

Rola bakterii fermentacji jabłkowo-mlekowej w winiarstwie

The Role of Malolactic Bacteria in Wine Production

dr Sylwia Bonin, inż. Marika Bielawska

Zakład Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydział Nauk o Żywności, SGGW, Warszawa

Słowa kluczowe: bakterie mlekowe, fermentacja jabłkowo-mlekowa, wino

Key words: lactic acid bacteria, malolactic fermentation, wine

*Malolactic fermentation occurs in grape wine and ciders. It is a process where malic acid is converted into lactic – acid by lactic acid bacteria – mostly *Oenococcus oeni*. This process can occur naturally by bacteria present on grapes or can be initiated by starter cultures inoculation. Malolactic fermentation reduces acidity and has an impact on wine taste and aroma. However, the growth of bacteria in wine is dependent on some factors: pH, SO₂ and ethanol content or temperature of aging.*

Fermentacja jabłkowo-mlekowa występuje w winach gronowych i cydrach. Jest to proces przekształcania kwasu jabłkowego do kwasu mlekowego przez bakterie mlekowe, głównie *Oenococcus oeni*. Zachodzi ona spontanicznie dzięki bakteriom obecnym na winogronach lub w wyniku dodatku kultur starterowych. Fermentacja jabłkowo-mlekowa prowadzi do zmniejszenia kwasowości, a także wpływa na cechy smakowo-aromatyczne. Jednak rozwój bakterii w winie zależy od takich czynników, jak: pH, zawartość SO₂ i alkoholu oraz temperatura leżakowania.

Bakterie fermentacji mlekowej (ang. LAB – lactic acid bacteria) najczęściej kojarzone są z produkcją wyrobów mleczarskich i kiszonek. Jednak odgrywają one także istotną rolę w winiarstwie. Rola bakterii fermentacji mlekowej w winiarstwie jest zarówno pozytywna, jak i negatywna. Działanie pozytywne to proces fermentacji jabłkowo-mlekowej, czyli biologiczne odkwaszanie win. Polega ono na przekształceniu kwasu L-jabłkowego do kwasu L-mlekowego i dwutlenku węgla. W procesie tym mogą także powstawać inne produkty uboczne, pozytywnie wpływające na cechy sensoryczne. Niestety, bakterie mlekowe mogą także wytwarzać związki, które wpływają niekorzystnie na smak i zapach oraz powodują zmętnienie win, czyli mogą być przyczyną „chorób” win.

Fermentacja jabłkowo-mlekowa

W procesie biologicznego odkwaszania wyróżnia się trzy możliwe ścieżki enzymatyczne przekształcania kwasu jabłkowego do kwasu mlekowego. Szlakiem najczęściej wykorzystywanym przez bakterie kwasu mlekowego jest bezpośrednia konwersja kwasu jabłkowego do kwasu mlekowego przy udziale enzymu dekarboksylazy jabłczanowej, zwanego również enzymem jabłkowo-mlekowym (ang. MLE – malolactic enzyme). Drugim typem przemiany jest przekształcenie kwasu L-jabłkowego do kwasu pirogronowego przez dehydrogenazę jabłczanową, po czym kwas pirogronowy jest redukowany przez dehydrogenazę mleczanową do kwasu mlekowego. Trzecia przemiana kwasu jabłkowego polega na działaniu następujących enzymów: dehydrogenazy jabłczanowej, dekarboksylazy szczawiooctanowej i dehydrogenazy mleczanowej. Kwas jabłkowy zostaje przekształcony do szczawiooctanu, który następnie ulega dekarboksylacji do pirogronianu, po czym pirogronian zostaje zredukowany do kwasu mlekowego [1].

Fermentacja jabłkowo-mlekowa występuje zazwyczaj po fermentacji alkoholowej i odgrywa ważną rolę w produkcji win gronowych, a także cydrów. Zastąpienie mocno zdysocjowanego kwasu jabłkowego słabo zdysocjowanym kwasem mlekowym przyczynia się do redukcji kwasowości. W wyniku rozkładu 1 g kwasu jabłkowego powstaje 0,67 g kwasu mlekowego i 0,33 g CO₂. Ogólny spadek kwasowości, spowodowany działalnością bakterii kwasu mlekowego, może wahać się od ok. 0,1% do 0,3%, a pH może wzrosnąć o 0,1–0,3 jednostki [2]. Zwykle w winach kwas mlekowy występuje na poziomie 1,5–3,5 g/dm³. Wina, które zawierają większe ilości kwasu mlekowego w stosunku do innych kwasów, charakteryzują się pełniejszym i bardziej łagodnym smakiem. Jego obecność wzmacnia kolor i zapach wina [3].

Bakterie fermentacji jabłkowo-mlekowej wytwarzają także związki, które nadają cechy aromatyczno-smakowe. Głównym związkiem tworzonym podczas fermentacji jabłkowo-mlekowej jest diacetyl, który powstaje jako produkt pośredni metabolizmu kwasu cytrynowego. Gdy jego stężenie jest w granicach 1–4 mg/dm³, w zależności od rodzaju wina, odczuwalny jest łagodny maślano-orzechowy charakter win. Natomiast, kiedy zawartość przekroczy 5–7 mg/dm³, maślany aromat zaczyna być zbyt silny, co jest niepożądane [4, 5]. Niestety diacetyl jest związkiem niestabilnym chemicznie i może zostać zredukowany do acetoiny, a ta z kolei do 2,3-butanodiolu. Ma to bezpośredni wpływ na aromat wina, gdyż związki te w mniejszym stopniu oddziałują na odczucie maślanego aromatu wina. Ich prógi wyczuwalności wynoszą odpowiednio ok. 150 i 600 mg/dm³, a w przypadku diacetylu, w zależności od rodzaju win, 0,2–0,9 mg/dm³ [6].

Innymi związkami, których poziom ulega podwyższeniu to estry – mleczan etylu i bursztynian dietylu. Pierwszy nadaje winom owocowy, lekko maślany i kremowy charakter, a drugi – owocowy, lekko melonowy aromat [6]. Niektóre szczepy bakterii wykazują także zdolności przekształcania związanych, nielotnych związków aromatycznych do formy czynnej – lotnej. W efekcie zmienia się profil zapachowy win i uzyskują one aromaty owocowe, cytrusowe i waniliowy [7]. Przykładowe związki aromatyczne, których poziom wzrasta w wyniku fermentacji jabłkowo-mlekowej, to: wanilina, linalol, farnesol oraz 4-winylogwajakol [8].

Spontaniczna fermentacja jabłkowo-mlekowa

Owoce są naturalnym siedliskiem bakterii mlekowych, stąd mikroorganizmy te w wyniku tłoczenia lub fermentacji w miazdze przechodzą do wina. Populacja bakterii kwasu mlekowego na winogronach waha się od ok. 10² do 10⁴ jtk/cm³, w zależności od warunków klimatycznych panujących w ostatnich dniach dojrzewania owoców. Jest to głównie skorelowane z pH, im jest ono wyższe, tym większa całkowita liczba bakterii. Mikroorganizmy obecne na owocach należą do rodzajów: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Pediococcus*. W pierwszych dniach fermentacji alkoholowej populacja bakterii kwasu mlekowego na ogół wzrasta do maksimum 10⁴–10⁵ jtk/cm³, a następnie stopniowo zmniejsza się [3].

Alkohol wpływa nie tylko na całkowitą liczbę bakterii, ale przede wszystkim na zmniejszenie różnorodności gatunków. W czasie fermentacji alkoholowej *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc mesenteroides* stopniowo obumierają bądź są na poziomie zbyt niskim do wykrycia; *Oenococcus oeni* jest najczęstszym gatunkiem zidentyfikowanym po zakończeniu fermentacji [3], a jego liczebność wynosić może do 10⁷ jtk/cm³ [9]. Przemianę kwasu jabłkowego do mlekowego i CO₂ możemy zaobserwować dopiero, gdy populacja bakterii osiągnie ok. 10⁶ jtk/cm³. Czas pomiędzy zakończeniem fermentacji alkoholowej a początkiem fermentacji jabłkowo-mlekowej zależy głównie od temperatury, pH i zawartości etanolu, głównych czynników wpływających na wzrost bakterii w winie [3, 10].

W ostatnich latach wykazano, że niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* są w stanie przetrwać warunki produkcji wina i wpływają korzystnie na cechy win [11]. Jednak inne szczepy *Lactobacillus* i *Pediococcus* mogą przetrwać, przyczyniając się do zepsucia wina [3]. Drobnoustroje te mogą przekształcać niektóre kwasy fenolowe, a pochodne winylowe tych kwasów nadają aromat „medyczny”, natomiast pochodne etylowe – „zwierzęcy” [6]. Natomiast w wyniku metabolizmu aminokwasów w winie powstają heterocykliczne związki azotowe nadające im mysi posmak [12].

Proces spontanicznej, naturalnej fermentacji jabłkowo-mlekowej jest powolny i niepewny. Może on trwać nawet kilka tygodni lub miesięcy, a wyniki nie są powta-

Charakterystyka kultur starterowych dostępnych na polskim rynku

Nazwa	Zastosowanie	Maksymalne stężenie alkoholu	Maksymalny poziom SO ₂ [mg/dm ³]	Minimalne pH	Minimalna, optymalna temperatura
VINIFLORA CH16	wina czerwone	16%	ogółem: 45 wolny: 20	>3,3	>16 °C 18–22 °C
VINIFLORA CH11	wina białe i różowe	15%	ogółem: 30 wolny: 20	>3,0	>14 °C 15–20 °C
VINIFLORA CH35	wina białe i różowe	14%	ogółem: 45 wolny: 20	>3,0	>14 °C 15–20 °C
VINIFLORA OENOS	wina czerwone i białe	14%	ogółem: 30 wolny: 10	>3,1	>16 °C 17–25 °C

rzalne ani przewidywalne. W związku z tym w ostatnich latach na rynku pojawiły się czyste kultury starterowe bakterii *Oenococcus oeni*.

Wykorzystanie kultur starterowych bakterii

Jak wspomniano powyżej *Oenococcus oeni* są najczęściej izolowaną bakterią kwasu mlekowego podczas spontanicznej fermentacji jabłkowo-mlekowej. Są to Gram-dodatnie, nieruchliwe komórki, o kształcie elipsoidalnym do kulistego. Zazwyczaj występują parami lub w krótkich łańcuchach. Są one względnie bez-tlenowcami, jak większość bakterii kwasu mlekowego występujących w winie. Optymalna temperatura ich wzrostu mieści się pomiędzy 20 a 30 °C. Przystosowane są do większych stężeń alkoholu oraz niskich wartości pH, w zależności od szczepu, mogą wzrastać nawet przy pH poniżej 3 [13].

Do produkcji kultur starterowych stosuje się różne szczepy *O. oeni*, które wyizolowane zostały z owoców winogron lub moszczów. Komercyjne szczepy różnią się odpornością na obecny w winach etanol, SO₂, niskie pH, ponadto różnią się optymalną temperaturą wzrostu i produkcją związków wpływających korzystnie na cechy sensoryczne. Ponadto inne kultury stosuje się do win białych, a inne do czerwonych. Szczepienie win kulturami starterowymi pozwala na szybkie rozpoczęcie fermentacji jabłkowo-mlekowej i jej właściwy przebieg, ponieważ kultury te zawierają wysoki poziom bakterii w 1 g. Zatem po dodaniu do wina bakterie te szybko zaczynają dominować nad mikroflorą obecną w winie, uniemożliwiając jej rozwój. Stosowanie kultur starterowych daje też możliwość kontrolowanego zakończenia biologicznego odkwaszania poprzez dodatek lizozymu lub SO₂.

Handlowe preparaty bakterii oferowane są najczęściej w postaci zliofilizowanej, niekiedy mrożonej. Na rynku krajowym dostępne są preparaty liofilizowane. Stosowanie kultur liofilizowanych jest łatwe w użyciu. Nie jest potrzebna rehydratacja, jak w przypadku drożdży suszonych, preparat dodaje się bezpośrednio do zbiornika wina. W tabeli przedstawiono charakterystykę preparatów bakterii dostępnych na naszym rynku. Kultury te sprzedawane są przez firmę Begerow, jednak ich bezpośrednim producentem jest firma Christian Hansen, która nie sprowadza bakterii fermentacji jabłkowo-mlekowej na rynek Polski.

Czynniki wpływające na przebieg fermentacji jabłkowo-mlekowej

Jak podano w tabeli o kulturach starterowych, skład wina i temperatura wpływają na rozwój tych kultur, ale także wpływają na rozwój bakterii w czasie fermentacji spontanicznej. Należy jednak zaznaczyć, że działanie wymienionych w tabeli czynników jest ze sobą powiązane. Podane poziomy dwutlenku siarki występują wówczas, gdy pH jest minimalne. W przypadku niskiego pH bakterie są mniej

odporne na SO₂, natomiast pH w granicach 3,4–3,6 powoduje, że bakterie lepiej tolerują dwutlenek siarki, przykładowo szczep CH11 nawet do 70 mg/dm³. Ponadto graniczne wartości pH i SO₂ są przyczyną dłuższego namnażania bakterii, a tym samym dłuższego procesu biologicznego odkwaszania win [14]. Najszybsza przemiana kwasu jabłkowego do mlekowego zachodzi, gdy pH mieści się w granicy 3,4–4,0 [15]. Optymalny wzrost bakterii, tzn. najkrótszy czas adaptacji i najszybszy wzrost, oraz najwyższa możliwość biologicznego odkwaszania zachodzą, gdy stężenie etanolu wynosi od 10% do 13% obj. [3, 10]. W optymalnych warunkach, po dodaniu bakterii, proces fermentacji trwa od 1 do 4 tygodni. Przy utrudnionych dla rozwoju bakterii warunkach biologiczne odkwaszenie, po dodatku kultur starterowych, może się wydłużyć nawet do 3 miesięcy [14]. Zatem, gdy mamy do czynienia z winem o niskim pH i zawierającym dwutlenek siarki, możemy niestety przez długi czas nie zaobserwować oznak fermentacji, czyli sporadycznie wydzielających się drobnych pęcherzyków CO₂. Ponadto, gdy temperatura leżakowni będzie wynosiła ok. 10 °C, mimo dodatku bakterii ich rozwój może nie nastąpić.

Należy zatem pamiętać, że stosowanie bakterii fermentacji jabłkowo-mlekowej może przyczynić się do poprawy jakości win o wysokiej kwasowości, jednak nie w każdych warunkach bakterie te będą się rozwijały.

Literatura:

- [1] Miller B. J., Franz C. M., Cho G. S., du Toit M.: 2011. *Expression of malolactic enzyme gene (mle) from Lactobacillus plantarum under winemaking conditions*. *Curr Microbiol*, 62, 6, 1682–1688.
- [2] Costello P.: 2005. *The chemistry of malolactic fermentation w: Malolactic fermentation in wine. Understanding the science and the practice*. Lallemand Inc., Montreal, Canada.
- [3] Lonvaud-Funel A.: 1999. *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 317–331.
- [4] Bartowsky E. J., Henschke P. A.: 2004. *The „buttery” attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond*. *Inter J Food Microbiol* 96, 3, 235–252.
- [5] Swiegers J. H., Bartowsky E. J., Henschke P. A., Pretorius I. S.: 2005. *Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor*. *Austral J Grape Wine Res* 11, 2, 139–173.
- [6] Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M.: 2010. *Malolactic fermentation: ABC's of MLF*. *S Afr J Enol Vitic* 31, 2, 186–212.
- [7] Hernandez-Orte P., Cersosimo M., Loscos N., Cacho J., Garcia-Moruno E., Ferreira V.: 2009. *Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria*. *Food Res Internat* 42, 7, 773–781.
- [8] Ugliano M., Moio L.: 2006. *The influence of malolactic fermentation and Oenococcus oeni strain on glycosidic aroma precursors and related volatile compound of red wine*. *J Scienc Food Agricul* 86, 14, 2486–2476.
- [9] Krieger S.: 2005. *The history of malolactic bacteria in wine, w: Malolactic fermentation in wine. Understanding the science and the practice*. Lallemand Inc., Montreal, Canada.
- [10] Herrero M., Noriega E., Garcia L. A., Diaz M.: 2005. *Influence of a malolactic starter on the quality of the cider produced on an industrial scale*. *Eur Food Res Technol* 221, 1–2, 168–174.
- [11] du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S.: 2011. *Lactobacillus: the next generation of malolactic fermentation starter cultures – an overview*. *Food Biopr Technol*, 4, 6, 876–906.
- [12] Costello P. J., Lee T. H., Henschke P. A.: 2001. *Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine*. *Austral J Wine Res* 7, 3, 160–167.
- [13] Powell C., van Zandycke S., Degre R.: 2005. *The microbiology of malolactic fermentation, w: Malolactic fermentation in wine. Understanding the science and the practice*. Lallemand Inc. Montréal, Canada.
- [14] Materiały informacyjne o bakteriach fermentacji jabłkowo-mlekowej znajdujących się w ofercie Begerow, <http://www.begerow.com/de/fb/produkte/biotechnologie/PL/7/PG/00330/AG/33010.html>, data pobrania 02.01.2012.
- [15] Bauer R., Dicks L. M. T.: 2004. *Control of malolactic fermentation in wine. A review*. *S Afr J Enol Vitic* 25, 2, 74–88.