

IWONA DROŻDŹ, MAGDALENA SŁOWIK, PAWEŁ SROKA,
MAŁGORZATA MAKAREWICZ

WPLYW *OENOCOCCUS OENI* NA PARAMETRY ENOLOGICZNE POLSKICH WIN GRONOWYCH

Streszczenie

Celem pracy było określenie parametrów enologicznych win odkwaszanych mikrobiologicznie. Przedmiotem badań były młode wina czerwone Marechal Foch i Frontenac oraz białe Seyval Blanc odkwaszane przy użyciu kultury starterowej Viniflora Oenos (*Oenococcus oeni*). Przed odkwaszaniem i po nim wykonano analizę zawartości alkoholu, kwasowości ogólnej, lotnej, polifenoli oraz oznaczono aktywność przeciwutleniającą i profil związków lotnych. Nie powiodła się próba zniwelowania nadmiernej kwasowości wina Frontenac. Stosowany do odkwaszania *O. oeni* spowodował zmniejszenie kwasowości ogólnej wina Marechal Foch o 28 %, a wina Seyval Blanc – o 12 %. Wykazano wzrost kwasowości lotnej we wszystkich badanych winach (w Marechal Foch o 69 %, we Frontenac o 20 % i w Seyval Blanc o 95 %). Stwierdzono wzrost aktywności przeciwutleniającej we wszystkich badanych winach i polifenoli ogółem w winach czerwonych po fermentacji jabłkowo-mlekowej. *O. oeni* spowodował wzrost zawartości octanu etylu oraz zmniejszenie octanu izobutyli i heksanianu etylu we wszystkich badanych winach. W badaniach wykazano ograniczoną przydatność szczepionki do odkwaszania win klimatu umiarkowanego o wysokiej kwasowości ogólnej i dużej zawartości alkoholu.

Słowa kluczowe: fermentacja jabłkowo-mlekowa (MLF), *Oenococcus oeni*, wino, odkwaszanie, polifenole

Wprowadzenie

Uważa się, że polskie wina gronowe mają mało wykwintny, zbyt ostry i kwaśny smak. Wynika to z niesprzyjających warunków uprawy winorośli, dzięki czemu polskie wina określa się winami klimatu chłodnego.

W celu zmniejszenia kwasowości win stosuje się kupażowanie względnie chemiczne lub biologiczne odkwaszanie. Proces mikrobiologicznego odkwaszania może zachodzić w winach po zakończeniu fermentacji etanolowej, pod wpływem bakterii

Dr I. Drożdż, mgr inż. M. Słowik, dr P. Sroka, dr M. Makarewicz, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, 30-149 Kraków, ul. Balicka 122. Kontakt: idrozd@ur.krakow.pl

fermentacji mlekowej (LAB – *lactic acid bacteria*) i nosi nazwę fermentacji jabłkowo-mlekowej (MLF – *malolactic fermentation*). Podczas MLF następuje przekształcenie mocno zdysocjowanego kwasu L-jabłkowego do słabo zdysocjowanego kwasu L-mlekowego trzema różnymi sposobami enzymatycznymi [21]. Przemiana powoduje redukcję kwasowości wina. Biologiczne odkwaszanie wpływa ponadto na cechy aromatyczno-smakowe wina oraz jego mikrobiologiczną stabilizację.

Bakterie kwasu mlekowego w winie pochodzą z powierzchni owoców lub są dodawane w postaci kultur starterowych [4, 35]. MLF przeprowadzana jest przez bakterie należące do rodzajów: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Pediococcus*. Bakteriami odkwaszającymi najczęściej izolowanymi z win są gatunki: *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii* i *Lactobacillus plantarum* [9, 13]. Ze względu na powszechność występowania i zdolność adaptacyjną *O. oeni* jest najczęstszą bakterią kultur starterowych [4, 18]. *O. oeni* to Gram dodatnie ziarniaki występujące w parach lub krótkich łańcuszkach. Są to fakultatywne beztlenowce, katalazoujemne, wykazujące charakter heterofermentatywny. W procesie fermentacji glukozy produkują kwas mlekowy, dwutlenek węgla, etanol i kwas octowy lub aldehyd octowy. Kwas jabłkowy wykorzystują jednak w pierwszej kolejności. Optymalne warunki do wzrostu: pH 4,8 i temp. 18 - 30 °C. *O. oeni* tolerują stosunkowo wysokie stężenia etanolu (> 15 % v/v), niskie pH (< 3,5), dwutlenek siarki (50 ÷ 100 mg/l – ogólny i 1 ÷ 10 mg/l – wolny) oraz ograniczoną dostępność składników odżywczych [8, 20]. Hamujący wpływ na ich rozwój wywierają kwasy tłuszczowe o średniej długości łańcucha, niedobór aminokwasów, niektóre fenole oraz drożdże i ich białkowe metabolity [6]. LAB wykazywać mogą również negatywne efekty, metabolizując związki powodujące „choroby” win.

Kompozycja składników chemicznych nadaje winom indywidualne cechy smakowo-zapachowe kształtowane przez związki pochodzące z surowca, powstałe podczas fermentacji i leżakowania. Na skład jakościowy i ilościowy substancji aromatyczno-smakowych wpływają również: rasa drożdży, warunki fermentacji, dostępność tlenu, a także dodatek innych substancji np. SO₂ [35]. Na bukiet oraz barwę wina wpływ mają alkohole, kwasy organiczne, garbniki, cukry, barwniki, związki azotowe i składniki mineralne. W mniejszych ilościach tłuszcze, estry, aldehydy, pektyny, substancje aromatyczne, witaminy i CO₂ [23]. Na szczególną uwagę zasługują związki lotne i polifenole.

Związki fenolowe są odpowiedzialne za różnice pomiędzy winami białymi i czerwonymi, w szczególności za ich barwę i smak. Są to nielotne składniki wina, które w interakcji ze związkami zapachowymi uwalniają aromat [25]. Wykazują właściwości prozdrowotne, bakteriostatyczne oraz przeciwutleniające. Związki polifenolowe to kwasy fenolowe i ich pochodne oraz flawonoidy (m. in. flawony, flawonole

i antocyjany) [28]. Do polifenoli zalicza się też antocyjany [22] oraz taniny, umożliwiające długoletnie leżakowanie i nadające specyficzny, ściągający smak [32].

Do związków lotnych zalicza się estry (octan etylu, octan izobutyli), alkohole, węglowodory, aldehydy (aldehyd octowy), acetale, ketony, kwasy organiczne oraz alkohole wyższe (m.in. izobutanol, alkohole amylowe oraz 2-feniloetanol) [35].

Celem pracy było określenie parametrów enologicznych polskich win gronowych odkwaszanych mikrobiologicznie. Badane wina poddano MLF za pomocą kultury starterowej *O. oeni*.

Material i metody badań

Materiałem badawczym były młode wina czerwone szczepów Marechal Foch i Frontenac oraz białe Seyval Blanc, po fermentacji alkoholowej. Wina pochodziły z winnicy UR w Krakowie, w Garlicy Murowanej.

Do odkwaszania używano szczepionki przemysłowej Viniflora Oenos (liofilizowane komórki *O. oeni* szczep DSM 7008; Chr Hansen, Dania). Bakterie *O. oeni* rozbankowano w 250 ml płynnej pożywki MRS. Gęstość komórek *O. oeni* (10^9 jtk/ml) wyznaczano za pomocą densytometru McFarlanda (Den-1B, Biosan). Wina, po 300 ml każde i w trzech powtórzeniach, zaszczepiano natychmiast po rozbankowaniu szczepionki (10^9 jtk/ml). Wszystkie zaszczepione próbki poddawano fermentacji jabłkowomlekowej (temp. 20 °C, 2 - 3 tygodnie, bez dostępu światła, próbki rozstawione losowo w pokoju fermentacyjnym).

Przed i po MLF w winach oznaczano zawartość wolnego i ogólnego dwutlenku siarki (SO₂) wg OIV-MA-AS323-04A, zawartość alkoholu wg OIV-MA-AS312-01B przy użyciu gęstościomierza (DenDi), pH wg OIV-MA-AS313-15, kwasowość ogólną wg OIV-MA-AS313-01 oraz kwasowość lotną wg OIV-MA-AS313-02 [24].

Aktywność przeciwutleniającą oznaczano metodą spektrofotometryczną. W tym celu przygotowano rodnik ABTS, w reakcji pomiędzy 7 mM solą amonową kwasu 2,2'azynobis(3-etylenobenzotiazolinowego) a 2,45 mM pirosiarczynem potasu. Rodnik stabilizowano 16 h w ciemności, w temp. 22 - 25 °C. Po tym czasie roztwór ABTS rozcieńczano buforem fosforanowym PBS tak, aby jego absorbancja przy $\lambda = 734$ nm wynosiła $A = 0,70 \pm 0,02$ (ABTS_{0,7}). Do kuwet odczytywano po 1 ml ABTS_{0,7} oraz 100 μ l badanej próbki. Dokładnie w 6. minucie od zmieszania dokonywano odczytu absorbancji względem PBS (próba kontrolna). Aktywność przeciwutleniającą wyrażano w mg Troloxu/100 ml. Wyniki odczytywano z krzywej kalibracyjnej dla syntetycznej witaminy E (Troloxu).

Zawartość związków polifenolowych ogółem oznaczano wg Sawin i Hillis [33]. Wina czerwone rozcieńczono 200 razy, a wino białe – 50 razy. Do oznaczenia pobierano 5 ml badanej próbki, dodawano 0,25 ml odczynnika Folina-Ciocalteau'a oraz 0,5 ml 7-procentowego roztworu Na₂CO₃. Próbki pozostawiano na 30 min w ciemno-

ści. Po tym czasie odczytywano absorbancję przy $\lambda = 760$ nm (spektrofotometr Beckman DU 650). Całkowitą zawartość polifenoli odczytano z krzywej wzorcowej roztworu (+)katechiny i wyrażano w mg/100 ml.

Wybrane związki lotne win oznaczano metodą chromatografii gazowej (Hewlett Packard 5890, seria II). Do fiolek o objętości 15 ml dodawano po 2 ml poszczególnych win ze wzorcem o stężeniu 40 mg/l (4-metylo-2-pentanol) oraz 1 g NaCl. Fiolki zamknięto zakrętkami z uszczelkami teflonowymi, po czym przenoszono do cieplarki o temp. 40 °C, mieszając jednocześnie za pomocą mieszadła magnetycznego. W warstwie nadpowierzchniowej umieszczano włókno SPME (PDMS, 100 μ m, Supelco) na 35 min. Zaadsorbowane anality desorbowano przez 3 min w dozowniku chromatografu gazowego (temp. dozownika i detektora 250 °C, programowana temp. kolumny: 35 °C/5 min, wzrost temp. z szybkością 5 °C/min do 110 °C, kolejny wzrost z szybkością 40 °C/min do 220 °C i utrzymanie stałej temp. przez 5 min). Identyfikacji ilościowej dokonywano na podstawie krzywych wzorcowych wykreślonych dla: octanu etylu, octanu izobutyłu, izobutanolu, alkoholi amylowych, heksanianu etylu, oktanianu etylu, octanu fenyletylu, laurynianu etylu oraz alkoholu fenyletylowego.

Oznaczenia wykonywano w minimum 3 powtórzeniach. Do określenia różnic między wartościami średnimi zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z testem post hoc Tukeya. Rozkład normalności określano za pomocą testu Kołgomorowa-Smirnowa w programie InStat3.

Wyniki i dyskusja

Na rozwój bakterii *O. oeni* hamujący wpływ mogą wykazywać: SO₂, wysokie stężenie etanolu i wysokie pH [4]. Dlatego próbki win przed odkwaszaniem analizowano pod względem tych parametrów i porównywano z zaleceniami producenta.

Siarkowanie win zabezpiecza je przed rozwojem niepożądaną mikroflorą. Bakterie mlekowe wykazują niewielką odporność na dwutlenek siarki. Według zaleceń producenta użytej szczepionki odkwaszającej zawartość wolnego SO₂ w winie nie powinna przekraczać 10 mg/l, a SO₂ ogólnego 30 mg/l. Badane wina były słabo siarkowane (tab. 1) i można było zastosować szczepionkę. Według literatury ogólny dwutlenek siarki w ilości 20 mg/l obniża aktywność fermentacji jabłkowo-mlekowej o 13 %. Natomiast antybakteryjne działanie SO₂ wzrasta wraz z obniżaniem się pH [9].

Bakterie *O. oeni* wykazują stosunkowo dużą odporność na obecność etanolu. Mogą rozwijać się w winach zawierających do 14 % obj. Badane wina spełniały wymagania dotyczące dopuszczalnego stężenia alkoholu (tab. 2). Podczas odkwaszania we wszystkich winach zawartość alkoholu nie uległa zmianie. Podobne wyniki uzyskali Abrahamse i Bartowsky [1].

Tabela 1. Zawartość SO₂ w badanych winach gronowych przed MLF.Table 1. Content of SO₂ in grape wines analyzed prior to MLF.

Zawartość SO ₂ Content of SO ₂	Rodzaj wina / Type of wine		
	Marechal Foch	Frontenac	Seyval Blanc
SO ₂ wolny [mg/l] Free SO ₂ [mg/l]	6	7	7
SO ₂ ogólny [mg/l] Total SO ₂ [mg/l]	16	18	15

Wartość średnia / mean value

Tabela 2. Zawartość alkoholu etylowego w badanych winach gronowych przed fermentacją jabłkowomlekową i po niej.

Table 2. Content of ethyl alcohol in grape wines analyzed prior to and after malolactic fermentation.

Zawartość alkoholu etylowego Content of ethyl alcohol	Rodzaj wina / Type of wine		
	Marechal Foch	Frontenac	Seyval Blanc
Przed MLF [% obj.] Prior to MLF [% obj.]	12,3 ± 0,1	12,7 ± 0,3	12,3 ± 0,1
Po MLF [% obj.] After MLF [% obj.]	12,0 ± 0,1	12,5 ± 0,2	12,0 ± 0,3

Wartość średnia ± odchylenie standardowe/ mean value ± standard deviation; n = 5.

W badanych winach czerwonych po MLF stwierdzono wzrost pH o ok. 0,1 ÷ 0,25 jednostki, natomiast w winie białym był on dwukrotnie wyższy (tab. 3). Producent szczepionki zaleca, aby pH win nie przekraczało 3,1. Przed odkwaszaniem pH obu analizowanych win czerwonych, Marechal Foch i Frontenac, było właściwe i proces odkwaszania przebiegł prawidłowo. Natomiast niższe od zalecanego pH wina białego Seyval Blanc mogło wzmocnić działanie antybakteryjne dwutlenku siarki, przyczyniając się do słabego namnożenia LAB i niedostatecznego odkwaszenia [4].

Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi [31] kwasowość win gronowych powinna się zawierać w przedziale 3,5 ÷ 9,0 g/l w przeliczeniu na kwas winowy. W badanych winach przed MLF średnia kwasowość ogólna kształtowała się powyżej górnej wartości. W wyniku odkwaszania stwierdzono statystycznie istotne ($p < 0,05$) obniżenie kwasowości ogólnej wina czerwonego Marechal Foch o 28 %, a białego Seyval Blanc – o 12 % (tab. 4). Kwasowość wina Frontenac zmniejszyła się o 2 %, pozostając powyżej górnej wartości.

Tabela 3. pH badanych win gronowych przed fermentacją jabłkowo-mlekową i po niej.

Table 3. pH of grape wines analyzed prior to and after malolactic fermentation.

pH	Rodzaj wina / Type of wine		
	Marechal Foch	Frontenac	Seyval Blanc
Przed MLF Prior MLF	3,37 ^a ± 0,00	3,07 ^a ± 0,00	2,43 ^a ± 0,00
Po MLF After MLF	3,64 ^b ± 0,06	3,27 ^b ± 0,02	3,28 ^b ± 0,03

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe/ mean value ± standard deviation; n = 3;

a, b – wartości oznaczone w kolumnach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy p < 0,05 / values in columns and denoted by different letters differ statistically significantly at p < 0.05.

Tabela 4. Kwasowość ogólna badanych win gronowych przed fermentacją jabłkowo-mlekową i po niej.

Table 4. Acidity of grape wines analyzed prior to and after malolactic fermentation.

Kwasowość ogólna Total acidity	Rodzaj wina / Type of wine		
	Marechal Foch	Frontenac	Seyval Blanc
Przed MLF [g kwasu winowego/l] Prior to MLF [g tartaric acid/l]	9,6 ^a ± 0,0	10,3 ± 0,1	8,9 ± 0,02
Po MLF [g kwasu winowego/l] After MLF [g tartaric acid/l]	6,9 ^b ± 0,3	10,0 ± 0,0	7,8 ± 0,1

Objaśnienia jak pod tab. 3. / Explanatory notes as in Tab. 3.

Pomimo znaczącego obniżenia kwasowości ogólnej wina Marechal Foch po MLF, wciąż pozostała ona na wysokim poziomie, co jest charakterystyczne dla win chłodnego klimatu. Dla porównania, w hiszpańskich winach Tempranillo i Merlot stwierdzono obniżenie kwasowości po MLF, odpowiednio: z 3,99 do 3,03 ÷ 3,53 g/l oraz z 5,13 do 3,65 ÷ 4,23 g/l kwasu winowego w zależności od użytego szczepu *O. oeni* [5]. Z kolei w białych winach zimnego klimatu po MLF odnotowano istotne zmniejszenie kwasowości [16]. Powodem tak wysokiej kwasowości badanych win mogły być warunki pogodowe w czasie dojrzewania winogron. Zawartość cukrów i kwasów w owocach zależy od stopnia nasłonecznienia i średnich temperatur panujących podczas wegetacji.

Kwasowość lotna win gronowych zgodnie z rozporządzeniem MRiRW [31] nie powinna przekraczać 1,3 g/l w przeliczeniu na kwas octowy. Kwasowość lotna badanych win przed i po MLF zawierała się poniżej tej wartości. W wyniku odkwaszania w winie Marechal Foch stwierdzono 69-procentowy wzrost kwasowości lotnej, a w winie Seyval Blanc – o 95 %, przy czym zmiany były statystycznie istotne (p < 0,05), a w winie Frontenac – o 20 % (tab. 5). Kwasowość lotna badanych win

gronowych po MLF była niska. W winach Tempranillo i Merlot stwierdzono wzrost kwasowości po MLF, odpowiednio: do $0,3 \div 0,51$ g/l oraz do $0,27 \div 0,38$ g/l kwasu octowego [5]. Różnice kwasowości lotnej mogą być wynikiem odmiennego prowadzenia fermentacji oraz składu mikroflory owoców. Ponadto, dobór szczepu drożdży do fermentacji alkoholowej oraz bakterii kwasu mlekowego do MLF w istotny sposób wpływa na kwasowość lotną [5].

Tabela 5. Kwasowość lotna badanych win gronowych przed fermentacją jabłkowo-mlekową i po niej.
Table 5. Volatile acidity of grape wines analyzed prior to and after malolactic fermentation.

Kwasowość lotna Volatile acidity	Rodzaj wina / Type of wine		
	Marechal Foch	Frontenac	Seyval Blanc
Przed MLF [g kwasu octowego/l] Prior to MLF [g acetic acid/l]	$0,3^a \pm 0,0$	$0,25 \pm 0,0$	$0,2^a \pm 0,0$
Po MLF [g kwasu octowego/l] After MLF [g acetic acid/l]	$0,4^b \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,0$	$0,4^b \pm 0,1$

Objaśnienia jak pod tab. 3. / Explanatory notes as in Tab. 3.

W winach czerwonych stwierdzono wzrost zawartości polifenoli po MLF, w przypadku wina Marechal Foch był on statystycznie istotny ($p < 0,05$) (tab. 6). Podobnie jak w niniejszej pracy, również włoskie wina charakteryzowały się zawartością polifenoli w granicach $783 \div 2209$ mg/100 ml [17]. W winie białym Seyval Blanc nie zaobserwowano zmian zawartości polifenoli (170 mg/100 ml), co stwierdzono również w winach niemieckich ($126 \div 271$ mg/100 ml) [15]. Wina czerwone odznaczają się ponad dziesięciokrotnie większą zawartością związków fenolowych, co jest wynikiem różnic w składzie chemicznym owoców i w procesie ich produkcji. Na zawartość polifenoli wpływ mają: odmiana winogron, stopień dojrzałości oraz nasłonecznienie w czasie dojrzewania owoców. Wina krajowe, z powodu krótkiego okresu wegetacyjnego i mniej sprzyjających warunków pogodowych, odznaczają się mniejszą zawartością polifenoli w porównaniu z winami pochodzącymi z krajów o cieplejszym klimacie [7, 14, 16].

Powodem wzrostu ilości związków polifenolowych podczas odkwaszania mogła być również aktywność enzymatyczna bakterii oraz mała specyficzność metody. *O. oeni* wykazuje niewielką zdolność do syntezy lotnych związków fenolowych, jednak ma enzymy hydrolizujące polimery flawanoli, a także wykazuje aktywność β -glukozydazy. Wina czerwone są bogate w taniny, które mogą zostać rozłożone do katechiny i epikatechiny, zwiększając tym samym poziom polifenoli ogółem. Po MLF stwierdzono wzrost zawartości epikatechiny i barwnych polimerów nawet o 15 mg/l [1]. Bakterie mlekowe mają również enzymy z rodzaju glikozydaz, które hydrolizują glikozydowe związki fenoli [8]. Dodatkowo *O. oeni* wykazuje największą wśród LAB

zdolność do produkcji amin, głównie histaminy i tyraminy. Powstające cząsteczki mogą zafałszowywać wynik, ponieważ odczynnik Folina-Ciocalteu'a reaguje z cukrami, aminami biogennymi i aromatycznymi, a także SO₂, witaminą C, aminokwasami, białkami, żelazem, miedzią, aldehydami i innymi związkami [26, 30].

Tabela 6. Zawartość polifenoli ogółem w badanych winach gronowych przed fermentacją jabłkowo-mlekową i po niej.

Table 6. Content of total polyphenols in grape wines analyzed prior to and after malolactic fermentation.

Zawartość polifenoli ogółem Content of total polyphenols	Rodzaj wina / Type of wine		
	Marechal Foch	Frontenac	Seyval Blanc
Przed MLF [mg katechiny/100 ml] Prior to MLF [mg catechin/100 ml]	1186 ^a ± 6	1224 ± 1	177 ± 2
Po MLF [mg katechiny/100 ml] After MLF [mg catechin/100 ml]	1713 ^b ± 154	1425 ± 183	169 ± 10

Objaśnienia jak pod tab. 3. / Explanatory notes as in Tab. 3.

W wyniku fermentacji jabłkowo-mlekowej nastąpił znaczący wzrost aktywności przeciwutleniającej badanych win (tab. 7). Powodem mogła być hydrolityczna działalność enzymów bakteryjnych. Rozkład estrów kwasów fenolowych i glikozydów prowadzi do uwolnienia ich formy kwasowej lub aglikonu, które wykazują największe bioaktywne właściwości przeciwutleniające. Zwiększeniu tej aktywności sprzyja enzymatyczna hydroliza białek. Wolne aminokwasy działają bowiem synergistycznie z przeciwutleniaczami [27]. Widoczna jest również zależność pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a pojemnością przeciwutleniającą badanych win czerwonych. Wzrost zawartości polifenoli powodował wzrost aktywności przeciwutleniającej, co obserwowano również w innych badaniach [15].

Tabela 7. Aktywność przeciwutleniająca win gronowych przed fermentacją jabłkowo-mlekową i po niej.

Table 7. Antioxidant activity in grape wines analyzed prior to and after malolactic fermentation.

Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity	Rodzaj wina / Type of wine		
	Marechal Foch	Frontenac	Seyval Blanc
Przed MLF [mg Troloxu/100 ml] Prior to MLF [mg Trolox /100 ml]	311 ^a ± 1	286 ^a ± 7	54 ^a ± 1a
Po MLF [mg Troloxu /100 ml] After MLF [mg Trolox /100 ml]	1125 ^b ± 5	787 ^b ± 18	87 ^b ± 3

Objaśnienia jak pod tab. 3. / Explanatory notes as in Tab. 3.

W wyniku odkwaszania wzrosła kwasowość lotna, a więc i stężenie octanu etylu (tab. 8). Związek ten istotnie wpływa na aromat wina. Charakteryzuje się zapachem owocowym (gruszka, brzoskwinia, ananas, malina) [12]. Jego próg wyczuwalności to 12,26 mg/l [10]. W stężeniu do 70 mg/l wpływa korzystnie na aromat, natomiast powyżej 150 mg/l – niekorzystnie [19]. W winach Marechal Foch i Seyval Blanc, w których proces odkwaszania przebiegał w najwyższym stopniu, zawartość octanu etylu zwiększyła się. Podobnie wzrost tego związku stwierdzono po MLF w hiszpańskich winach czerwonych [5] i w winach białych Riesling [16]. Natomiast w winach czerwonych Pinotage, odkwaszanych *O. oeni* stwierdzono zmniejszenie zawartości tego związku w jednym roku i wzrost w kolejnym [19].

We wszystkich badanych winach stwierdzono zmniejszenie zawartości heksanianu etylu i octanu izobutyli (tab. 8). Ten ostatni wyczuwalny jest w stężeniu 1,1 mg/l. W niskich stężeniach odpowiada za aromat owocowy (wiśnia, truskawka, malina), w większych ma nieprzyjemny zapach. Heksanian etylu charakteryzuje się aromatem truskawki i anyżu i jest wyczuwalny już w stężeniu 0,014 mg/l [11]. Zawartość obu substancji w badanych winach była zbyt mała, aby miała wpływ na aromat.

Alkohole amyłowe są wyczuwalne już w stężeniu 30 mg/l. Wprowadzają one do wina nutę fuzli, whisky, słodu i spalenizny. Pomimo swojego ostrego zapachu i szkodliwych właściwości są pożądane w winie, w ilościach do 350 mg/l [19]. Proces odkwaszania wywołał zmniejszenie zawartości alkoholi amyłowych, szczególnie w winie białym (tab. 8). W greckich białych winach stwierdzono zmniejszenie lub zwiększenie zawartości tych alkoholi w zależności od sposobu prowadzenia fermentacji [2]. Natomiast nie odnotowano zmian w ich ilości w winach czerwonych [19]. Zawartość pozostałych związków lotnych nieznacznie się zmniejszyła lub pozostała bez zmian.

Uzyskane wyniki świadczą o poprawie aromatu w wyniku działania bakterii odkwaszających. Zwiększenie stężenia estrów o nucie owocowej wzbogaciło aromat wina. Z drugiej strony została zmniejszona zawartość związków nadających winu niepożądane zapachy. Prawidłowo przeprowadzony proces odkwaszania umożliwia korektę bukietu wina [34]. Fenotypowa zmienność szczepów *O. oeni* ma zasadnicze znaczenie dla tworzenia różnych rodzajów wina (zróżnicowanie w tworzeniu wtórnych metabolitów). Szczególnie pożądane w winiarstwie jest wzmocnienie aromatów owocowych i jagodowych, które umożliwia MLF [3].

Kwasowość ogólna w winie Marechal Foch podczas MLF zmniejszyła się o ok. 3 g kwasu winowego/l, co odpowiada rozkładowi 6 g/l kwasu jabłkowego. W winie Frontenac nastąpiło zmniejszenie zawartości kwasów ogółem poniżej 0,5 g/l (rozkład ok. 1 g/l kwasu jabłkowego). W winie Seyval Blanc kwasowość ogólna zmniejszyła się o ponad 1 g/l, co było wynikiem rozkładu ponad 2 g/l kwasu jabłkowego. W winie

Tabela 8. Zawartość związków lotnych w badanych winach gronowych przed fermentacją jabłkowo-mlekową i po niej.
Table 8. Content of volatile compounds in grape wines analyzed prior to and after malolactic fermentation.

Związek lotny Volatile compound	Rodzaj wina / Type of wine							
	Marechal Foch		Frontenac		Seyval Blanc			
	Przed MLF to MLF	Po MLF After MLF	Przed MLF Prior to MLF	Po MLF After MLF	Przed MLF Prior to MLF	Po MLF After MLF	Przed MLF Prior to MLF	Po MLF After MLF
Octan etylu / Ethyl acetate	62,16 ^a ± 0,75	90,67 ^b ± 2,14	40,34 ^c ± 0,58	52,90 ^d ± 1,56	32,50 ^c ± 0,50	59,16 ^d ± 3,46		
Octan izobutyli Isobutyl acetate	0,40 ^a ± 0,01	0,27 ± 0,03b	0,39 ^a ± 0,01	0,28 ^b ± 0,01	0,52 ^a ± 0,01	0,27 ^b ± 0,01		
Izobutanol / Isobutanol	44,87 ± 0,76	41,91 ± 4,25	49,19 ± 0,27	46,43 ± 2,40	41,97 ± 0,64	37,87 ± 3,48		
Alkohole amyłowe Amyl alcohol	111,34 ± 0,55	108,72 ± 1,86	130,32 ± 0,62	124,55 ± 6,33	105,14 ^a ± 0,69	94,55 ^b ± 3,35		
Heksanian etylu Ethyl hexanoate	0,77 ^a ± 0,01	0,59 ± 0,01b	0,69 ^a ± 0,01	0,60 ^b ± 0,00	0,89 ^c ± 0,02	0,64 ^b ± 0,03		
Oktanian etylu Ethyl octanoate	0,58 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,68 ^a ± 0,01	0,58 ^b ± 0,01		
Octan fenyletyli Phenylethyl acetate	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,006		
Laurynian etylu Ethyl laurate	4,08 ± 0,01	4,08 ± 0,01	4,07 ± 0,00	4,07 ± 0,00	4,09 ± 0,01	4,09 ± 0,01		
Alk. fenyletylowy Phenylethyl alcohol	23,14 ± 1,09	23,82 ± 0,08	26,38 ± 0,55	26,27 ± 0,99	22,77 ± 0,70	23,02 ± 0,33		

Objaśnienia: / Explanatory notes:

wartość średnia ± odchylenie standardowe/ mean value ± standard deviation; n = 3;

a - d – wartości oznaczone w wierszach różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy $p < 0,05$ / values in lines and denoted by different letters differ statistically significantly at $p < 0,05$.

Marechal Foch i Seyval Blanc MLF przebiegła w większym stopniu niż w winie Frontenac. W wyniku odkwaszania poprawiły się właściwości fizykochemiczne badanych win. Jedynie słabe odkwaszenie wina Frontenac mogło być spowodowane wypadkową jego parametrów chemicznych, takich jak wysoka kwasowość ogólna, zawartość SO₂ i polifenoli. Z drugiej strony można zauważyć, że został zahamowany jedynie szlak konwersji kwasu jabłkowego do mlekowego, a uboczna działalność mikroflory odkwaszającej zachodziła w podobnym stopniu jak w winie Marechal Foch (wzrost pH o ok. 0,2 jednostki, poprawa właściwości przeciwutleniających oraz zmiany związków lotnych). Powodem takich wyników mogło być niskie pH badanych win, co wykazy wyniki innych autorów [16, 29].

Kultura starterowa *Viniflora oenos* używana jest do odkwaszenia i nadania winom klasycznego i czystego profilu smakowego, przy małej produkcji kwasów lotnych. Wina z owoców dojrzewających w klimacie umiarkowanym, z roczników o wyjątkowo niekorzystnych warunkach atmosferycznych, charakteryzują się wysoką kwasowością ogólną, małą zawartością cukrów i kwasów lotnych. Odkwaszanie takich win tylko przy użyciu zastosowanych bakterii *O. oeni* nie jest efektywne. Niezbędne byłoby wstępne odkwaszanie miazgi lub moszczu. Obniżenie kwasowości ogólnej o ponad 1 g/l przy zastosowaniu wyłącznie MLF nie jest zalecane, gdyż może prowadzić do pogorszenia aromatu.

Wnioski

1. W warunkach przeprowadzonych doświadczeń nie powiodła się próba zniwelowania nadmiernej kwasowości wina Frontenac. Stosowany do odkwaszania *O. oeni* spowodował zmniejszenie kwasowości ogólnej wina Marechal Foch (o ok. 28 %) oraz wina Seyval Blanc (o 12 %).
2. Po fermentacji jabłkowo-mlekowej prowadzonej przez *O. oeni* stwierdzono wzrost kwasowości lotnej we wszystkich badanych winach, w winie Marechal Foch o 69 %), we Frontenac – 20 %) i w Seyval Blanc – o 95 %.
3. W wyniku MLF stwierdzono wzrost aktywności przeciwutleniającej wszystkich badanych win i zwiększenie zawartości polifenoli ogółem w winach czerwonych. *O. oeni* spowodował wzrost zawartości octanu etylu oraz zmniejszenie ilości octanu izobutyli i heksanianu etylu we wszystkich badanych winach, a także zmniejszenie zawartości alkoholi amylowych z winie Seyval Blanc.

Literatura

- [1] Abrahamse C.E., Bartowsky E.J.: Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **28**, 255-265.

- [2] Agouridis N., Kopsahelis N., Plessas S., Koutinas A.A., Kanellaki M.: *Oenococcus oeni* cells immobilized on delignified cellulosic material for malolactic fermentation of wine. *Biores. Technol.*, 2008, **99**, 9017-9020.
- [3] Bartowsky E.J., Borneman A.R.: Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **92**, 441-447.
- [4] Bonin S., Bielawska M.: Rola bakterii fermentacji jabłkowo-mlekowej w winiarstwie. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 2013, **5-6**, 57-58.
- [5] Cañas P.M.I., Pérez-Martín F., Romer E.G., Prieto S.S., de los Llanos Palop Herreros M.: Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, **156**, 245-254.
- [6] Comitini F., Ciani M.: The inhibitory activity of wine yeast starters on malolactic bacteria. *Ann. Microbiol.*, 2007, **57**, 61-66.
- [7] Corder R.: *Dieta winna*. Bellona, Warszawa 2008.
- [8] Costantini A., Garcia-Moruno A., Moreno-Arribas M.V.: Biochemical Transformations Produced by Malolactic Fermentation. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Eds. M.V. Moreno-Arribas, C. Polo. Springer, 2009, pp. 27-49.
- [9] Du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S.: *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures-an overview. *Food Bioproc. Technol.*, 2011, **4**, 876-906.
- [10] Ferreira V., Aznáz M., Lopez R., Cacho J.: Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of grape extract. Key differences in the odour profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 4818-4824.
- [11] Ferreira V., Lopez R., Cacho J.F.: Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1659-1667.
- [12] Francis I.L., Newton J.L.: Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2005, **11**, 114-126.
- [13] Fugelsang K.C., Edwards C.G.: *Wine Microbiology*. Springer, Washington 2007.
- [14] Garcia-Ruiz A., Bartolom B., Martinem-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., Moreno-Arribas M.V.: Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 2008, **19**, 835-841.
- [15] Honer, K., Cervellati R., Neddens C.: Measurements of the in vitro antioxidant activity of German white wines using a novel method. *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, **214**, 356-360.
- [16] Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann M., Krieger-Weber S., du Toit M., Rauhut D.: Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World J. Microbiol., Biotechnol.*, 2012, **28**, 1143-1153.
- [17] Legin A., Rudnitskaya A., Lvova L., Vlasov Y., Di Natale C., D'Amico A.: Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception. *Anal. Chim. Acta*, 2003, **484**, 33-44.
- [18] Lopez I., Tenorio C., Zarazaga M., Dizy M., Torres C., Ruiz-Larrea F.: Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. *Eur. Food Res. Technol.*, 2007, **226**, 215-223.
- [19] Malherbe S., Tredoux A.G.J., Nieuwoudt H.H., du Toit M.: Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **39**, 477-494.
- [20] McKay M., Buglass A.J., Lee C.G.: Fermented Beverages: Beers, Ciders, Wines and Related Drinks. In: *Handbook of alcoholic beverages: technical, analytical and nutritional aspects*. Ed. A.J. Buglass. John Wiley, 2011, pp. 96-112.

- [21] Miller B.J., Franz C.M., Cho G.S., du Toit M.: Expression of malolactic enzyme gene (MLE) from *Lactobacillus plantarum* under winemaking conditions. *Curr. Microbiol.*, 2011, **62**, 1682-1688.
- [22] Monagas M., Bartolome B.: Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Eds. M.V. Moreno-Arribas, C. Polo. Springer, 2009, pp. 439-456.
- [23] Myśliwiec R.: *Wino i winorośl*. PWRL, Warszawa 2006.
- [24] OIV. *Compendium of International Methods of Wine and Musts Analysis*. Paris 2014.
- [25] Pozo-Bayon M.A., Reineccius G.: Interactions Between Wine Matrix Macro-Components and Aroma Compounds. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Eds. M.V. Moreno-Arribas, C. Polo. Springer, 2009, pp. 417-432.
- [26] Prior R.L., Wu X., Schaich K.: Standardized Methods for the Determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 4290-4302.
- [27] *Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne technologiczne molekularne i analityczne*. Red. W. Grajek. WNT, Warszawa 2007.
- [28] Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A.: *The Handbook of Enology: The Chemistry of Wine - Stabilization and Treatments*. John Wiley and Son. Ltd., Chichester 2006.
- [29] Rosi I., Fia G., Canuti V.: Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2003, **9**, 194-199.
- [30] Rosi I., Nannelli F., Giovani G.: Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Sci. Technol.*, 2009, **42**, 525-530.
- [31] Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 maja 2013 r. w sprawie rodzajów fermentowanych napojów winiarskich oraz szczegółowych wymagań organoleptycznych, fizycznych i chemicznych, jakie powinny spełniać te napoje. *Dz. U.* 2013 r., poz. 633.
- [32] Sikorski Z.E. (Red.): *Chemia żywności*, t. I. WNT, Warszawa 2007.
- [33] Swain T., Hillis W.E.: The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, 1959, **1**, 63-68.
- [34] Torriani S., Felis G.E., Fracchetti F.: Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. *Ann. Microbiol.*, 2011, **61**, 33-39.
- [35] Wzorek W., Pogorzelski E.: *Technologia winiarstwa owocowego i gronowego*. Wyd. Sigma, Warszawa 1998.

EFFECT OF OENOCOCCUS OENI ON PARAMETERS OF OENOLOGICAL POLISH WINES

Summary

The objective of the research study was to determine the oenological parameters of microbiologically de-acidified wines. *Marechal Foch* and *Frontenac*, young red wines, and *Seyval Blanc*, a white wine were the subject of the study; the wines studied were de-acidified using a starter culture of *Viniflora Oenos* (*Oenococcus oeni*). Prior to de-acidifying the wines and after it, the following was analysed: content of ethanol, total and volatile acidity, content of polyphenols; moreover, the antioxidant activity and profile of volatile compounds were determined. An attempt to reduce the excess acidity of the *Frontenac* wine failed. The *Oenococcus oeni* strains used for de-acidification caused the total acidity of the *Marechal Foch* wine to decrease by 28 %, and of the *Seyval Blanc* wine to decrease by 12 %. It was proved that the volatile acidity increased in all the wines studied (in *Marechal Foch* by 69 %, in *Frontenac* by 20 %, and in *Seyval Blanc* by 95 %). It was found that the antioxidant activity increased in all the wines analyzed, and

the content of total polyphenols increased only in the red wines after malolactic fermentation. In all the wines analyzed, *O. oeni* caused the content of ethyl acetate to increase and the contents of isobutyl acetate and ethyl hexanoate to decrease. The analyses performed proved that *O. oeni* had a limited usefulness in de-acidifying cool climate wines with a high total acidity and a high content of alcohol.

Key words: malolactic fermentation (MLF), *Oenococcus oeni*, wine, de-acidification, polyphenols ☒