

Sylwia Bonin

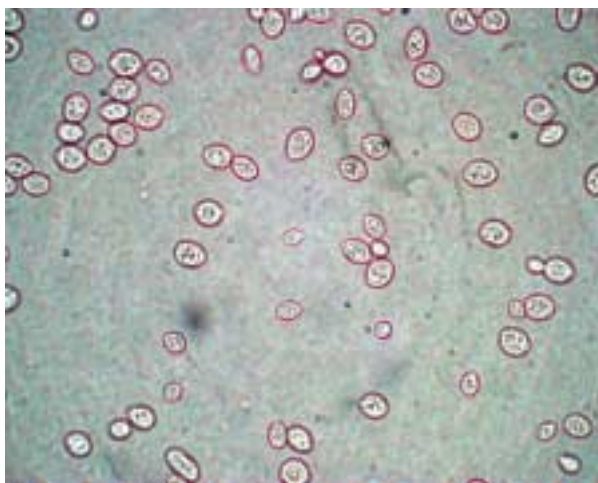
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Technologii Żywności, SGGW, Warszawa

Zakażenia mikrobiologiczne podczas produkcji wina

Wino jest napojem wytwarzanym od tysiącleci. Ze względu na wysoką zawartość alkoholu, niskie pH oraz brak tlenu, przy prawidłowo prowadzonym procesie technologicznym rozwój drobnoustrojów jest w nim praktycznie ograniczony.

Podczas produkcji wina drobnoustroje wprowadzane są z surowcem, ponieważ owoce stanowią naturalne środowisko wielu mikroorganizmów. Głównie są to drożdże, pleśnie i w nieznacznej ilości bakterie, które w trakcie tłoczenia przedostają się do wina.

Większość drożdży występujących na powierzchni owoców stanowią tzw. drożdże dzikie, należące do rodzajów *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Cryptococcus*. W przypadku owoców nadgniłych liczba tych mikroorganizmów ulega



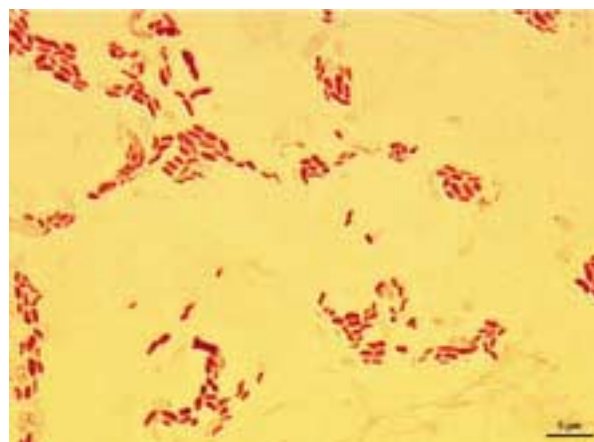
Rys. 1. Drożdże winiarskie *Saccharomyces bayanus*, powiększenie x 1600

zwiększeniu. Na powierzchni winogron występują one w ilości powyżej 10^6 jtk/g, podczas gdy drożdże z rodzaju *Saccharomyces* jest jedynie 10-100 jtk/g. Większość drożdży „dzikich”, w przeciwieństwie do „szlachetnych” (rys. 1), należących do gatunku *Saccharomyces cerevisiae* lub *Saccharomyces bayanus*, jest nieodporna na etanol w stężeniu powyżej 5-7% obj., stąd drożdże „dzikie” giną w trakcie procesu fermentacji. Mogą jednak produkować związki wpływające zarówno negatywnie na cechy sensoryczne wina, jak i na drożdże z rodzaju *Saccharomyces* (Fleet, 2003).

Na powierzchni owoców występują pleśnie z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Botritis*. W przypadku wykorzystywania do produkcji zapleśniałych owoców należy zwrócić uwagę na możliwość przejścia do wina niekorzystnych dla zdrowia człowieka produktów pleśni, czyli mykotoksyn – ochratoksyny A, patuliny i cytryniny. Związki te ulegają rozkładowi w procesie fermentacji, ale nie wiadomo, jakie jest działanie powstałych produktów (Fleet, 2003).

W trakcie fermentacji oraz leżakowania mogą się rozwijać szkodliwe bakterie, a także drożdże, które powodują powstawanie chorób wina. Choroby te są zmianami powstałymi w wyniku znacznego rozwoju drobnoustrojów, prowadzącymi do obniżenia jakości produktu. Niepożądane w winie mikroorganizmy to tlenowe drożdże kożuchujące oraz bakterie octowe i beztlenowe, lub względnie beztlenowe bakterie fermentacji mlekowej.

Pierwszą z powyższych grup drobnoustrojów stanowią drożdże kożuchujące, które jak sama nazwa wskazuje są przyczyną tworzenia się kożucha, czyli błonki. Należą tu drożdże z rodzaju: *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis*, które mają zdolność rozkładania etanolu, glicerolu oraz kwasów organicznych. Produkują znaczne ilości aldehydu octowego, octanu etylu i różnych estrów, wpływając niekorzystnie



Rys. 2. Bakterie octowe wybarwione metodą Grama. Powiększenie x 1200

na smak i zapach wina. Drobnoustroje te rozwijają się najlepiej w temp. 24-26°C, natomiast poniżej 4°C i powyżej 34°C ich działalność zostaje zahamowana. Obecne są w winach o niskiej zawartości etanolu; przy ilości alkoholu powyżej 12% obj. z reguły nie występują, ponadto jako



organizmy tlenowe mogą rozwijać się jedynie przy dostępie powietrza (Wzorek, Pogorzelski, 1998; Fleet, 2003).

Bakterie fermentacji octowej powodujące zakażenie wina należą do rodzaju *Acetobacter* (rys. 2); najczęściej spotykanymi gatunkami są: *A. aceti* i *A. pasteurianus*. Bakterie kwasu octowego to gramujemne, elipsoidalne lub pałeczkowate komórki, występujące pojedynczo, parami lub w łańcuchach. Bakterie te utleniają etanol do kwasu octowego, który mogą dalej utleniać do CO_2 i H_2O . Pierwszym objawem fermentacji octowej jest pojawienie się zapachu kwasu octowego i jego estrów. Następnie na powierzchni wina tworzy się bardzo cienka błonka złożona z olbrzymich ilości bakterii, co stwierdzimy podczas obserwacji mikroskopowej. Rozwojowi tych mikroorganizmów sprzyja podwyższona temp. ok. 30°C i dostęp powietrza, jednak mogą się rozwijać także w warunkach bardzo nieznacznych ilości tlenu (stąd pojawiają się w zakorkowanych butelkach). Bakterie octowe znoszą stężenie eta-



Rys. 3. Bakterie *Lactobacillus* wybarwione metodą Grama. Powiększenie x 1200

nolu do 16%, przy czym korzystna dla rozwoju jest zawartość alkoholu ok. 12%. Drobnoustroje te mogą przeżyć w piwnicy winiarskiej przez kilka lat. Znaczną rolę w rozprzestrzenianiu bakterii octowych odgrywa muszka octowa – *Drosophyla cellaris (aceti)* (Wzorek, Pogorzelski, 1998; Bartowski i wsp., 2003).

Należy zaznaczyć, że kwasy lotne, a szczególnie octowy, to uboczne produkty fermentacji i z tego względu znajdują się w niewielkich ilościach w każdym winie. Zgodnie z obowiązującym obecnie rozporządzeniem ministra rolnictwa i rozwoju wsi z dnia 4 lutego 2003 r. (Dz. U. Nr 25, poz. 223) zawartość kwasów lotnych w winie w przeliczeniu na kwas octowy nie powinna przekraczać $1,3 \text{ g/dm}^3$. Stwierdzenie wyższej kwasowości lotnej może świadczyć o octowaniu wina, czyli rozwoju bakterii octowych.

Drugą grupą bakterii występujących w winie stanowią bakterie fermentacji mlekowej. Należą tu gramodatnie ziarniaki z rodzajów: *Oenococcus*, *Pediococcus* oraz gramodatnie, nieprzetrwalnikujące pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* (rys. 3). W trakcie leżakowania wina przebiega w nim naturalny proces zwany fermentacją jabłkowo-mlekową, w wyniku której część kwasu jabłkowego znajdującego się w winie przechodzi pod wpływem działalności bakterii w kwas mlekowy i CO_2 . W rezultacie smak wina staje się bardziej miękki i harmonijny. Jeżeli natomiast wytworzenie kwasu mlekowego następuje kosztem cukrów przy

wzroście kwasów lotnych, mamy do czynienia z procesem nieprawidłowym. Najbardziej podatne na rozwój choroby są wina o pH powyżej 3,6, natomiast pH poniżej 3,3 ogranicza jej rozwój. Nie powoduje tego natomiast wyższa zawartość alkoholu, ponieważ bakterie te mogą bytować przy stężeniu przekraczającym 16% obj., a ich obecność stwierdzano jeszcze przy stężeniu 24% obj. Bakterie fermentacji mlekowej najlepiej rozwijają się w winach zawierających więcej produktów autolizy drożdży. Fermentacja mlekowa objawia się zapachem kiszzonej kapusty lub zsiadłego mleka, utratą klarowności i słodko-kwaśnym, niekiedy szczypiącym smakiem wina. W późniejszych stadiach w smaku i zapachu wyczuwalny bywa zjełczały tłuszcz. Fermentacji mlekowej często towarzyszą inne choroby, takie jak turn, śluzowacenie czy fermentacja manitowa (Wzorek, Pogorzelski, 1998).

Wystąpienie niekorzystnych zmian wywołane jest zaistnieniem warunków umożliwiających rozwój określonych mikroorganizmów. Stąd też przestrzeganie zasad prawidłowego procesu technologicznego, wsparte kontrolą technologiczną i mikrobiologiczną, ogranicza warunki sprzyjające rozwojowi choroby.

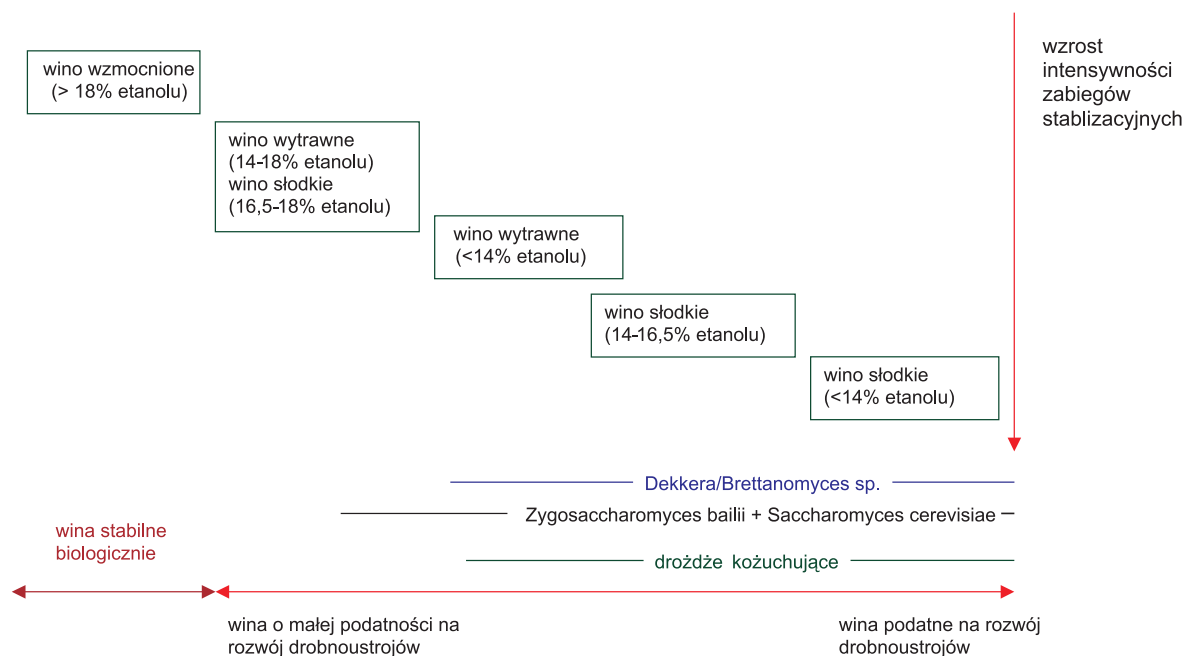
W celu uniemożliwienia rozwoju niepożądanych drobnoustrojów należy:

- Stosować dodatek SO_2 do moszczu.
- Zapewnić stałą temperaturę fermentacji, która powinna wynosić do 26°C , a w przypadku czerwonych win gronowych maksymalnie 30°C .
- Przestrzegać terminów ściągania wina z nad osadu (szczególnie po zakończeniu fermentacji burzliwej i na początku leżakowania). Przechodzące do napoju w wyniku autolizy drożdży substancje mogą być bardzo dobrymi składnikami odżywczymi dla rozwoju szkodliwych drobnoustrojów.
- Utrzymywać beczki i tanki w stanie całkowicie napełnionym (pod szpunt).
- Napełniać winem tylko zbiorniki dokładnie umyte i odkażone.
- Utrzymywać w pomieszczeniach leżakowni temperaturę nieprzekraczającą 15°C , najlepiej $8-12^\circ\text{C}$; w przypadku wyższej temp. wzrasta niebezpieczeństwo rozwoju szkodliwych mikroorganizmów.
- Utrzymywać w winach wytrawnych i półwytrawnych (oraz niektórych półsłodkich) odpowiednią ilość SO_2 wolnego: w białych ok. 25 mg/dm^3 , w czerwonych ok. 15 mg/dm^3 (Wzorek, Pogorzelski, 1998; Christaki, Tzia, 2002).

W przypadku zaistnienia pierwszych oznak, takich jak: zmiana barwy, utrata klarowności, wystąpienie posmaków i obcych zapachów, wytworzenie kożuszka należy niezwłocznie zidentyfikować przyczynę zmian. Dokonanie obserwacji pod mikroskopem kropli wina pozwala określić, czy powodem zmian jest rozwój drobnoustrojów.

W przypadku stwierdzenia choroby należy niezwłocznie przystąpić do leczenia wina, ponieważ im dalej są posunięte zmiany jakościowe, tym „kuracja” jest trudniejsza, a czasami wręcz niemożliwa. W większości przypadków wystąpienie i rodzaj choroby można stwierdzić na podstawie cech organoleptycznych, jednak w miarę możliwości trzeba wykorzystywać pomoc laboratorium mikrobiologicznego. Wspomniana obserwacja mikroskopowa wina pozwala stwierdzić, czy zakażenie jest spowodowane





Rys. 4. Podatność win na rozwój drobnoustrojów

rozwojem drożdży czy bakterii. Podczas obserwacji mikroskopowej zakażonego trunku trudno jest odróżnić bakterie mlekowe od octowych – możliwe jest poprzez wybarwienie preparatu bakterii metodą Grama, ponieważ – jak podano – bakterie octowe są gramujemne, a mlekowe gramodatnie.

Niekorzystne zmiany wywołane rozwojem drobnoustrojów występują nie tylko w piwnicy winiarskiej, ale mogą zachodzić także po rozlaniu napoju do butelek. Wina, w których nie ma możliwości rozwoju drobnoustrojów, to wina stabilne biologicznie.

Stabilność biologiczną określa się na podst. wzoru Dellego $\rightarrow K = c + 4,5a$, gdzie c – zawartość cukrów w % mieszanych (g/100ml), a a – zawartość alkoholu w % obj. Wina uważa się za stabilne biologicznie, jeśli współczynnik wynosi co najmniej 80, ale stwierdzano wzrost drobnoustrojów jeszcze przy współczynniku 83. Wartość ta zależy od składu wina i rodzaju drobnoustrojów, przy czym powszechnie przyjmuje się, że kryterium Dellego dotyczy drożdży (Bednarski, Reps, 2003).

Niektóre drożdże jednak mogą rozwijać się w warunkach wysokiego ciśnienia osmotycznego, czyli wysokich stężeń cukrów, a także w obecności etanolu i środków konserwujących (SO_2 i kwas sorbowy). Namnażają się one w butelkach, prowadząc fermentację. Powodują wytwarzanie specyficznych posmaków i zapachu, a w wyniku produkcji CO_2 mogą doprowadzać do eksplozji (rozrywania) butelek. Grupę tych niebezpiecznych drożdży stanowią: *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces lentus* oraz *Saccharomyces ludwigii* określane jako „nocna mara winiarstwa” (Steels i wsp., 1999). Podatność win na rozwój szkodliwych drobnoustrojów w zależności od zawartości w napojach alkoholu i cukrów resztkowych, przedstawiono na rys. 4.

W celu uniemożliwienia rozwoju drobnoustrojów w butelkach powinno się przed rozlewem prowadzić filtrację wina – w przypadku drożdży przez drobną ziemię okrzemkową lub płyty K7, a w przypadku bakterii poprzez filtrację sterylizującą (płyty EK, membranowe), ultrafiltrację lub mikrofiltrację. Trzeba pamiętać, że nie zawsze filtracja usuwa wszystkie

drobnoustroje. Bakterie przeżywające kilka miesięcy w winie, czyli w warunkach niekorzystnych dla wzrostu, mogą redukować swoje wymiary – w efekcie nie są zatrzymywane przez filtry o średnicy porów 0,45 μm . Ponadto w przypadku określania obecności bakterii metodą płytkową należy wydłużyć czas inkubacji płytek nawet do 15 dni (Millet, Lonvaud-Funel, 2000). W butelkach, gdy niewłaściwie przeprowadzono proces filtracji, mogą się także rozwijać drożdże *Brettanomyces/Dekkera*. Szczególnie podatne są tu wina zawierające cukry resztkowe i przechowywane w podwyższonej temperaturze. Rozwój tych drobnoustrojów powoduje powstanie nieprzyjemnego smaku i zapachu, określanego jako mokrej sierści, mysli lub zjełczały, w zależności od dominacji związków produkowanych przez drożdże (Gawel, 2004).

Należy przestrzegać zasad Dobrej Praktyki Produkcyjnej. Wejście Polski do UE wiąże się z koniecznością wprowadzania do zakładów HACCP-u, czyli analizy zagrożeń i kontroli krytycznych punktów. W przypadku rozlewu wina należy zwracać uwagę na przestrzeganie zasad higieny: mycia butelek, utrzymywania w czystości przewodów. W szczególności trzeba zwracać uwagę na złączenia, zakrzywienia; ważna jest również kontrola powietrza.

Literatura

- [1] Bartowsky E.J., Xia D., Gibson R.L., Fleet G.H., Henschke P.A., 2003, Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria, Lett. in Appl. Microbiol., 36, 307-314
- [2] Bednarski W., Reps A., 2003, Biotechnologia żywności, WNT
- [3] Christaki T., Tzia C., 2002, Quality and safety assurance in winemaking, Food Control, 13, 503-517
- [4] Fleet G.H., 2003, Yeast interactions and wine flavour, Inernt. J. Food Microbiol., 86, 11-22
- [5] Gawel R., 2004, Brettanomyces character in wine, strona internetowa, 03.02., www.aromadictionary.com/articles/brettanomyces_article.html
- [6] Millet V., Lonvaud-Funel A., 2000, The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage, Lett. in Appl. Microbiol., 30, 136-141
- [7] Steels H., James S.A., Roberts I.N., Stratford M., 1999, *Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature, J. Appl. Microbiol., 87, 520-527
- [8] Wzorek W., Pogorzelski E., 1998, Technologia winiarstwa gronowego i owocowego, SIGMA-NOT, Warszawa