobutanol, 2-fenyletanol; estry - octan etylu, octan izoamylu, octan 2-fenyletylu, kapronian etylu; związki karbonylowe - aldehyd octowy, aceton; metanol) i 5 kwasów organicznych (kwas winowy, jabłkowy, pirogronowy, bursztynowy, mlekowy). Ta szczegółowa charakterystyka fermentacji spontanicznej, oprócz obrazu sukcesji poszczególnych gatunków drożdży, wskazuje kierunek przemian.

Przedstawione badania zostały precyzyjnie udokumentowane w formie wykresów dla poszczególnych wariantów eksperymentu. Mam jednak wątpliwości, co do sposobu przedstawienia skali czasu na wykresach (Rys. 1-18, 26-32, oraz w dalszych częściach pracy Rys. 41-42, 48), gdzie długość odcinka pomiędzy wartościami 0 i 1, 1 i 2, 2 i 3 jest identyczna jak pomiędzy 9 i 13, 13 i 18, 18 i 24. Chociaż zastosowanie tej samej formuły do wszystkich wykresów umożliwia porównanie poszczególnych eksperymentów, to moim zdaniem nie w pełni oddaje rzeczywisty przebieg zmian. Przy określaniu liczebności populacji drożdży, w niektórych eksperymentach podano zawyżoną liczbę komórek na poziomie 11-12 jednostek logarytmicznych w 1 cm³ fermentowanego moszczu (Rys. 1 „Rondo-Zadora”, Rys. 2 „Regent-Zadora”, Rys. 3, Rys. 4 „Seyval Blanc-Zalipie”), przy czym linie trendu wykresów nieco niwelują te wartości. W mojej opinii również sformułowanie na s. 72, dotyczące identyfikacji drożdży *Kloeckera/Hanseniaspora* „na podstawie cech morfologicznych (mikro- i makroskopowo)” jest zbyt dużym skrótem myślowym. Drożdże są organizmami znanymi z wyraźnej odpowiedzi na stres środowiskowy między innymi poprzez zmianę morfologii

komórek i kolonii. Biorąc pod uwagę rozbudowane badania parametrów chemicznych moszczu pod fermentacji spontanicznej, ciekawe byłoby podjęcie próby korelacji zawartości wybranych lotnych związków kształtujących aromat i smak wina z obecnością poszczególnych gatunków drożdży z wykorzystaniem narzędzi statystyki, co z pewnością stanowiłoby wartościowy materiał do publikacji.

Pani mgr inż. Monika Cioch słusznie przyjęła strategię selekcji izolatów drożdży ukierunkowanej na wybór szczepów o najwyższej użyteczności w fermentacji moszczu gronowego, w tym również szczepów wspomagających odkwaszanie środowiska. Wprowadzenie do polskiego przemysłu winiarskiego nowych, starannie wyselekcjonowanych szczepów drożdży pochodzących z fermentacji spontanicznej, może skutkować wytworzeniem wina o specyficznym, unikatowym bukacie i równocześnie zintensyfikować proces odkwaszania biologicznego poprzez wykorzystanie kwasu L-jabłkowego. Wartościowym elementem jest ocena odporności izolatów drożdży na ditlenek siarki. Autorka wykorzystując prostą technikę oznaczania przyrostu biomasy drożdży w obecności SO₂, przy umiejętnej prowadzonej analizie statystycznej, wskazała grupy izolatów drożdży o zbliżonych profilach odpowiedzi na obecność tego związku w różnych stężeniach (w zakresie 50-200 mg/dm³). Ta część badań wydaje się mieć duże znaczenie praktyczne, wskazując zarówno efektywność siarkowania wobec szczepów drożdży natywnych, jak i izolaty/gatunki drożdży wykazujące podwyższoną odporność na ten związek.

Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na niepoprawną nomenklaturę enzymów uczestniczących w przemianach kwasu L-jabłkowego prowadzonych przez drożdże. Umieszczone na stronie 129 zwroty „enzym NADP-jabłkowy” i „enzym jabłkowy (ME)” są kalkami językowymi z języka angielskiego. Prawidłowe nazwy tych enzymów to: dehydrogenaza jabłczanowa zależna od NAD EC 1.1.1.37 (MDH) i dehydrogenaza jabłczanowa dekarboksylująca zależna od NAD(P) EC 1.1.1.38-40 (ME - „enzym jabłczanowy” powszechnie określany w literaturze jako „malic enzyme”). Trudny do akceptacji jest zaproponowany parametryczny sposób oceny jako „procentowy przyrost biomasy komórkowej” (s. 133, Tab. 10), gdzie przyrost biomasy drożdży przedstawiano nawet w dziesiątkach tysięcy procent. Sadzę, że raczej należałoby poprzestać na podaniu OD zawiesiny (w przypadku pomiaru spektrofotometrycznego jak Autorka deklaruje w części metodycznej na stronie 36) lub przy zastosowaniu pomiaru nefelometrycznego (zadeklarowanego w Tab. 10) np. w jednostkach NTU.

W efekcie, Doktorantka zaprezentowała trzy izolaty drożdży: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* i *Pichia anomala*, jako szczepy o potencjalnie najkorzystniejszych cechach enologicznych i poddała ocenie ich przydatność do fermentacji moszczu gronowego w formie monokultur starterowych. Staranna i wyczerpująca ocena

przebiegu procesu fermentacji, wyróżników jakości win oraz profilu związków zapachowych, uzupełniona oceną sensoryczną, pozwoliła na potwierdzenie możliwości stosowania izolatów należących do rodzaju *Saccharomyces* w praktyce winiarskiej. Pani mgr inż. Monika Cioch wskazała również na przydatność natywnego szczepu *Pichia anomala*, jako potencjalnego składnika populacji mieszanej kultury starterowej, wprowadzanego w celu wzbogacenia win w związki lotne.

Uważam, że wyniki badań zostały opisane wystarczająco, a bogaty materiał ilustracyjny znacznie ułatwia analizę danych doświadczalnych. Na podkreślenie zasługuje przejrzystość opisu, co przy tak rozbudowanej analitycznej pracy nie jest łatwe. Zwięzłe podsumowanie uwypukla nowatorskie dla polskiego winiarstwa aspekty pracy. Wnioski zostały sformułowane logicznie i prawidłowo, w oparciu o dane eksperymentalne.

Pracę uzupełnia zestawienie 189 pozycji bibliografii, obejmujących zarówno pozycje sztandarowe dla omawianego tematu, jak i najnowsze doniesienia naukowe. Niemal jedną piątą piśmiennictwa stanowią pozycje pochodzące z ostatnich pięciu lat, a 60% to artykuły datowane od roku 2005. Spis literatury został przygotowany starannie, bez istotnych uchybień.

KONKLUZJE RECENZJI

Podsumowując, stwierdzam że cele pracy zostały w pełni zrealizowane, a założenia i tezy badawcze zweryfikowane w toku badań. Najważniejszymi osiągnięciami badawczymi pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Cioch jest charakterystyka konsorcjów natywnych drożdży selekcyjnych się w procesie spontanicznej fermentacji moszczy gronowych pozyskanych z odmian winorośli uprawianych na Podkarpaciu i w Małopolsce, oraz ocena ich roli w tworzeniu komponentów bukietu i aromatu win, co poszerza dotychczasową wiedzę w obszarze badań nad drożdżami winiarskimi. Podkreślam walor aplikacyjny badań, których wymiernym rezultatem są wyselekcjonowane szczepy drożdży o zweryfikowanej w warunkach laboratoryjnych przydatności enologicznej. Zamieszczone w tekście recenzji moje uwagi i sugestie, nie umniejszają wartości pracy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Cioch.

Stwierdzam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa Pani mgr inż. Moniki Cioch spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Moniki Cioch do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Aleksy Szymiński