

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa

mgr inż. Kamila Pachnowska

Rozprawa doktorska

**Jakość owoców winorośli w zależności od rodzaju
podkładki i cięcia roślin oraz ocena wybranych metod
stabilizacji mikrobiologicznej moszczu**

The quality of grapes depending on rootstock and pruning
with an evaluation of chosen microbiological stabilisation
methods of must

Promotor
dr hab. inż. Ireneusz Ochmian, prof. ZUT
Katedra Ogrodnictwa

Promotor pomocniczy
dr hab. inż. Beata Zielińska
Katedra Fizykochemii Nanomateriałów

Szczecin 2019

Serdecznie dziękuję

Panu Prof. ZUT dr hab. inż. Ireneuszowi Ochmianowi

*za wieloletnią współpracę i całą przekazaną mi przez te lata wiedzę
oraz zaangażowanie w realizację pracy doktorskiej i zaufanie,*

Pani dr hab. inż. Beacie Zielińskiej

za opiekę merytoryczną, cenne uwagi i sugestie oraz wszelką pomoc.

Pragnę wyrazić głęboką wdzięczność

Prof. dr hab. Ewie Mijowskiej

Prof. dr hab. inż. Sylwii Mozi

Prof. dr hab. Janowi Oszmiańskiemu

Dr hab. inż. Pawłowi Nawrotkowi

Dr inż. Krzysztofowi Cendrowskiemu

Mgr inż. Adrianowi Augustyniakowi

Mgr inż. Bartłomiejowi Grygorcewiczowi

za współpracę i możliwość zdobywania doświadczenia.

Ponadto dziękuję

Dr inż. Dominice Darownej

Dr inż. Kacprowi Szymańskiemu

Mgr inż. Arlecie Kruczek

za pomoc przy realizacji badań i miłą atmosferę pracy.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	4
ABSTRACT	5
DOROBEK NAUKOWY STANOWIĄCY ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ	6
1. Wstęp teoretyczny	7
2. Cel pracy	10
3. Materiał i metody badań	11
4. Omówienie wyników badań	15
5. Wnioski	24
6. Literatura	26
KOPIE ARTYKUŁÓW STANOWIĄCYCH JEDNOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI I OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW	30

STRESZCZENIE

Celem naukowym pracy doktorskiej była ocena wpływu podkładek i zabiegów cięcia na jakość winogron odmiany 'Regent' oraz analiza skuteczności dwóch metod w ograniczaniu żywotności mikroorganizmów po fermentacji moszczu gronowego. Badania wykonano w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania uprawą winorośli w Polsce. Brak wieloletniej tradycji skłania do poszukiwania odpowiednich metod zarządzania winnicą dostosowanych do warunków klimatycznych. Jest to niezbędne dla uzyskania plonu wysokiej jakości. W Katedrze Ogrodnictwa przeprowadzono niezależne doświadczenia polowe, w których oceniono wpływ pięciu podkładek, usuwania liści w obrębie gron oraz intensywności cięcia łoży, na jakość owoców. Winogrona przebadano pod kątem parametrów: masy gron i jagód, ekstraktu, kwasowości miareczkowanej, pH, polifenoli, składników mineralnych i metali ciężkich. Podkładka 'Sori' wpłynęła na wzrost poziomu polifenoli w owocach i wyróżniała się wysokim poborem Ca, K, Mg, N, i P. Podkładka 'Börner' obniżyła zawartości kwasów fenolowych i flawan-3-oli w winogronach oraz ograniczyła pobór miedzi, żelaza, kadmu i ołowiu. Usuwanie liści i cięcie łoży na 8 pąków zwiększyły poziom polifenoli w jagodach. Owoce z roślin intensywniej ciętych (4-6 pąków) cechowały wyższe zawartości większości składników mineralnych i metali ciężkich. Podsumowując, połączenie badanych metod zarządzania winnicą może służyć zoptymalizowaniu uprawy winorośli odmiany 'Regent' w warunkach klimatycznych północno-zachodniej części Polski.

Opracowanie metody zdolnej ograniczyć lub wyeliminować stosowanie SO₂, jako środka konserwującego wino, budzi zainteresowanie naukowców i producentów na całym świecie. Metody stabilizacji mikrobiologicznej przebadano w Katedrze Fizykochemii Nanomateriałów. Do ograniczania żywotności drożdży i bakterii zastosowano promieniowanie UV-C i nanomateriały. Następnie wykonano testy mikrobiologiczne i analizy zawartości polifenoli. Wraz ze wzrostem czasu ekspozycji UV-C spadała żywotność mikroorganizmów (około 99% po 60 minutach procesu) i poziom polifenoli w moszczu gronowym, jednak bez wpływu na jego obserwowalną barwę. Natomiast nanosfery krzemionki istotnie ograniczyły żywotność bakterii *Oenococcus oeni* pod wpływem mieszania we wzorcowych roztworach cukru i soli fizjologicznej PBS. Analizowane metody ograniczania żywotności mikroorganizmów stanowią obiecujące podejście w kontroli mikrobiologicznej wina. Niezbędne są jednak dalsze badania obejmujące połączenie różnych technologii w celu zastąpienia SO₂ w produkcji wina.

ABSTRACT

The scientific aim of the doctoral dissertation was to evaluate the influence of rootstocks and pruning methods on the quality of grapes cultivar 'Regent', and to analyse the efficiency of two methods in reducing the viability of microorganisms after fermentation in grape must. The research was carried out at the West Pomeranian University of Technology in Szczecin.

In recent years, there has been a growing interest in viticulture in Poland. Lack of long-standing tradition is moving towards the search to find appropriate viticulture management practices adjusted to climatic conditions. It is crucial to obtain a high quality crop. Independent field experiments were carried out at the Department of Horticulture, which assessed the impact of five rootstocks, cluster zone leaf removal, and cane pruning intensity on the quality of fruits. The grapes were tested for the following parameters: weights of grapes and berries, total soluble solids, titratable acidity, pH, polyphenols, nutrients, and heavy metals. The 'Sori' rootstock contributed to the increase of polyphenols in the fruits and was distinguished by a high uptake of Ca, K, Mg, N, and P. The 'Börner' rootstock decreased the contents of phenolic acids and flavan-3-ols in the grapes, and reduced the uptake of copper, iron, cadmium, and lead. Leaf removal and pruning to 8 buds per cane increased polyphenols in berries. Fruits from more intensely pruned vines (4-6 buds) were characterised by higher contents of most nutrients and heavy metals. To sum up, the combination of the studied vineyard management methods may serve to optimise the viticulture of cultivar 'Regent' in climatic conditions of North-Western Poland.

The development of a method capable of reducing or eliminating the use of SO₂ as a wine preservative is of interest to scientists and producers around the world. Microbiological stabilisation methods were tested at the Nanomaterials Physicochemistry Department. UV-C radiation and nanomaterials were used to limit the viability of yeasts and bacteria. Afterwards, microbiological tests and polyphenol content analyses were performed. With the increase of the UV-C exposure time, the microorganism viability (about 99% after 60 minutes of the process) and the level of polyphenols in grape must decreased, but no visible changes in the must colour were noted. Whereas the silica nanospheres significantly reduced the viability of *Oenococcus oeni* bacteria under stirring in the model solutions of sugar and phosphate buffered saline (PBS). The analysed methods of reducing the microorganism viability are a promising approach in the microbiological control of wine. However, it is necessary to continue further research involving a combination of different technologies towards replacement of SO₂ in wine production.

DOROBEK NAUKOWY STANOWIĄCY ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Jakość owoców winorośli w zależności od rodzaju podkładki i cięcia roślin oraz ocena wybranych metod stabilizacji mikrobiologicznej moszczu

Lp.	Tytuł publikacji	Pkt.*	IF**
P1	Mijowska K. , Ochmian I., Oszmiański J. (2017). Rootstock effects on polyphenol content in grapes of ‘Regent’ cultivated under cool climate condition. <i>Journal of Applied Botany and Food Quality</i> , 90, 159-164, DOI:10.5073/JABFQ.2017.090.020.	20	1,115
P2	Pachnowska K. , Ochmian I. (2018). Influence of rootstock on nutrients and heavy metals in leaves and berries of the vine cultivar ‘Regent’ grown in North-Western Poland. <i>Journal of Applied Botany and Food Quality</i> , 91, 180 - 186, DOI:10.5073/JABFQ.2018.091.024.	20	1,115
P3	Mijowska K. , Ochmian I., Oszmiański J. (2016). Impact of Cluster Zone Leaf Removal on Grapes cv. Regent Polyphenol Content by the UPLC-PDA/MS Method. <i>Molecules</i> , 21(12), 1688. DOI:10.3390/molecules21121688.	30	2,861
P4	Pachnowska K. , Ochmian I. (2018). Cane pruning intensity of vine as a substantial factor influencing physico-chemical attributes of berries cultivar ‘Regent’. <i>Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica</i> . 343(47)3, 43-54. DOI: 10.21005/AAPZ2018.47.3.04.	10	-
P5	Mijowska K. , Cendrowski K., Grygorcewicz B., Oszmiański J., Nawrotek P., Ochmian I., Zielińska B. (2017). Preliminary study on the influence of UV-C irradiation on microorganism viability and polyphenol compounds content during winemaking of ‘Regent’ red grape cultivar. <i>Polish Journal of Chemical Technology</i> , 19(2), 130-137, DOI: 10.1515/pjct-2017-0039.	15	0,550
Suma		95	5,641
Lp.	Patent na wynalazek nr 418179		
P6	Nazwa wynalazku: Sposób ograniczania żywotności bakterii <i>Oenococcus oeni</i> Cendrowski K. (25%), Mijowska E. (10%), Mijowska K. (20%), Ochmian I. (10%), Zielińska B. (5%), Grygorcewicz B. (20%), Nawrotek P (10%).		

*Liczba punktów według listy MNiSW zgodna z rokiem ukazania się pracy

**Sumaryczny Impact Factor (IF) według bazy Journal Citation Reports (JCR) z roku wydania

1. Wstęp teoretyczny

Według raportu statystycznego OIV (The International Organisation of Vine and Wine) z 2017 roku, wielkość zbiorów winogron od 2000 roku wykazała tendencję wzrostową osiągając około 77 milionów ton rocznie na całym świecie. 36% tych zbiorów przeznaczono na świeżą konsumpcję, a 47% na produkcję wina¹. Podobny trend odnotowano w Polsce w ciągu ostatniej dekady. Zarejestrowana powierzchnia upraw winorośli w tym okresie zwiększyła się niemal dziesięciokrotnie do wielkości 331 ha. Areal sięgający blisko 241 ha dedykowany był uprawie owoców do wyrobu wina².

Winogrona wysokiej jakości są bardzo pożądane przez konsumentów, którzy cenią sobie rolę owoców w utrzymaniu i poprawie dobrego stanu zdrowia³. W przypadku winogron przeznaczanych na przetwórstwo, ocena jakości owoców ograniczana jest w wielu winnicach jedynie do zawartości cukrów, pH i kwasowości miareczkowanej. System ten jest jednak zbyt prosty i nie pozwala na ustanowienie jasnego i rygorystycznego połączenia z końcową jakością wina⁴. Tymczasem, na uwagę zasługują tu także związki fenolowe i składniki mineralne, które mają duże znaczenie dla jakości winogron i procesu przetwórstwa. Owoce winorośli są bogatym źródłem związków fenolowych, które posiadają m.in. cenne właściwości przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwzapalne⁵. Ponadto, wywierają istotny wpływ na właściwości organoleptyczne oraz potencjał starzenia się i stabilność wina. Głównymi klasami związków fenolowych w winogronach i winie są kwasy fenolowe, stylbeny i flawonoidy (antocyjany, flawonole, monomery flawan-3-oli i proantocyjanidyny)⁶. Natomiast wśród składników odżywczych niezbędnych dla wzrostu winorośli, N, P, K, Ca, Mg i S są zwykle klasyfikowane jako makroelementy, a Cl, B, Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Ni, jako mikroelementy⁷. Poniżej wspomniane zostały jedynie przykładowe symptomy nadmiaru lub niedoboru niektórych składników mineralnych. Niedobór azotu w roślinie może być przyczyną zbyt luźnych gron z małymi jagodami⁸. Ponadto, sok gronowy o niskiej zawartości azotu jest często podatny na spowolnienie lub zatrzymanie fermentacji⁷. Znaczenie potasu dla wzrostu winorośli i plonu jest również istotne. Jednak jego nadmiar w winogronach może mieć negatywny wpływ na jakość wina, głównie dlatego że zmniejsza zawartość wolnego kwasu winowego, co powoduje wzrost pH soku i wina⁹. Niedobory wapnia i magnezu mogą skutkować m.in. usychaniem gron⁸.

Jak powszechnie wiadomo na jakość winogron wpływa wiele czynników. Należą do nich warunki środowiskowe, m.in. światło słoneczne i temperatura¹⁰ oraz metody zarządzania uprawą winorośli, np. kombinacja podkładka/odmiana¹¹, forma prowadze-

nia winorośli, nawadnianie¹², nawożenie¹³, usuwanie liści¹⁴, czy intensywność przycinania roślin¹⁵.

W niniejszej rozprawie doktorskiej badano wpływ podkładek i zabiegów cięcia (usuwanie liści, intensywność cięcia łoży) na jakość owoców winorośli odmiany 'Regent'.

Podkładka stanowi głównie system korzeniowy na którym szczepi się właściwą odmianę¹⁶. Stosowanie podkładek rozpoczęto w Europie pod koniec XIX wieku w celu ochrony plantacji przed filokserą (*Viteus vitifolii*, *Daktulosphaira vitifoliae*), uznawaną za jednego z najgroźniejszych szkodników uprawy winorośli¹⁷. Do dziś szczepienie jest techniką powszechnie stosowaną w uprawie winorośli jako skuteczne narzędzie do zwalczania chorób przenoszonych przez glebę i przewycięzania stresów abiotycznych¹⁸. Informacje na temat biochemicznych interakcji między odmianami i podkładkami są ograniczone. Pomimo to, wiele badań dowiodło wpływu różnych podkładek na jakość winogron, soku winogronowego i wina¹⁸, oddziałując między innymi na zawartości cukrów¹⁹, kwasów²⁰, czy związków fenolowych²¹. Ponadto, podkładki mogą wpływać na wiele innych aspektów rozwoju winorośli, takich jak wzrost i plonowanie roślin²²⁻²⁴.

Usuwanie liści zwiększa ekspozycję gron na światło słoneczne, cyrkulację powietrza i temperaturę jagód. Niedostateczna ilość światła może powodować słabą jakość winogron, natomiast nadmierna prowadzić do oparzeń słonecznych i zahamowania rozwoju barwy²⁵. Ponadto, temperatura wpływa na tempo rozwoju i utratę różnych związków biochemicznych w owocach, w tym na akumulację cukrów, obniżanie kwasów oraz syntezę i utrzymanie barwników i związków aromatycznych²⁶. W związku z powyższym, uzyskanie plonu wysokiej jakości wiąże się z określeniem optymalnych technik usuwania liści, z uwzględnieniem wpływu warunków klimatycznych²⁵.

Pomimo że cięcie winorośli jest szeroko przebadanym etapem technologicznym, zabieg ten może być zoptymalizowany dla każdej odmiany w zależności od przeznaczenia produkcji, warunków środowiskowych i metod zarządzania winnicą²⁷. Zatem niemożliwe jest ustanowienie ogólnych zaleceń dotyczących intensywności przycinania winorośli^{28,29}. Przykładami odzwierciedlającymi znaczenie tego zabiegu dla jakości owoców mogą być uprawy w tradycyjnych regionach winiarskich Francji. Powszechnie winorośl prowadzona jest tam w systemie pojedynczego sznura Guyot z pozostawieniem od 6 do 8 pąków na łożu. Ich definitywna liczba zależy jednak od tradycji regionalnych i przepisów prawnych dla poszczególnych apelacji, m.in.: odmiana 'Syrah' uprawiana w Côtes du Rhône może być przycinana na 8 pąków, natomiast maksymalna

liczba pąków dla odmiany ‘Sémillon’ w Bordeaux nie może przekroczyć 7, zaś 6 dla ‘Muscadelle’ w Sauternes³⁰.

Dzisiejsze techniki produkcji wina są zasadniczo takie same, jak te używane przez starożytne cywilizacje³¹. Ditlenek siarki (SO_2) i wiele form nieorganicznych siarczynów służą ochronie przed utlenianiem i wzrostem niepożądanych gatunków drożdży i bakterii oraz kontroli reakcji enzymatycznych³². Pomimo tych zalet, okazało się że siarczyny mogą wywoływać reakcje alergiczne, takie jak nudności, ból żołądka, biegunka, szok anafilaktyczny, pokrzywka, napady astmy czy obrzęk naczynioruchowy, a u niektórych konsumentów nawet śmierć³³. Niepożądane reakcje alergiczne, a w konsekwencji, zastrzające się przepisy prawne regulujące maksymalne stężenie SO_2 w winie, przyciągnęły zainteresowanie naukowców i przemysłu winiarskiego do poszukiwania nowych metod, które mogłyby ograniczyć lub wyeliminować stosowanie tego konserwantu bez znacznej zmiany jakości wina^{33,34}. Wymiana lub redukcja dodatku SO_2 powinna być dokonywana metodami, które mogą zapewnić bezpieczeństwo mikrobiologiczne, jednocześnie chroniąc wino przed utlenianiem i zachowując, w jak największym stopniu, jego właściwości organoleptyczne³⁴. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że skuteczne w kontrolowaniu wzrostu mikroorganizmów są techniki, takie jak klarowanie czy filtracja. Metody te mają jednak negatywny wpływ na właściwości organoleptyczne wina³⁵. Wśród innych przykładów proponowanych jako środki zamienne dla ditlenku siarki można wymienić: (1) stosowanie dodatków, takich jak diwęglan dimetylu, bakteriocyny, związki fenolowe, czy lizozym; oraz (2) metody fizyczne, do których należą pulsacyjne pole elektryczne, ultradźwięki, promieniowanie ultrafioletowe, wysokie ciśnienie. Przedstawione metodologie nie są szkodliwe dla zdrowia i prezentują obiecujące właściwości, które pozwalają uznać je za alternatywne metody konserwacji wina w zastępstwie SO_2 ³⁴. Ponadto, w ostatnim czasie przeprowadzono także badania nad zastosowaniem nanocząstek srebra w technologii produkcji wina z uwagi na ich szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Według García-Ruiz i współpracowników³⁶ oraz Gil-Sánchez i współpracowników³⁷ materiały te mogą stanowić dobrze rokujące podejście w redukcji SO_2 w winie.

Pomimo obiecujących rezultatów, działanie konserwujące SO_2 jest dość rozległe i jak dotąd żadna opisywana metodologia nie może w sposób niezależny zastąpić jego stosowania. Wyzwaniem dla społeczności akademickiej i branży winiarskiej jest zatem połączenie ww. lub innych, nowych metod w celu pełnego zastąpienia SO_2 i produkcji zdrowszych win spełniających współczesne wymagania konsumentów³⁴.

2. Cel pracy

Cele naukowe stawiane w niniejszej pracy doktorskiej pt. „Jakość owoców winorośli w zależności od rodzaju podkładki i cięcia roślin oraz ocena wybranych metod stabilizacji mikrobiologicznej moszczu” to:

- 1) Badanie wpływu pięciu podkładek (‘Couderc 161-49’, ‘Sori’, ‘Kober 125AA’, ‘Börner’, ‘Kober 5BB’) na zawartości polifenoli, w tym antocyjanów, kwasów fenolowych, flawonoli i flawan-3-oli w winogronach oraz składników mineralnych i metali ciężkich w owocach i liściach winorośli odmiany ‘Regent’
- 2) Ocena roli usuwania liści w obrębie gron w różnych etapach rozwoju winorośli dla zawartości podstawowych parametrów jakości i kształtowania się polifenoli w winogronach ‘Regent’, ze szczegółową analizą związków należących do antocyjanów, kwasów fenolowych, flawonoli i flawan-3-oli
- 3) Analiza wpływu intensywności cięcia łoży na podstawowe parametry jakości, ogólny poziom polifenoli oraz zawartości składników mineralnych i metali ciężkich w owocach odmiany ‘Regent’
- 4) Badanie skuteczności dwóch metod, promieniowania UV-C i nanomateriałów, w ograniczaniu żywotności drożdży i bakterii po fermentacji moszczu odmiany ‘Regent’

Cele praktyczne stawiane w pracy doktorskiej to:

- 1) Zoptymalizowanie uprawy winorośli odmiany ‘Regent’ w kontekście poprawy jakości owoców w klimacie północno-zachodniej części Polski
- 2) Wypracowanie metody ograniczającej żywotność mikroorganizmów umożliwiającą obniżenie lub wyeliminowanie stosowania ditlenku siarki w technologii produkcji wina

Hipoteza badawcza: Właściwy dobór podkładki i zabiegów cięcia pozwoli na zoptymalizowanie uprawy winorośli odmiany ‘Regent’ w chłodnym klimacie północno-zachodniej części Polski, umożliwiając produkcję owoców wysokiej jakości. Stosowna ocena badanych metod stabilizacji mikrobiologicznej moszczu winogronowego umożliwi wyeliminowanie z przetwórstwa owoców winorośli powszechnie stosowanych środków konserwujących opartych na ditlenku siarki.

3. Materiał i metody badań

Doświadczenia polowe nad uprawą winorośli przeprowadzono w stacji badawczej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Przedmiotem badań była niemiecka, ciemnoskóra odmiana winorośli ‘Regent’, opracowana w 1967 roku. Duży przełom w hodowli odpornych winorośli został osiągnięty, gdy odmiany ‘Regent’ i ‘Phoenix’ zostały zakwalifikowane do produkcji wina wysokiej jakości. Obie były pierwszymi odmianami akceptowanymi przez producentów ze względu na ich wysoką jakość i dobrą odporność. Według danych z 2013 roku opracowanych przez Deutsches Weininstitut GmbH, 12% szacowanych upraw w Niemczech stanowiły nowe odmiany czerwone, wśród których ‘Regent’ uplasował się na drugiej pozycji za odmianą ‘Dornfelder’³⁸. Ponadto odmiana ‘Regent’ jest przedmiotem badań naukowych m.in. w Słowenii³⁹⁻⁴¹, Chorwacji⁴², Bułgarii⁴³, a także w chłodnym klimacie Polski⁴⁴ i Danii⁴⁵.

Wpływ podkładek na zawartości polifenoli w winogronach (**P1**) oraz składników mineralnych i metali ciężkich w owocach i liściach (**P2**), porównano z próbą kontrolną (winorośl nieszczepiona ‘Regent’). **Podkłádki ‘Couderc 161-49’, ‘Sori’, ‘Kober 125AA’, ‘Börner’ i ‘Kober 5BB’**, które zostały objęte planem badań, są zarejestrowane i hodowane w Niemczech³⁸. Większość z nich jest w dalszym ciągu obiektem badań naukowców^{39-41,46,47}.

Metodę usuwania liści analizowano pod kątem wpływu na podstawowe parametry jakości winogron i poziom polifenoli w owocach (**P3**). Zabieg przeprowadzono ręcznie w strefie gron eliminując cztery do sześciu liści ze wszystkich pędów. W efekcie otrzymano około 30-40 centymetrów wolnej przestrzeni bez liści.

Usuwanie liści wykonano w trzech kolejnych etapach rozwoju winorośli:

- przed kwitnieniem (pre-flowering – PF),
 - w początkowym stadium formowania się jagód (berry-set – BS),
 - w momencie rozpoczęcia przebarwiania się owoców (véraison – VE),
- natomiast jedna czwarta eksperymentalnych winorośli nie została poddana zabiegowi i posłużyła za kontrolę.

Winorośl prowadzoną w systemie pojedynczego sznura Guyot poddano **zróżnicowanej intensywności cięcia łoży z ograniczeniem do 4, 6 lub 8 pąków latoroślowych (P4)**. Winogrona przeanalizowano pod kątem podstawowych parametrów jakości, polifenoli, składników mineralnych i metali ciężkich.

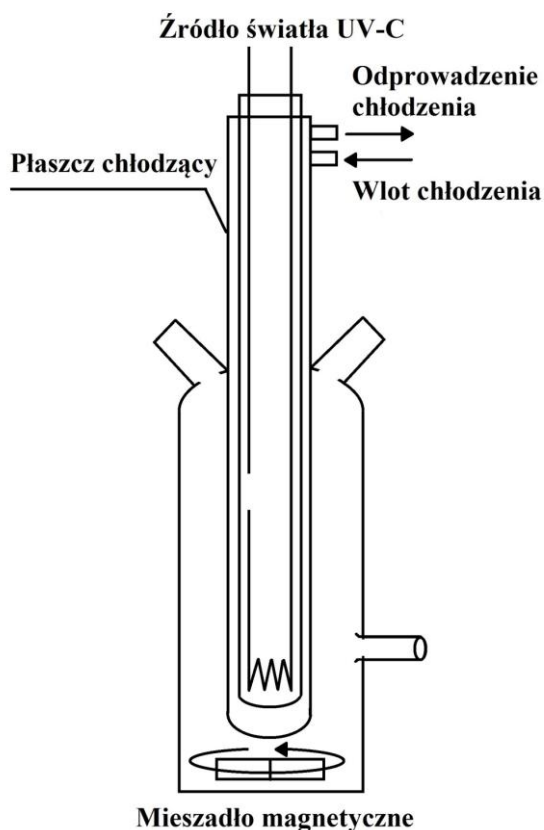
Analizy właściwości fizycznych i chemicznych winogron

- Podstawowe parametry jakości:
 - masy gron i 100 owoców określono za pomocą wagi elektronicznej z dokładnością do 0,1 g,
 - zawartość ekstraktu cukrowego zmierzono przy użyciu refraktometru elektronicznego,
 - kwasowość miareczkowlana oznaczono przez miareczkowanie ekstraktu wodnego soku z 0,1 N NaOH do punktu końcowego pH 8,1,
 - pH soku zbadano potencjometrycznie pehametrem elektronicznym.
- Poziom polifenoli, w tym związków należących do antocyjanów, kwasów fenolowych, flawonoli i flawan-3-oli (flawanoli), oznaczono przy pomocy ultrawydajnej chromatografii cieczowej skojarzonej z detektorem fotodiodowym oraz spektrometrią mas (UPLC-PDA/MS).
- Zawartości składników mineralnych (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, P, Zn) i metali ciężkich (Cd, Pb) oznaczono następującymi metodami:
 - azot został określony metodą Kjeldahla,
 - poziom potasu zmierzono za pomocą emisyjnej spektrometrii atomowej,
 - zawartości Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb i Zn oznaczono metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej,
 - fosfor oznaczono metodą kolorymetryczną na spektrofotometrze.

Badania dotyczące stabilizacji mikrobiologicznej przeprowadzono w Katedrze Fizykochemii Nanomateriałów Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. W doświadczeniach wykorzystano moszcz gronowy odmiany 'Regent' i roztwory wzorcowe.

Proces ograniczania żywotności mikroorganizmów przy pomocy światła UV-C przeprowadzono w reaktorze z wewnętrznym źródłem promieniowania, wyposażonym w niskociśnieniową lampę rtęciową o mocy 15 W i długości fali 254 nm (**P5**). W celu uwzględnienia różnych właściwości cieczy (m.in. zmętnienie i zabarwienie) naświetlano ciemny moszcz odmiany 'Regent' i przezroczysty roztwór fizjologiczny NaCl, które zaszczerpiono tymi samymi mikroorganizmami. W trakcie ekspozycji UV-C materiał badawczy mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego. Próbkę do analiz pobierano w regularnych odstępach czasu (0, 60, 120 i 180 minut) podczas każdego procesu. Materiał pobrany przed naświetlaniem (0 minut) służył za kontrolę. Skuteczność metody

oceniono przy pomocy testów mikrobiologicznych. Dodatkowo, w moszczu gronowym przeprowadzono analizy poziomu polifenoli.

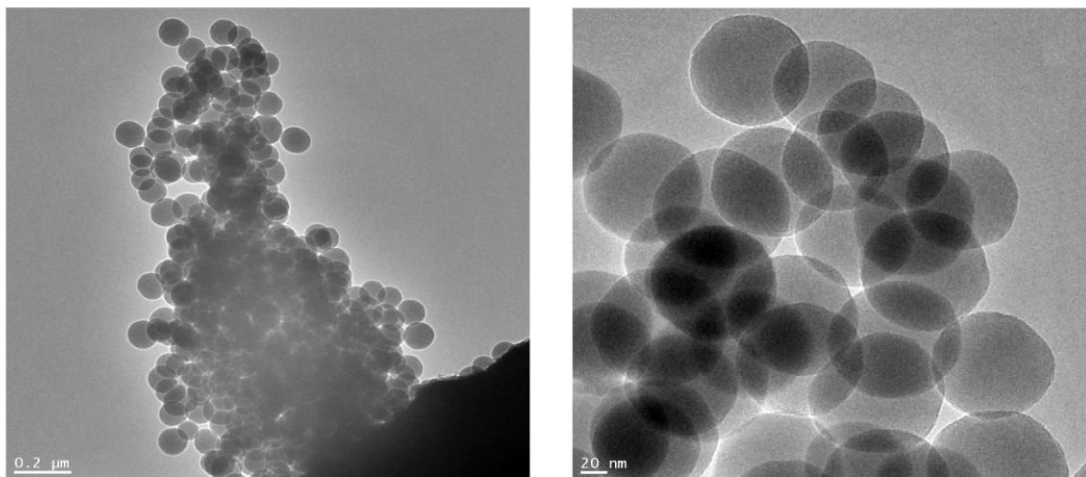


Ryc. 1. Reaktor z wewnętrznym źródłem promieniowania UV-C wyposażony w niskociśnieniową lampę rtęciową o mocy 15 W (254 nm).

Wśród metod stabilizacji mikrobiologicznej zbadano wpływ nanosfer krzemionki na żywotność bakterii kwasu mlekowego *Oenococcus oeni* (P6). Doświadczenie przeprowadzono we wzorcowych roztworach cukru i zbuforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) podczas mechanizmu mieszania na mieszadle magnetycznym. Zastosowano cztery stężenia nanomateriałów: $0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Materiał do analiz pobierano w regularnych odstępach czasu (0, 15, 30, 45, 60, 75 i 90 minut). Roztwory bez dodatku nanosfer krzemionki ($0 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) i próbki pobrane przed procesem (0 minut) stanowiły punkt odniesienia (kontrolę) dla pozostałych stężeń nanomateriałów i punktów czasowych. Ocenę skuteczności metody sprawdzono przy pomocy testów mikrobiologicznych oraz mikroskopii elektronowej skaningowej (SEM) i transmisyjnej (TEM).

Syntezę nanosfer krzemionki wykonano w następujących etapach:

- wymieszano ortokrzemian tetraetylu (TEOS) i etanolu (EtOH),
- dodano wodę amoniakalną ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), po czym otrzymaną mieszaninę mieszano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej,
- powstałą zawiesinę destylowano w celu oddzielenia stałych nanosfer krzemionki.



Ryc. 2. Zdjęcia TEM nanosfer krzemionki (K. Cendrowski).

Testy mikrobiologiczne

- Testy mikrobiologiczne wykonano przy pomocy oznaczeń ilościowych metodą pośrednią na podłoża: MRS z dodatkiem cykloheksymidu dla bakterii *Oenococcus oeni* oraz Sabouraud z dodatkiem chloramfenikolu dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

Analizy chemiczne moszczu winogronowego

- Poziom polifenoli, w tym antocyjanów, kwasów hydroksycynamonowych i ich pochodnych, kwasu galusowego, flawonoli oraz flawan-3-oli, oznaczono przy pomocy ultrawydajnej chromatografii ciekowej skojarzonej z detektorem fotodiodowym oraz spektrometrią mas (UPLC-PDA/MS).

Ocena materiału pod mikroskopem

- Mikroskopia elektronowa skaningowa (SEM) przy użyciu mikroskopu Tescan, VEGA 3SBU.
- Mikroskopia elektronowa transmisyjna (TEM) przy użyciu mikroskopu FEI, Tecnai G2F20 S Twin.

4. Omówienie wyników badań

Rozprawa doktorska składa się z cyklu publikacji spójnych tematycznie opublikowanych w czasopismach z listy MNiSW (P1-P5) oraz patentu na wynalazek nr 418179 (P6). Praca opisuje wpływ wybranych metod zarządzania winnicą na jakość owoców winorośli odmiany 'Regent' oraz wpływ metod stabilizacji mikrobiologicznej na żywotność mikroorganizmów i jakość moszczu winogronowego 'Regent'.

P1. Rootstock effects on polyphenol content in grapes of 'Regent' cultivated under cool climate condition

Podkładka stanowi głównie system korzeniowy winorośli, na którym szczepiona jest wybrana odmiana. Stosowana dotychczas jako najskuteczniejsza metoda w ochronie przed filokserą, może mieć także znaczący wpływ na wzrost roślin i jakość winogron. Wydajność podkładki w dużym stopniu zależy od jej interakcji z zaszczepioną odmianą i wpływu środowiska. W związku z tym czynniki te powinny być brane pod uwagę przy doborze podkładek. Ponadto, wyniki uzyskane przy użyciu konkretnej kombinacji w jednym środowisku nie mogą być natychmiast ekstrapolowane na inne warunki. Zatem istotne jest kontynuowanie badań nad wpływem podkładki na wzrost winorośli i jakość owoców w różnych regionach uprawy.

Winogrona są bogate w związki fenolowe, co czyni je ważnym źródłem tych substancji w diecie człowieka, przede wszystkim z uwagi na silne właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe i przeciwbakteryjne.

Praca miała na celu porównanie zawartości polifenoli w owocach winorośli odmiany 'Regent' zaszczepionych na pięciu podkładkach: 'Couderc 161-49', 'Sori', 'Kober 125AA', 'Börner', 'Kober 5BB'. Winogrona zebrane z nieszczepionych roślin odmiany 'Regent' stanowiły próbę kontrolną.

W owocach zidentyfikowano 33 związki należące do antocyjanów, kwasów fenolowych, flawonoli i flawan-3-oli (flawanoli). Wykazano istotny wpływ podkładek na poziom polifenoli w winogronach. Najwyższe zawartości tych związków stwierdzono w owocach zebranych z winorośli zaszczepionych na podkładkach 'Sori' ($675 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ ś.m.}$) i 'Kober 125AA' ($643 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ ś.m.}$). Winogrona z podkładek 'Börner' ($554 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ ś.m.}$) i 'Kober 5BB' ($561 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ ś.m.}$) cechowały niższe zawartości polifenoli, porównywalne z próbą kontrolną ($588 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ ś.m.}$). Podobne zależności w kształtowaniu się polifenoli w owocach zaobserwowano we wszystkich latach badań.

Głównym źródłem czerwonej barwy wina są antocyjany. Pomimo że występują obficie w winach czerwonych, ich bezpośredni wpływ na smak jest niewielki. W doświadczeniu antocyjany miały znaczący udział ilościowy w oznaczonych związkach – około 60-64%. Analogicznie do ogólnego poziomu polifenoli, najwyższe stężenia antocyjanów odnotowano w owocach z roślin zaszczerpionych na podkładkach ‘Sori’ (423 mg·100 g⁻¹ ś.m.) i ‘Kober 125AA’ (400 mg·100 g⁻¹ ś.m.). Natomiast najniższą zawartość związków z tej grupy zaobserwowano w próbie kontrolnej (350 mg·100 g⁻¹ ś.m.), w porównaniu do której wpływ pozostałych podkładek był nieistotny.

Podkładki ‘Sori’ i ‘Kober 125AA’ sprzyjały także większej akumulacji flawonoli i flawan-3-oli w winogronach. Wysoki poziom flawanoli stwierdzono również w owocach zebranych z roślin nieszczerpionych. Tymczasem, w przypadku pozostałych podkładek był on istotnie niższy. Flawan-3-ole to grupa związków o dużym znaczeniu dla smaku wina. Ich poziom był w znacznym stopniu zróżnicowany pod wpływem badanego czynnika, zatem może służyć regulacji cierpkości wina.

Zawartość kwasów fenolowych w owocach była podobna w przypadkach próby kontrolnej oraz podkładek z grupy ‘Kober’ i podkładki ‘Couderc 161-49’. Podkładki ‘Sori’ i ‘Börner’ istotnie zmniejszyły ich stężenie (kolejno 7,90 i 6,63 mg·100 g⁻¹ ś.m.).

P2. Influence of rootstock on nutrients and heavy metals in leaves and berries of the vine cultivar ‘Regent’ grown in North-Western Poland

W winogronach znajduje się wiele pierwiastków mineralnych, a ich stężenie w większości przypadków odzwierciedla m.in. charakterystykę poboru podkładki. Translokacja i rozmieszczenie składników odżywczych mogą różnić się między podkładkami. Różnice występujące w tych mechanizmach można przypisać genotypowi podkładki, który daje zróżnicowaną zdolność absorpcji lub tendencję dla określonych minerałów.

Celem pracy była ocena wpływu pięciu podkładek (‘Couderc 161-49’, ‘Sori’, ‘Kober 125AA’, ‘Börner’, ‘Kober 5BB’) na zawartości składników mineralnych i metali ciężkich w owocach i liściach winorośli ‘Regent’, w odniesieniu do kontroli (korzeń ‘Regent’, winorośl nieszczerpiona). Materiał roślinny przeanalizowano pod kątem zawartości Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, P, Pb i Zn.

Niezależnie od zastosowanej podkładki, w poszczególnych latach doświadczenia stwierdzono różnice w poziomach niektórych składników mineralnych i metali ciężkich, z których większość cechowała się mniejszą zawartością w 2015 roku. Rok 2015

wyróżniał się znacznie niższą sumą opadów deszczu w porównaniu z latami 2013 i 2014. Wapń, miedź, cynk i kadm były na zbliżonym poziomie we wszystkich latach badań.

Wyniki doświadczenia nie dowodzą jednoznacznego wpływu podkładek na kształtowanie się analizowanych makroelementów (Ca, K, Mg, N, P) w liściach i owocach odmiany 'Regent'. Generalnie, podkładowki objęte planem badań sprzyjały większej koncentracji wapnia w stosunku do kontroli. Podobną tendencję odnotowano dla magnezu w liściach winorośli szczepionych, przy czym jego poziom w owocach był istotnie wyższy tylko w przypadku podkładek 'Sori' ($0,66 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) i 'Couderc 161-49' ($0,64 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Materiał roślinny zebrany z winorośli zaszczepionych na podkładce 'Sori' wyróżniał się wysokimi zawartościami wszystkich badanych makroskładników, szczególnie istotnymi dla wapnia ($2,90$ i $1,05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, odpowiednio dla liści i winogron), potasu ($26,6$ i $11,22 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) i azotu ($28,8$ i $6,32 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Wzmoczony pobór potasu przez podkładkę 'Sori', może mieć szczególne znaczenie dla uprawy winorośli w regionach klimatu umiarkowanego i chłodnego, gdzie owoce zwykle cechują się obniżoną zawartością tych jonów w porównaniu z klimatem gorącym. Podobnie wysoki poziom azotu, jak w przypadku podkładki 'Sori', cechował winogrona otrzymane z roślin zaszczepionych na podkładce 'Couderc 161-49' ($29,3$ i $6,31 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, odpowiednio dla liści i owoców), która wyróżniała się również najniższym poborem fosforu. Azot ma szczególne znaczenie dla smaku i aromatu wina, których intensywność spada wraz ze spadkiem zawartości tego pierwiastka w winogronach. Aby temu zapobiec, moszcz gronowy często jest uzupełniany fosforanem diamonu ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), który wspomaga odżywianie drożdży. Zastosowanie podkładki z większą tendencją do poboru azotu daje możliwość uzupełnienia jego ewentualnych niedoborów, a co za tym idzie, zredukowania lub wyeliminowania stosowania dodatków chemicznych.

Podobnie jak w przypadku makroelementów, wpływ podkładek na zawartości badanych mikroelementów (Cu, Fe, Mn, Zn) i metali ciężkich (Cd, Pb) nie był jednoznaczny. Analiza statystyczna kadmu została przeprowadzona jedynie dla liści, ponieważ jego stężenie w owocach z roślin szczepionych było poniżej czułości aparatury badawczej ($<0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i nie zostało wykryte. W winogronach z winorośli nieszczepionej 'Regent', kadm odnotowano na poziomie $0,018 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

W odniesieniu do próby kontrolnej, podkładki z grupy 'Kober' istotnie zwiększyły pobór miedzi a obniżyły żelaza. Ponadto, podkładkę 'Kober 5BB' wyróżniały najwyższe stężenia kadmu w liściach i manganu w badanym materiale roślinnym. Nato-

miast próbki roślinne pochodzące z winorośli kontrolnych i zaszczepionych na podkładce 'Kober 125AA' cechował niski poziom cynku i wysoki ołowiu. Równie niską zawartość żelaza, jak w przypadku podkładek z grupy 'Kober', otrzymano w winogronach z roślin zaszczepionych na podkładce 'Börner'. Podkładkę tę cechowały także jedne z najniższych wartości miedzi, ołowiu i kadmu oraz najwyższy poziom cynku w materiale badawczym. Podkładka 'Couderc 161-49' jako jedyna doprowadziła do zwiększenia zawartości żelaza w liściach i winogronach w porównaniu z kontrolą.

P3. Impact of cluster zone leaf removal on grapes cv. Regent polyphenol content by the UPLC-PDA/MS method

Odpowiednia dojrzałość i jakość winogron są ściśle powiązane z plonem winorośli, ekspozycją gron i gęstością ulistnienia. Usuwanie liści to zabieg stosowany w celu zwiększenia ekspozycji owoców na promienie słoneczne oraz poprawy cyrkulacji powietrza i dostępu środków ochrony roślin. W regionach klimatu śródziemnomorskiego zabieg ten jest zwykle wykonywany w lipcu, w momencie rozpoczęcia przebarwiania się owoców.

Publikacja opisuje znaczenie zróżnicowanej ekspozycji słonecznej gron winorośli odmiany 'Regent', przeprowadzonej przez usuwanie liści, dla jakości owoców. Zabieg doświetlania winogron wykonano w trzech etapach rozwoju winorośli. Punktem odniesienia były rośliny niepoddawane zabiegowi usuwania liści (kontrola, owoce zacienione). Celem pracy była ocena wpływu usuwania liści w obrębie gron na zawartości polifenoli oraz podstawowych parametrów jakości winogron: masy gron i owoców, ekstraktu cukrowego ($^{\circ}\text{Brix}$), pH, kwasowości miareczkowanej.

Wartości wszystkich podstawowych parametrów jakości owoców różniły się istotnie między latami badań. Ogólna zawartość polifenoli, a także poszczególnych grup (antocyjanów, kwasów fenolowych, flawonoli i flawan-3-oli), w winogronach doświetlonych była wyższa w 2014 roku. Natomiast w przypadku owoców zacienionych zaobserwowano odwrotną tendencję, przejawiającą się wzmożoną akumulacją badanych związków w 2015.

Należy podkreślić, że cukier i kwasowość to najważniejsze parametry kontroli dojrzałości winogron. W regionach klimatu chłodnego obserwuje się problemy ze zbyt niską zawartością cukrów w owocach, a z drugiej strony z nadmiarem kwasów. Rekomendowane zakresy dla winogron czerwonych wynoszą 21-24 $^{\circ}\text{Brix}$ dla cukrów oraz 6-8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dla kwasowości ogólnej (kwasowość miareczkowalna jest nieco niższa od kwasowości ogólnej). W przeprowadzonych badaniach, winogrona z mniejszą ekspozy-

cją na światło słoneczne cechował wyższy poziom kwasowości. Generalnie, wykonanie zabiegu usuwania liści przed kwitnieniem podniosło poziom ekstraktu (21,2°Brix) i obniżyło zawartość kwasów (7,80 g·L⁻¹). W przypadku najpóźniej przeprowadzonego zabiegu, tj. w momencie rozpoczęcia przebarwiania się owoców, winogrona były mniej zasobne w ekstrakt (20,5°Brix) i bardziej zasobne w kwasy (8,03 g·L⁻¹), na poziomie zbliżonym do kontroli. Zabieg usuwania liści nie miał wpływu na masy gron i owoców oraz pH soku.

Zróżnicowana ekspozycja gron na promienie słoneczne miała istotny wpływ na kształtowanie się polifenoli. Doświetlanie owoców znacząco zwiększyło całkowity poziom polifenoli względem kontroli (450,51 mg·100 g⁻¹ ś.m.), szczególnie w przypadku dwóch pierwszych terminów usuwania liści: przed kwitnieniem i w trakcie formowania się owoców (odpowiednio 626,77 i 633,55 mg·100 g⁻¹ ś.m.). Podobne tendencje zaobserwowano w kształtowaniu się antocyjanów, flawonoli i flawan-3-oli, a owoce doświetlone najwcześniej (PF) cechowały jedne z najwyższych zawartości dla sumy związków z tych grup. Ponadto poziom flawonoli dla tego terminu odnotowano niemal dwukrotnie wyższym w porównaniu z kontrolą. Flawonole wytwarzane są przez cały cykl rozwoju kwiatów i jagód, chroniąc owoce przed szkodliwym promieniowaniem UV-B. Tym samym winogrona wystawione na promienie słoneczne zawierają ich znacznie większe ilości niż te zacienione.

Zwiększona ekspozycja na światło słoneczne przy pomocy usuwania liści wykazała odmienny efekt jedynie w przypadku kwasów fenolowych. Najwięcej tych związków zaobserwowano w jagodach z winorośli kontrolnych (11,98 mg·100 g⁻¹ ś.m.), a w następnej kolejności w owocach doświetlonych od momentu rozpoczęcia przebarwiania się owoców (9,12 mg·100 g⁻¹ ś.m.). Owoce doświetlone we wcześniejszych terminach były istotnie uboższe w kwasy fenolowe (PF – 6,94 mg·100 g⁻¹ ś.m., BS – 6,35 mg·100 g⁻¹ ś.m.).

P4. Cane pruning intensity of vine as a substantial factor influencing physico-chemical attributes of berries cultivar ‘Regent’

Zarówno forma prowadzenia, jak i intensywność cięcia winorośli w okresie spoczynku powinny być zaplanowane już na etapie projektowania winnicy w celu przyjęcia odpowiedniej rozstawy w rzędach i międzyrzędziach. Ponadto, cięcie to niezbędny i kluczowy zabieg dla kontroli wielkości i jakości plonu. Na tyle istotny, że niektóre regiony winiarskie wprowadziły regulacje prawne określające maksymalną liczbę pąków latoroślowych dla poszczególnych odmian.

Pomimo że cięcie jest obszernie zbadanym etapem technologicznym, może być zoptymalizowane dla każdej odmiany w zależności od przeznaczenia produkcji czy warunków środowiskowych. Zakres badań omawianej publikacji obejmował zabieg cięcia winorośli odmiany 'Regent' prowadzonej w systemie pojedynczego sznura Guyot. Celem eksperymentu była ocena wpływu intensywności cięcia łoży na jakość owoców. Plon przeanalizowano pod kątem właściwości fizycznych i chemicznych: masy gron i 100 owoców, ekstraktu cukrowego ($^{\circ}\text{Brix}$), kwasowości miareczkowanej, pH, polifenoli, składników mineralnych (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, P, Zn) i metali ciężkich (Cd, Pb).

Niezależnie od intensywności cięcia roślin – zawartości wszystkich parametrów były zróżnicowane, jednak bez wyraźnych tendencji między poszczególnymi latami.

Na podstawie wyników zaobserwowano, że intensywność cięcia łoży winorośli odmiany 'Regent' miała znaczący wpływ na jakość owoców. Analizowane parametry były w większości istotnie zróżnicowane pod wpływem przeprowadzonego cięcia, z wyjątkiem masy gron, kwasowości i pH. W przypadku roślin ciętych na 8 pąków, masa 100 owoców (168 g) i zawartość ekstraktu ($20,1^{\circ}\text{Brix}$) były znacząco niższe, a poziom polifenoli istotnie wyższy ($644 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{ ś.m.}$).

Wzrost zawartości większości składników mineralnych i metali ciężkich był skorelowany ze wzrostem intensywności cięcia winorośli. Ta tendencja była szczególnie widoczna dla wapnia, azotu i manganu. Zawartości magnezu, fosforu, cynku i ołowiu były zbliżone w winogronach otrzymanych z winorośli ciętych na 4 i 6 pąków. Natomiast najłżejsze cięcie, na 8 pąków, istotnie obniżyło poziom tych elementów. Z drugiej strony, wraz z silniejszym cięciem (4 i 6 pąków) stwierdzono także znacząco niższe zawartości potasu, miedzi i żelaza w owocach. Ponadto, szkodliwy kadm wykryto jedynie w winogronach z roślin ciętych na 4 pąki. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization – WHO) oszacowała, że tygodniowa dawka kadmu dla osób dorosłych nie powinna przekraczać 0,4 mg i zaleca $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ jako maksymalny limit w wodzie pitnej. Międzynarodowa Organizacja Winorośli i Wina (ang. International Organisation of Vine and Wine – OIV) wyznaczyła taki sam limit dla zawartości kadmu w winie.

P5. Preliminary study on the influence of UV-C irradiation on microorganism viability and polyphenol compounds content during winemaking of 'Regent' red grape cultivar

Przemysł winiarski powszechnie wykorzystuje związki oparte na ditlenku siarki (SO_2), które chronią przed utlenianiem i wzrostem niepożądanym mikroorganizmów oraz służą kontroli reakcji enzymatycznych podczas produkcji i przechowywania wina. Jednak notuje się coraz więcej przypadków alergii związanych z SO_2 , który powoduje bóle głowy, nudności, podrażnienie żołądka i trudności z oddychaniem u osób chorych na astmę. W związku z tym w polu zainteresowań producentów i naukowców znajduje się wypracowanie alternatywnej metody zdolnej wyeliminować lub zredukować użycie tego konserwantu.

Praca dotyczy stabilizacji mikrobiologicznej czerwonego moszczu 'Regent'. Celem badań była ocena skuteczności promieniowania UV-C w ograniczaniu żywotności drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) i bakterii (*Oenococcus oeni*). W doświadczeniu przeprowadzono także dodatkowe analizy, w których zamiast ciemnego moszczu 'Regent' naświetlano przezroczysty roztwór fizjologiczny NaCl zaszczerpiony tymi samymi mikroorganizmami. Otrzymane wyniki pozwoliły na uwzględnienie różnych właściwości dwóch cieczy, takich jak zmętnienie i zabarwienie. Próbki do analiz pobierano w regularnych odstępach czasu w celu określenia żywotności drożdży i bakterii oraz zawartości polifenoli w moszczu gronowym. Materiał pobrany przed naświetlaniem (0 minut) służył za kontrolę.

Początkowe liczby drożdży *S. cerevisiae* w moszczu i roztworze fizjologicznym NaCl wynosiły odpowiednio $2,66 \cdot 10^6$ i $3,04 \cdot 10^6$ jtk·ml⁻¹, natomiast bakterii *O. oeni* $5,33 \cdot 10^5$ i $3,00 \cdot 10^6$ jtk·ml⁻¹. Promieniowanie UV-C istotnie obniżało żywotność mikroorganizmów wraz ze wzrostem czasu ekspozycji. Najwyższy spadek żywych komórek (około 99%) zauważono po 60 minutach procesu. Stwierdzono, że światło UV-C było nieco bardziej skuteczne w roztworze fizjologicznym NaCl, w którym mikroorganizmy zostały całkowicie wyeliminowane po 180 minutach. Ponadto naświetlanie wykazało większą cytotoksyczność wobec bakterii.

Wzrost czasu ekspozycji UV-C prowadził do istotnego zmniejszenia się poziomu polifenoli, których wartość w próbie kontrolnej wynosiła 1235,48 mg·100 g⁻¹ ś.m., natomiast po 180 minutach procesu – 1003,57 mg·100 g⁻¹ ś.m. W przypadku niektórych związków 60 minut naświetlania nie wpłynęło na ich poziom.

Spadek polifenoli w moszczu 'Regent' spowodowany był głównie przez rozkład związków z grupy antocyjanów, których zawartość w porównaniu z kontrolą

(575,20 mg·100 g⁻¹ ś.m.) spadła aż o 51% po 180 minutach naświetlania. Pomimo to promieniowanie nie wpłynęło negatywnie na obserwowalną barwę moszczu. Rozkład pod wpływem światła UV-C dotyczył także kwasu galusowego, którego poziom zmniejszył się już po 60 minutach procesu. Jednak dalsza ekspozycja nie miała wpływu na redukcję tego związku.

Z drugiej strony, pod wpływem światła UV-C zaobserwowano wzrost zawartości kwasów hydroksycynamonowych i ich pochodnych oraz flawan-3-oli. Poziom tych pierwszych wzrósł z 418,10 mg·100 g⁻¹ ś.m. do 471,43 mg·100 g⁻¹ ś.m. w najdłużej naświetlanej próbce, głównie za sprawą izomerów kwasów caftaric (czas retencji: 2.63 min.) i coutaric (czas retencji: 3.80 min.). Natomiast zwiększenie się zawartości flawanoli w miarę naświetlania było efektem syntezy (-)-epikatechiny, która wzrosła trzykrotnie po 180 minutach procesu.

Jedynie w przypadku flawonoli nie odnotowano znaczących zmian pod wpływem światła UV-C. Różnice zaobserwowane w poziomie tych związków nie były jednoznaczne względem czasu.

Wyniki badań publikacji posłużyły do dalszych prac badawczych kontynuowanych w ramach projektu naukowego PRELUDIUM 13 (numer 2017/25/N/ST5/01222) pod tytułem „Wpływ nanomateriałów fotoaktywnych na stabilność mikrobiologiczną i skład chemiczny soku winogronowego i wina”, dofinansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

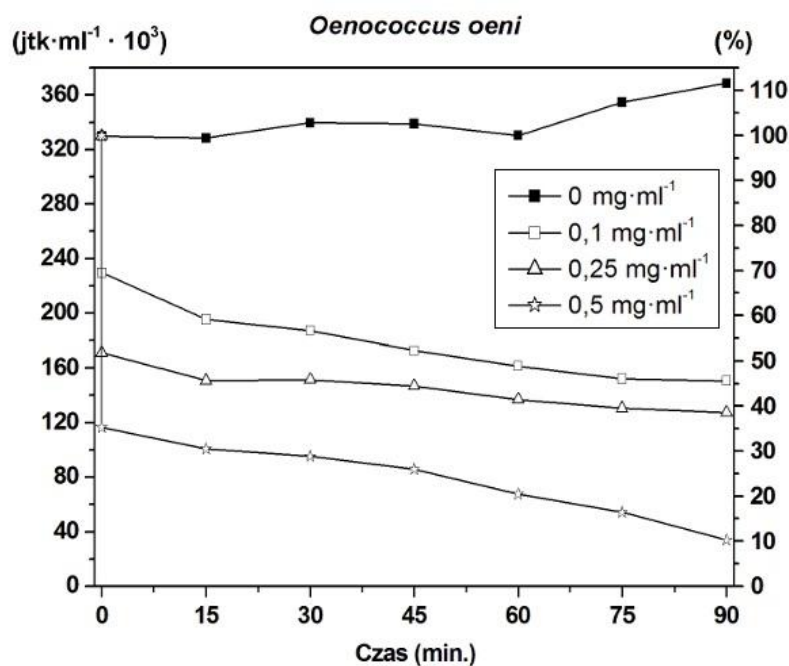
P6. Sposób ograniczania żywotności bakterii *Oenococcus oeni* (patent na wynalazek nr 418179)

Oenococcus oeni należy do najbardziej pożądanych bakterii kwasu mlekowego w technologii produkcji wina. Bakterie mlekowe odpowiadają za fermentację jabłkowo-mlekową, podczas której kwas jabłkowy przekształcany jest w kwas mlekowy. Do najważniejszych korzyści wynikających z tego procesu należą obniżenie kwasowości i wzrost pH. W związku z tym większość zwolenników fermentacji jabłkowo-mlekowej, szczególnie dla win czerwonych, to producenci z chłodniejszych regionów uprawy i przetwórstwa winogron.

Patent na wynalazek opisuje metodę ograniczania żywotności bakterii *Oenococcus oeni* we wzorcowych roztworach cukru i soli fizjologicznej PBS. Celem podjętych badań było wypracowanie alternatywnej metody dla ditlenku siarki, powszechnie stosowanego w przemyśle winiarskim do hamowania rozwoju i aktywności mikroorganizmów. Opracowany sposób ograniczania żywotności bakterii *O. oeni* następuje z udziałem

łem nanosfer krzemionki przy pomocy mieszania. Zastosowano cztery stężenia nanomateriałów. Materiał do analiz pobierano w regularnych odstępach czasu. Roztwory bez dodatku nanosfer krzemionki i próbki pobrane przed procesem służyły za kontrolę. Skuteczność metody została zbadana przy pomocy testów mikrobiologicznych i oceny mikroskopowej.

Rycina 3 przedstawia zmiany żywotności bakterii *Oenococcus oeni* w roztworze PBS pod wpływem różnych stężeń nanomateriałów i czasu mieszania. Spadek żywotności mikroorganizmów nastąpił bezpośrednio po wprowadzeniu nanokrzemionki do roztworu. Wzrost redukcji żywych komórek był skorelowany ze wzrostem stężenia nanosfer krzemionki i postępował wraz z czasem mieszania. W przypadku najwyższego stężenia ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) żywotność bakterii została ograniczona o 65% bezpośrednio po dodaniu nanomateriałów oraz o 90% po 90 minutach procesu. Natomiast w próbie kontrolnej, bez dodatku nanosfer krzemionki, zaobserwowano wzrost liczby żywych komórek o około 10% po 90 minutach mieszania.



Ryc. 3. Zmiany żywotności bakterii *Oenococcus oeni* w roztworze PBS pod wpływem różnych stężeń nanomateriałów i czasu mieszania, wyrażone w $\text{jtk}\cdot\text{ml}^{-1}$ i %.

Wyniki eksperymentu objęte patentem na wynalazek posłużyły do dalszych prac badawczych kontynuowanych w ramach projektu naukowego PRELUDIUM 13 (numer 2017/25/N/ST5/01222) pod tytułem „Wpływ nanomateriałów fotoaktywnych na stabilność mikrobiologiczną i skład chemiczny soku winogronowego i wina”, dofinansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

5. Wnioski

1. Szczepienie winorośli 'Regent' na podkładkach przyczyniło się do zwiększenia zawartości wapnia w badanym materiale roślinnym i magnezu w liściach oraz wpłynęło na obniżenie poziomu szkodliwego kadmu, który był poniżej czułości aparatury badawczej ($<0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).
2. Podkładki 'Sori' i 'Kober 125AA' wpłynęły na wzrost zawartości polifenoli w owocach, zwłaszcza antocyjanów i flawonoli. Ponadto podkładka 'Sori' wyróżniała się wysokim poborem wszystkich badanych makroelementów (Ca, K, Mg, N, P).
3. Winogrona otrzymane z roślin zaszczerpionych na podkładce 'Börner' cechowały najniższe zawartości kwasów fenolowych, flawan-3-oli, miedzi, żelaza, kadmu i ołowiu.
4. Zabiegi cięcia winorośli, obejmujące usuwanie liści w obrębie gron i intensywność cięcia łoży, nie miały wpływu na masę gron i pH soku. Ponadto doświetlanie gron nie było istotne dla masy owoców, a zróżnicowana intensywność cięcia łoży nie wpłynęła na kwasowość.
5. Usuwanie liści i cięcie łoży na 8 pąków istotnie zwiększyły poziom polifenoli w owocach winorośli odmiany 'Regent'. Doświetlenie gron przed kwitnieniem miało szczególne znaczenie dla wzmożonej koncentracji antocyjanów, flawonoli i flawan-3-oli. Zabieg usuwania liści obniżył jedynie poziom kwasów fenolowych, których najniższe zawartości odnotowano dla winogron doświetlonych przed kwitnieniem i w trakcie formowania się owoców.
6. Wzrost zawartości większości analizowanych składników mineralnych (Ca, Mg, Mn, N, P, Zn) i toksycznych metali ciężkich (Cd, Pb) był skorelowany ze wzrostem intensywności cięcia winorośli. Najłżejsze cięcie, na 8 pąków, zwiększyło poziomy potasu, miedzi i żelaza w owocach.
7. Biorąc pod uwagę powyższe, zasadnym zdaje się połączenie badanych metod w celu zoptymalizowania uprawy winorośli 'Regent' w warunkach klimatycznych północno-zachodniej Polski. Zdolność do wydajniejszego poboru składników mineralnych przez badane podkładki może zminimalizować dawki wprowadzanych nawozów. Zaplanowanie większej rozstawy roślin celem cięcia łoży na 8 pąków ma uzasadnienie ekonomiczne w postaci mniejszego nakładu finansowego na założenie

winnicy oraz może obniżyć zawartość metali toksycznych w owocach (Cd, Pb). Natomiast usuwanie liści w strefie gron może być skuteczną metodą kontroli zawartości polifenoli, cukrów i kwasów w winogronach.

8. Wzrost czasu ekspozycji UV-C prowadził do istotnego obniżania żywotności mikroorganizmów i poziomu polifenoli, głównie przez rozkład antocyjanów, jednak bez wpływu na obserwowalną barwę moszczu. 60 minut naświetlania ograniczyło liczbę żywych komórek o około 99% i nie wpłynęło na zawartości niektórych związków.
9. Spadek żywotności bakterii *Oenococcus oeni* był skorelowany ze wzrostem stężenia nanosfer krzemionki i postępował wraz z czasem mieszania. Najwyższe stężenie ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) ograniczyło liczbę żywych komórek o 65% bezpośrednio po dodaniu nanomateriałów oraz o 90% po 90 minutach procesu.
10. Zastosowanie światła UV-C i nanosfer krzemionki może przyczynić się do zmniejszenia lub wyeliminowania użycia SO_2 jako środka kontroli mikrobiologicznej w winiarstwie. Dalsze prace badawcze są jednak niezbędne w celu zoptymalizowania metod, biorąc pod uwagę m.in. odmianę winogron, typ reaktora UV-C, czy wykorzystanie nanomateriałów w kontroli innych gatunków bakterii i drożdży. Właściwym wydaje się także połączenie testowanych procesów dla poprawy skuteczności redukcji mikroorganizmów z zachowaniem parametrów jakości wina.

6. Literatura

1. OIV (2017). 2017 World Vitiviniculture Situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. International Organisation of Vine and Wine, France. 1-20.
2. Oficjalna strona internetowa Krajowego Ośrodka Wsparcia Rolnictwa (2018). Rynek wina w liczbach (lata gospodarcze 2009/2010 – 2017/2018) - Dane na dzień 31.07.2018 r., <http://www.kowr.gov.pl/interwencja/wino> – data dostępu 12.09.2018.
3. Li, X.L., Wang, C.R., Li, X.Y., Yao, Y.X., Hao, Y.J. (2013). Modifications of Kyoho grape berry quality under long-term NaCl treatment. *Food Chemistry*, 139(1-4), 931-937.
4. Tardaguila, J., de Toda, F.M. (2008). Assessment of Tempranillo grapes quality in the vineyard by vitur score-sheet. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 42(1), 59-65.
5. Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., Li, H.-B. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 622-646.
6. Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T. (2016). Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chemistry*, 201, 213-221.
7. Keller, M. (2015). Chapter 7 – Environmental Constraints and Stress Physiology (w: *The Science of Grapevines Anatomy and Physiology Second Edition*), Academic Press, 267-341.
8. Bavaresco, L., Gatti, M., Fregoni, M. (2010). Nutritional deficiencies (w: *Methodologies and Results in Grapevine Research*) Ed. Delrot, S., Medrano, H., Bavaresco, L., Grando, S., Springer Science Business Media, 165-191.
9. Mpelasoka, B.S., Schachtman, D.P., Treeby, M.T., Thomas, M.R. (2003). A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(3), 154-168.
10. Keller, M. (2010). Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturist. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 56-69.
11. Keller, M., Mills, L.J., Harbertson, J.F. (2012). Rootstock Effects on Deficit-Irrigated Winegrapes in a Dry Climate: Vigor, Yield Formation, and Fruit Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(1), 29-39.
12. Martínez-Lüscher, J., Brillante, L., Nelson, C.C., Al-Kereamy, A.M., Zhuang, S., Kurtural, S.K. (2017). Precipitation before bud break and irrigation affect the response of grapevine ‘Zinfandel’ yields and berry skin phenolic composition to training systems. *Scientia Horticulturae*, 222, 153-161.
13. Khalifezadeh Koureh, O., Bakhshi, D., Pourghayoumi, M., Majidian, M. (2018). Comparison of yield, fruit quality, antioxidant activity, and some phenolic compounds of white seedless grape obtained from organic, conventional, and integrated fertilization. *International Journal of Fruit Science*, 1-12.
14. Drenjančević, M., Jukić, V., Zmaić, K., Kujundžić, T., Rastija, V. (2017). Effects of early leaf removal on grape yield, chemical characteristics, and antioxidant activity of grape variety Cabernet Sauvignon and wine from eastern Croatia. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 67(8), 705-711.

15. Kumar, A.R., Parthiban, S., Subbiah, A., Sangeetha, V. (2017). Effect of Pruning Severity and Season for Yield in Grapes (*Vitis vinifera* L.) Variety Muscat Hamburg. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(3), 1814-1826.
16. Ozden, M., Vardin, H., Simsek, M., Karaaslan, M. (2010). Effects of rootstocks and irrigation levels on grape quality of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. African Journal of Biotechnology, 9(25), 3801-3807.
17. Schmid, J., Manty, F., Huber, L., Porten, M., Rühl, E.H. (2005). Experience with rootstocks varieties in Germany (w: Proceedings of the 2005 Rootstocks Symposium – Grapevine Rootstocks: Current Use, Research, and Application), Ed. Cousins, P., Striegler, R.K., February 5, 2005, Osage Beach, Missouri, 14-24.
18. Jin, Z.X., Sun, T.Y., Sun, H., Yue, Q.Y., Yao, Y.X. (2016). Modifications of ‘Summer Black’ grape berry quality as affected by the different rootstocks. Scientia Horticulturae, 210, 130-137.
19. Bascuñán-Godoy, L., Franck, N., Zamorano, D., Sanhueza, C., Carvajal, D.E., Ibacache, A. (2017). Rootstock effect on irrigated grapevine yield under arid climate conditions are explained by changes in traits related to light absorption of the scion. Scientia Horticulturae, 218, 284-292.
20. Gao-Takai, M., Katayama-Ikegami, A., Nakano, S., Matsuda, K., Motosugi, H. (2017). Vegetative Growth and Fruit Quality of ‘Ruby Roman’ Grapevines Grafted on Two Species of Rootstock and Their Tetraploids. The Horticulture Journal, 86(2), 171-182.
21. Cheng, J., Wei, L., Mei, J., Wu, J. (2017). Effect of rootstock on phenolic compounds and antioxidant properties in berries of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. ‘Red Alexandria’. Scientia Horticulturae, 217, 137-144.
22. Ibacache, A., Albornoz, F., Zurita-Silva, A., (2016). Yield responses in Flame seedless, Thompson seedless and Red Globe table grape cultivars are differentially modified by rootstocks under semi arid conditions. Scientia Horticulturae, 204, 25-32.
23. Nelson, C.C., Kennedy, J.A., Zhang, Y., Kurtural, S.K. (2016). Applied water and rootstocks affect productivity and anthocyanin composition of Zinfandel in central California. American Journal of Enology and Viticulture, 67(1), 18-28.
24. Satisha, J., Somkuwar, R.G., Sharma, J., Upadhyay, A.K., Adsule, P.G. (2010). Influence of rootstocks on growth yield and fruit composition of Thompson seedless grapes grown in the Pune region of India. South African Journal of Enology and Viticulture, 31(1), 1-8.
25. Feng, H., Yuan, F., Skinkis, P.A., Qian, M.C. (2015). Influence of cluster zone leaf removal on Pinot noir grape chemical and volatile composition. Food Chemistry, 173, 414-423.
26. Nicholas, K.A., Matthews, M.A., Lobell, D.B., Willits, N.H., Field, C.B. (2011). Effect of vineyard-scale climate variability on Pinot noir phenolic composition. Agricultural and Forest Meteorology, 151, 1556-1567.
27. Dobrei, A., Dobrei, A., Posta, G., Danci, M., Nistor, E., Camen, D., Mălăescu, M., Sala, F. (2016). Research concerning the correlation between crop load, leaf area and grape yield in few grapevine varieties. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 10, 222-232.

28. Baiano, A., Terracone, C. (2012). Effects of bud load on quality of Beogradska besemena and Thompson seedless table grapes and cultivar differentiation based on chemometrics of analytical indices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 645-653.
29. Coletta, A., Berto, S., Crupi, P., Cravero, M.C., Tamborra, P., Antonacci, D., Daniele, P.G., Prenesti, E. (2014). Effect of viticulture practices on concentration of polyphenolic compounds and total antioxidant capacity of Southern Italy red wines. *Food Chemistry*, 152, 467-474.
30. Robinson, J., Harding, J. (2015). *The Oxford Companion to Wine*, 4th ed., Ed. Robinson, J., Harding, J., Oxford University Press, 588.
31. Falguera, V., Forns, M., Ibarz, A. (2013). UV-vis irradiation: An alternative to reduce SO₂ in white wines?. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 59-64.
32. Machado, R.M.D., Toledo, M.C.F., Vicente, E. (2009). Sulfite content in some Brazilian wines: analytical determination and estimate of dietary exposure. *European Food Research and Technology*, 229(3), 383-389.
33. Garaguso, I., Nardini, M. (2015). Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. *Food Chemistry*, 179, 336-342.
34. Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., Coimbra, M.A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), 1-12.
35. Fredericks, I.N., du Toit, M., Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, 28(3), 510-517.
36. García-Ruiz, A., Crespo, J., López-de-Luzuriaga, J.M., Olmos, M.E., Monge, M., Rodríguez-Álfaro, M.P., Martín-Alvarez, P.J., Bartolome, B., Moreno-Arribas, M.V. (2015). Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines. *Food Control*, 50, 613-619.
37. Gil-Sánchez, I., Monge, M., Miralles, B., Armentia, G., Cueva, C., Crespo, J., López de Luzuriaga, J.M., Olmos, M.E., Bartolomé, B., González de Llano, D., Moreno-Arribas, M.V. (2018). Some new findings on the potential use of biocompatible silver nanoparticles in winemaking. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.017>.
38. Ruehl, E., Schmid, J., Eibach, R., Töpfer, R. (2015). Grapevine breeding programmes in Germany (w: Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry), Ed. Reynolds, A., Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 268, 77-101.
39. Vršič, S., Pulko, B., Kocsis, L. (2015). Factors influencing grafting success and compatibility of grape rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 181, 168-173.
40. Vršič, S., Pulko, B., Valdhuber, J. (2016). Compatibility of Rootstock 'Börner' with Various Wine-and Table-Grape Varieties (w: Proceedings. 51st Croatian and 11th International Symposium on Agriculture), 15-18 February, 2016, Opatija, Croatia, 409-413.
41. Vršič, S. (2017). Rooting of rootstock 'Börner' and its compatibility with various wine- and table-grape varieties. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16 (3), 141-149.

42. Kontić, J.K., Jelušić, I.R., Tomaz, I., Preiner, D., Marković, Z., Stupić, D., Andabaka, Ž., Maletić, E., (2016). Polyphenolic composition of the berry skin of six fungus-resistant red grapevine varieties. *International Journal of Food Properties*, 19, 1809-1824.
43. Spasov, H., Chobanov, Y., Blagoeva, N., Zapryanova, P., Raychevska, Z., Mosenogova, A. (2017). Selection of newly isolated yeast strains for the production of regional wines of the Regent variety. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans*, 20(4), 107-121.
44. Socha, R., Gałkowska, D., Robak, J., Fortuna, T., Buksa, K. (2015). Characterization of Polish Wines Produced from the Multispecies Hybrid and *Vitis vinifera* L. Grapes. *International Journal of Food Properties*, 18(4), 699-713.
45. Liu, J., Arneborg, N., Toldam-Andersen, T.B., Petersen, M.A., Bredie, W.L. (2017). Effect of sequential fermentations and grape cultivars on volatile compounds and sensory profiles of Danish wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3594-3602.
46. Téthal, J., Baroň, M., Sotolář, R., Ailer, S., Sochor, J. (2015). Effect of grapevine rootstocks on qualitative parameters of the Cerason variety. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(6), 570-579.
47. Aguín, O., Mansilla, J.P., Vilariño, A., Sainz, M.J. (2004). Effects of mycorrhizal inoculation on root morphology and nursery production of three grapevine rootstocks. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 108-111.

**KOPIE ARTYKUŁÓW STANOWIĄCYCH JEDNOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI
I OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW**