

WPŁYW DROŹDŹY I BAKTERII MLEKOWYCH NA ZAWARTOŚĆ ZWIĄZKÓW LOTNYCH I INNE PARAMETRY ENOLOGICZNE WIN

Anna Stój

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w listopadzie 2019 r., zaakceptowano w kwietniu 2020 r.

Streszczenie: W pracy omówiono wpływ drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na zawartość związków lotnych, etanolu, glicerolu i kwasowość lotną win oraz znaczenie inokulacji drożdżami nie-*Saccharomyces* i *S. cerevisiae* dla poprawy złożoności aromatycznej i charakterystycznych cech win. Ponadto przedstawiono oddziaływanie sekwencyjnej inokulacji *S. cerevisiae* i bakterii mlekowych z gatunku *Oenococcus oeni* na zawartość związków lotnych, diacetylu, acetoiny, kwasowość lotną, degradację kwasu jabłkowego, zawartość bursztynianu dietylu, mleczanu etylu, amin biogennych oraz podkreślono zaletę jednoczesnej inokulacji, jaką jest skrócenie czasu fermentacji. Zwrócono uwagę na rolę rodzimych szczepów drożdży i bakterii mlekowych w zwiększeniu regionalnego charakteru win. Omówiono także znaczenie enzymów wytwarzanych przez drożdże i bakterie oraz wzrost zainteresowania zdolnością przeprowadzania fermentacji jabłkowo-mlekowej przez gatunki bakterii nie-*O. oeni*, takie jak *Lactobacillus* i *Pediococcus*.

1. Wprowadzenie. 2. Fermentacja alkoholowa i jabłkowo-mlekowa. 3. Wpływ drożdży i bakterii mlekowych na parametry enologiczne win. 3.1. *S. cerevisiae*. 3.2. Nie-*Saccharomyces*. 3.3. Bakterie mlekowe. 4. Podsumowanie

INFLUENCE OF YEAST AND LACTIC ACID BACTERIA ON THE CONTENT OF VOLATILE COMPOUNDS AND OTHER OENOLOGICAL PARAMETERS OF WINES

Abstract: The effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the content of volatile compounds, ethanol, glycerol and volatile acidity of wines as well as the importance of inoculation with non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* yeast for improving the aromatic complexity and characteristic features of wines were discussed in the paper. Moreover, the consequence of sequential inoculation of *S. cerevisiae* and lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* on the content of volatile compounds, diacetyl, acetoin, volatile acidity, degradation of malic acid, content of diethyl succinate, ethyl lactate, biogenic amines was presented. The advantage of simultaneous inoculation, which is the reduction of fermentation time, was emphasized. The work highlights the role of indigenous strains of yeast and lactic acid bacteria in increasing the regional character of wines. The importance of enzymes produced by yeast and bacteria, as well as the increased interest in the ability of non-*O. oeni* species, such as *Lactobacillus* and *Pediococcus*, to perform malolactic fermentation were also discussed.

1. Introduction. 2. Alcoholic and malolactic fermentation. 3. Effect of yeast and lactic acid bacteria on oenological parameters of wines. 3.1. *S. cerevisiae*. 3.2. Non-*Saccharomyces*. 3.3. Lactic acid bacteria. 4. Summary

Słowa kluczowe: wino, drożdże, bakterie mlekowe

Keywords: wine, yeast, lactic acid bacteria

1. Wprowadzenie

Wino jest złożoną matrycą, zawiera związki o różnych właściwościach chemicznych. Związki lotne kształtują aromat wina, zatem odgrywają ważną rolę w jego jakości sensorycznej [9, 88]. Aromat wina można podzielić na cztery grupy: odmianowy (typowy dla odmiany winorośli), pre-fermentacyjny (powstający podczas przetwarzania winogron), fermentacyjny (wytwarzany przez drożdże podczas fermentacji alkoholowej i bakterie w trakcie fermentacji jabłkowo-mlekowej) i po-fermentacyjny (powstający w wyniku dojrzewania wina) [52, 88]. Część związków aromatycznych wina jest uwalniana z winogron i/lub modyfikowana przez

drożdże i bakterie. Poprzez wybór kultury starterowej do przeprowadzenia fermentacji, można produkować wina o specyficznych profilach lotnych [77].

Tradycyjna fermentacja jest procesem spontanicznym prowadzonym sekwencyjnie przez różne rodzaje drożdży, naturalnie obecne na winogronach lub w winnicy. W nowoczesnym winiarstwie fermentacja alkoholowa zachodzi zazwyczaj przy użyciu kultur starterowych wybranych szczepów *S. cerevisiae* dostępnych w handlu [25]. Zastosowanie kultur startowych pozwala kontrolować proces fermentacji i poprawia jakość wina, z uwagi na redukcję wielu niepożądanych zapachów. Jednak w minionym dziesięcioleciu pojawiły się opinie, że używanie kultur starterowych doprowadziło do

* Autor korespondencyjny: dr inż. Anna Stój, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin; e-mail: anna.stoj@up.lublin.pl

standaryzacji sensorycznej win i utraty ich typowości związanej z terroir (obszarem uprawy winorośli i produkcji win). Z tego względu, obecnie rośnie znaczenie wyboru rodzimych, autochtonicznych szczepów, które lepiej aklimatyzują się do pierwotnego środowiska i powodują zachowanie typowych właściwości sensorycznych wina [21, 26]. Mikrobiom winogron i wina, zależy od odmiany winorośli, położenia geograficznego winnicy, warunków klimatycznych i praktyk agronomicznych i jest uważany przez winiarzy i enologów za ważny czynnik wpływający na zapach wina [9]. W kilku publikacjach opisano izolację, selekcję i analizę rodzimych szczepów *S. cerevisiae* [20, 78, 81]. Jednocześnie opublikowano prace dotyczące wykorzystania rodzajów innych niż *Saccharomyces* do produkcji wina [31, 55, 78]. Sugerowane jest wykorzystanie multi-starterowego inokulum złożonego z drożdży nie-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* w celu naśladowania spontanicznej fermentacji alkoholowej, uniknięcia ryzyka zahamowania lub powolnej fermentacji, a także polepszenia złożoności aromatycznej wina w porównaniu do fermentacji z czystą kulturą *S. cerevisiae* [21, 26].

W sprzyjających warunkach fermentacja jabłkowo-mlekowa może zachodzić spontanicznie. Wzrost populacji rodzimych bakterii mlekowych zależy od ich zdolności do wykorzystywania cukrów, aminokwasów i tolerowania wielu czynników stresowych, w tym kwasowości (pH < 3,5), SO₂ (> 10 mg/l), wysokich stężeń etanolu (> 16 % v/v) i niskich temperatur (< 12°C) [14, 23]. Jednak większość producentów wina woli zminimalizować ryzyko nieudanej lub powolnej fermentacji jabłkowo-mlekowej poprzez zaszczepienie niezawodną, dostępną w handlu kulturą starterową [6, 7, 14]. Bakterie mlekowe mogą być zaszczepione przed zakończeniem fermentacji alkoholowej lub po jej zakończeniu [7]. Gatunek *Oenococcus oeni* uważany jest za najbardziej wydajny i specyficzny dla fermentacji jabłkowo-mlekowej [53], aczkolwiek rośnie zainteresowanie wykorzystywaniem innych gatunków bakterii, np. *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus*, *P. damnosus* i *P. inopinatus*. Ponadto, w celu zwiększenia regionalnej tożsamości win, izolowane są również rodzime szczepy bakterii [7].

2. Fermentacja alkoholowa i jabłkowo-mlekowa

Podczas fermentacji alkoholowej (AF) z udziałem drożdży, obok etanolu i dwutlenku węgla, powstaje szereg lotnych metabolitów, których ilości są niewielkie, ale znaczące z punktu widzenia aromatu wina [77]. Należą do nich: alkohole wyższe, kwasy tłuszczowe, aldehydy, estry, ketony i lotne fenole [73]. Alkohole wyższe są przede wszystkim syntetyzowane przez drożdże w szlaku anabolicznym z glukozy oraz, w mniej-

szym stopniu, w szlaku katabolicznym z odpowiadających im aminokwasów, np. leucyna jest przekształcana w 3-metylo-1-butanol (alkohol izoamyłowy), walina w 2-metylo-1-propanol (alkohol izobutyłowy), a fenyloalanina w 2-fenyloetanol [38, 73]. Kwasy tłuszczowe mogą być wytwarzane przez drożdże za pośrednictwem szlaków anabolicznych lub podczas β-utleniania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Aldehydy powstają z nienasyconych kwasów tłuszczowych (kwas linolowy, kwas linolenowy) oraz w wyniku aktywności lipooksygenazy. Estry octanowe są produktami reakcji acetylo-CoA z alkoholami wyższymi, które powstają w wyniku degradacji aminokwasów, węglowodanów i lipidów. Estry etylowe kwasów tłuszczowych powstają pod wpływem enzymów drożdży i etanolizy acetylo-CoA, który jest wytwarzany podczas syntezy lub degradacji kwasów tłuszczowych. Ketony są produktami kondensacji aktywowanych kwasów tłuszczowych. Lotne fenole (np. 4-etylofenol) mogą powstawać wskutek dekarboksylacji kwasów hydroksycynamonowych [49, 65, 73, 80]. Wytwarzanie i zawartość metabolitów, pożądaných lub niepożądaných, powstających podczas fermentacji zależy od udziału poszczególnych rodzajów i szczepów drożdży [83].

Fermentacja jabłkowo-mlekowa (malolaktyczna; MLF) polega na konwersji kwasu jabłkowego do kwasu mlekowego i dwutlenku węgla przy udziale bakterii kwasu mlekowego [23, 75, 77]. Podstawowymi celami MLF jest redukcja kwasowości i poprawa stabilności mikrobiologicznej poprzez usunięcie kwasu jabłkowego – potencjalnego źródła węgla, który może być wykorzystany przez bakterie (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter*) i drożdże psujące (*Brettanomyces*). Ponadto efektem MLF jest modyfikacja aromatu wina [6, 14, 53]. Bakterie kwasu mlekowego produkują z kwasu cytrynowego związki karbonylowe lub acetonowe, w tym diacetyl, acetoinę i 2,3-butanodiol, przy udziale liaz cytrynianowej, co powoduje zwiększenie maślanego zapachu wina [75]. Fermentacja jabłkowo-mlekowa jest niezbędna w produkcji większości win czerwonych, pożądana w niektórych białych, a także w bazach win musujących [7, 76].

Szlaki metaboliczne i/lub reakcje biochemiczne przebiegające z udziałem drożdży oraz bakterii mlekowych są szczegółowo opisane w kilku pracach przeglądowych [9, 75, 77].

Moszcz winogronowy umożliwia wzrost ograniczonej liczby gatunków mikroorganizmów ze względu na niskie pH i wysoką zawartość cukru. Ponadto czynnikiem powodującym selekcję drożdży i bakterii jest dwutlenek siarki dodawany jako środek przeciwutleniający i konserwujący. W moszczu podczas fermentacji panują warunki beztlenowe, następuje wyczerpanie składników odżywczych i rośnie zawartość alkoholu, co eliminuje wrażliwe mikroorganizmy. Wśród mikro-

organizmów biorących udział w produkcji wina dominują drożdże. Należą one do następujących rodzajów: *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea* i *Zygosaccharomyces*. W spontanicznych fermentacjach, we wczesnych stadiach, obserwuje się wzrost rodzimych drożdży z rodzajów *Kloeckera*, *Hanseniaspora* i *Candida*, w środkowych etapach, gdy etanol wzrasta do 3–4% rośnie kilka rodzajów *Metschnikowia* i *Pichia*, a ostatnie etapy są zdominowane przez tolerujące alkohol szczepy *S. cerevisiae* [77].

Spośród bakterii, w winie powszechnie występują jedynie bakterie kwasu mlekowego i bakterie kwasu octowego. Bakterie mlekowe odgrywają ważną rolę w produkcji wina, natomiast bakterie octowe są uważane za mikroorganizmy psujące, wytwarzające aldehyd octowy i kwas octowy. Tylko cztery rodzaje bakterii kwasu mlekowego: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Pediococcus*, są w stanie przetrwać niekorzystne warunki panujące w winie. Najlepiej przystosowanym gatunkiem do przeprowadzenia MLF jest *O. oeni* [77].

3. Wpływ drożdży i bakterii mlekowych na parametry enologiczne win

3.1. *S. cerevisiae*

W winiarstwie, w większości przypadków, za fermentację alkoholową są odpowiedzialne komercyjne drożdże *S. cerevisiae*, które umożliwiają produkcję win o przewidywalnych cechach jakościowych. Są one zwykle stosowane jako kultury starterowe (aktywne drożdże suszone) [78]. Gammacurta i wsp. [34] rozważali wpływ różnych komercyjnych szczepów *S. cerevisiae* (jak również *O. oeni*) na profile aromatyczne win czerwonych. Wykazali, że stężenia estrów w winach z regionu Bordeaux zależały od szczepu *S. cerevisiae*. Znaczące różnice w produkcji estrów zaobserwowane pod koniec AF, nie ulegały zmianie po zakończeniu MLF i podczas dojrzewania.

Alternatywą dla *S. cerevisiae* mogą być także hybrydy międzygatunkowe drożdży *Saccharomyces*, dostępne w handlu. *Saccharomyces uvarum* i *Saccharomyces kudriavzevii* oraz ich hybrydy z *S. cerevisiae* wykazują dobre zdolności fermentacyjne w niskich temperaturach, co skutkuje winami o niższej zawartości etanolu, kwasu octowego oraz wyższej zawartości glicerolu i związków aromatycznych [66, 67]. Pérez-Torrado i wsp. [67] porównali parametry enologiczne szczepu hybrydowego *S. cerevisiae* × *S. uvarum* (S6U) oraz szczepów referencyjnych: *S. cerevisiae* T73 i *S. uvarum* CECT 12930, w dwóch moszczach z czerwonych wino-

gron (Bobal i Tempranillo) i dwóch białych (Macabeo i Parellada), poddanych fermentacji w czterech różnych temperaturach: 14, 18, 22 i 32°C. *S. uvarum* wykazywał największą wydajność fermentacji w niskich i średnich temp.: 14, 18 i 22°C, *S. cerevisiae* – w wysokiej temp.: 32°C, natomiast szczep hybrydowy S6U – w temp. 18°C. W temp.: 14, 18, 22°C, *S. uvarum* wytwarzał więcej glicerolu niż *S. cerevisiae*. W temp. 32°C wszystkie szczepy wytwarzały taką samą ilość glicerolu. Szczep *S. cerevisiae* zwykle wytwarzał najniższą ilość glicerolu (z wyjątkiem temp. 32°C), a drożdże hybrydowe wytwarzały średnie lub podobne do szczepu *S. uvarum* ilości glicerolu. *S. uvarum* i hybryda produkowały znacznie mniej kwasu octowego w porównaniu do *S. cerevisiae*, z wyjątkiem fermentacji przeprowadzonych w moszczu z winogron Bobal i fermentacji moszczów przeprowadzonych w temp. 32°C. Szczep hybrydowy był największym lub średnim producentem 2-metylo-1-propanolu i 3-metylo-1-butanolu, z wyjątkiem fermentacji w 32°C, i największym producentem bursztynianu dietylu w temperaturze 18°C w badanych moszczach oraz w temperaturze 22°C w moszczu Tempranillo i Bobal. Ponadto autorzy porównali sumę wszystkich związków aromatycznych, estrów i alkoholi wyższych produkowanych podczas fermentacji alkoholowej przez wszystkie szczepy w każdej temperaturze i w każdym moszczu. Szczep hybrydowy S6U wytworzył najwyższe poziomy związków aromatycznych w moszczach Tempranillo i Parellada w temp. 18°C, najwyższe poziomy estrów w Tempranillo w temp. 14°C oraz w Tempranillo i Parellada w temp. 18°C. Podobne wyniki uzyskali González i wsp. [37] w moszczach z winogron Macabeo i Tempranillo poddanych fermentacji w temperaturach: 14, 18, 22 i 32°C z udziałem *S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* i hybrydy *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii*.

Callejon i wsp. [18] porównali profile lotne win z odmiany Merlot wyprodukowanych przy udziale czterech rodzimych szczepów drożdży *S. cerevisiae* (MY, NY, OY, AGY) i jednego komercyjnego szczepu (XR). Handlowe drożdże wybrano zgodnie z preferencjami winnicy, a szczepy autochtoniczne wyizolowano z piwnicy tej winnicy i winnicy sąsiedniej. Zaobserwowane różnice były raczej ilościowe niż jakościowe. Stężenie większości związków lotnych istotnie zależało od szczepu drożdży. Najwyższe zawartości związków lotnych stwierdzono w dwóch winach wyprodukowanych przez autochtoniczne szczepy drożdży (M i N). Autochtoniczne szczepy drożdży wytwarzały wina (M, N, O, AG) o różnych profilach lotnych. Wino M wyróżniało się najwyższą ogólną zawartością estrów etylowych (np. mleczanu etylu i bursztynianu dietylu), alkoholi (1-heksanolu i cis-3-heksen-1-olu) i kwasów (np. kwasu heksanowego). Wino N miało najwyższą zawartość aldehydów (np. aldehydu octowego), wino O – najniższą zawartość kwasów, natomiast wino AG

– najwyższą zawartość estrów octanowych. Wszystkie autochtoniczne szczepy nadawały się do produkcji win o różnym stylu.

Wybrane do przeprowadzenia fermentacji kultury startowe (komercyjne) będące mikroorganizmami wyselekcjonowanymi, powodują standaryzację właściwości sensorycznych win [25]. Dlatego proponowane jest stosowanie rodzimych starterów, wybranych spośród drożdży bytujących w danym regionie geograficznym, jako narzędzie do produkcji win najwyższej jakości, posiadających typowe cechy związane z miejscem pochodzenia. Wiele grup badawczych zaproponowało wykorzystanie miejscowych szczepów, wyizolowanych z określonych środowisk i wybranych na podstawie właściwości technologicznych i cech jakościowych [26, 39, 81]. W przypadku selekcji miejscowych szczepów *S. cerevisiae* należy wziąć pod uwagę wiele ważnych kryteriów enologicznych, takich jak niska produkcja kwasowości lotnej, niska produkcja siarkowodoru, wysoka tolerancja na alkohol, wyczerpanie potencjału cukrowego, wysoka aktywność fermentacyjna, odporność na dwutlenek siarki czy odporność na niskie pH [57, 70]. Badania Tufariello i wsp. [81] wykazały wpływ bioróżnorodności rodzimych szczepów *S. cerevisiae*, wyizolowanych ze spontanicznej fermentacji win z winogron Negroamaro z dwóch mikroobszarów Salento (Włochy), na aromat win. Profile aromatyczne tych win różniły się zawartością octanów, estrów etylowych kwasów tłuszczowych i alkoholi wyższych i były ściśle związane z geograficznym pochodzeniem drożdży wykorzystywanych w procesie fermentacji. Badania te udowodniły, że zastosowanie rodzimej kultury starterowej wzmacnia specyficzny charakter wina związany z regionem produkcji. Grieco i wsp. [39] stwierdzili, że dwa autochtoniczne szczepy drożdży wyizolowane ze spontanicznej fermentacji win Primitivo z regionu Apulia (Włochy) są dobrymi kandydatami na przemysłowe kultury starterowe, ponieważ zdominowały fermentację i były zdolne wyprodukować wina charakteryzujące się specyficznymi cechami enologicznymi i organoleptycznymi. Wyniki analizy sensorycznej tych win były bardzo dobre. Podobne badania dotyczące selekcji i oceny miejscowych szczepów drożdży winnych przeprowadzono w wielu regionach uprawy winorośli, takich jak: Amyntaio (Grecja) [63], Xinjiang (Chiny) [57] czy Galicja (Hiszpania) [15].

3.2. Nie-*Saccharomyces*

Współczesne trendy w produkcji wina zwróciły się w kierunku mniej znanych rodzajów drożdży, innych niż *Saccharomyces*. Drożdże z tych rodzajów przeprowadzają pierwsze etapy naturalnej, spontanicznej fermentacji i zapewniają różnorodność aromatyczną win [11]. Czyste kultury drożdży innych niż *Saccharomyces*,

którymi szczepiono moszcze winogronowe, wytwarzały szereg metabolitów powodujących psucie win (kwas octowy, acetoina, octan etylu i aldehydu octowego), a także odpowiedzialnych za nieprzyjemny zapach (fenole winylowe i fenole etylowe związane z rozwojem *Brettanomyces/Dekkera*), co wyklucza stosowanie takich drożdży w wybranych kulturach starterowych. Jednak, gdy drożdże inne niż *Saccharomyces* są mieszane ze szczepem *S. cerevisiae*, ich negatywna aktywność metaboliczna może nie być wyrażona lub może być modyfikowana przez aktywność metaboliczną kultury starterowej *S. cerevisiae* [24, 25, 35]. Ponadto drożdże inne niż *Saccharomyces* na ogół nie są zdolne do zakończenia AF samodzielnie, dlatego muszą im towarzyszyć drożdże winiarskie *S. cerevisiae*. To można osiągnąć za pomocą inokulacji najpierw drożdżami nie-*Saccharomyces*, a następnie drożdżami winiarskimi *S. cerevisiae*, aby zakończyć fermentację. Jest to znane jako sekwencyjne szczepienie, w przeciwieństwie do jednoczesnej inokulacji (koinokulacji, kofermentacji, inokulacji mieszanej), w której dwa lub więcej rodzajów drożdży dodaje się w tym samym czasie. Drożdże inne niż *Saccharomyces* mają słabe zdolności fermentacyjne i mogą być hamowane przez *S. cerevisiae*, dlatego czas inokulacji może być kluczowy dla niektórych szczepów innych niż *Saccharomyces*, z punktu widzenia wpływu na skład wina lub profil sensoryczny [11, 12, 83].

W ostatnich latach, zaproponowano zastosowanie podczas fermentacji wina wybranych drożdży innych niż *Saccharomyces* wraz ze szczepem starterowym *S. cerevisiae*, w celu poprawy złożoności aromatycznej i charakterystycznych cech win [24, 25, 35]. Stosowanie drożdży innych niż *Saccharomyces* w procesach fermentacji poprawia parametry jakości, tzn. obniża zawartość etanolu, zwiększa zawartość glicerolu, polepsza złożoność aromatyczną win, zwiększa kwasowość, zwiększa zawartość antocyjanów, zwiększa zawartość polisacharydów i mannoprotein. Przy użyciu niektórych rodzajów innych niż *Saccharomyces* można również zmniejszyć zawartość amin biogennych lub karbaminianu etylu, związków szkodliwych, które wpływają na bezpieczeństwo żywności [11, 12]. W Tabeli I przedstawiono wyniki badań dotyczących wpływu inokulacji drożdżami nie-*Saccharomyces* i *S. cerevisiae* na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win.

Większość badań koncentrowała się na ocenie wpływu drożdży z rodzaju nie-*Saccharomyces* na związki lotne win. W kilku pracach oceniono wpływ enzymów wytwarzanych przez te drożdże na aromat win. Enzymy zwiększały uwalnianie związków lotnych podczas produkcji wina. β -glukozydaza ze szczepu *Hanseniaspora uvarum* wykazywała katalityczną specyficzność wobec aromatycznych glikozydów C13-norizoprenoidów i niektórych terpenów, powodując zwiększenie zawartości tych związków w winie i wzmocnienie

Tabela I

Wpływ inokulacji drożdżami *S. cerevisiae* i nie-*Saccharomyces* na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win w porównaniu do fermentacji z czystą kulturą *S. cerevisiae*

| Gatunek | Komercyjny/ endogeny | Technika inokulacji | Odmiana winorośli | Wpływ na związki aromatyczne i parametry enologiczne win | Piśmien- nictwo |
|--|----------------------------|-----------------------------|--|---|--------------------|
| <i>Toluraspóra delbrueckii</i> | komercyjny lub endogeny | sekwencyjna | Tempranillo | poprawa złożoności aromatycznej win; wyższa zawartość estrów; niższa produkcja glicerolu, 2,3-butanodiolu; wyższa produk- cja diacetylu, mleczanu etylu i octanu 2-fenyloetylu; produkcja 3-etoksypropanolu | [58] |
| <i>Toluraspóra delbrueckii</i> | komercyjny | mieszana lub sekwencyjna | Corvina, Rondinella, Corvione | wyższa zawartość 2-fenyloetanolu, alkoholu benzylowego, furfuralu, linalolu i α -terpi- neolu; niższa zawartość kwasu octowego, cyronellolu i nerolu | [4] |
| <i>Toluraspóra delbrueckii</i> | endogeny | sekwencyjna | Tempranillo | wyższa produkcja alkoholi wyższych; wyższa produkcja 2-metylo-1-propanolu, 2-fenyloetanolu, 1-butanolu i metionolu | [31] |
| <i>Lachancea thermotolerans</i> | endogeny | sekwencyjna | Tempranillo | wyższa produkcja alkoholi wyższych; wyższa produkcja 2-metylo-1-propanolu i 1-propanolu, acetoiny i mleczanu etylu | [31] |
| <i>Starmerella bacillaris (Candida zemplinina)</i> | endogeny | mieszana lub sekwencyjna | Barbera | wyższa produkcja związków lotnych; poprawa profilu aromatycznego; wyższa zawartość glicerolu | [30] |
| <i>Starmerella bacillaris (Candida zemplinina)</i> | endogeny | sekwencyjna | Cabernet sauvignon, Merlot, Pinot noir, Shiraz | niższa zawartość estrów ogółem; niższa zawartość octanu etylu; wyższa zawartość kwasów ogółem; wyższa zawartość glicerolu | [29] |
| <i>Starmerella bacillaris (Candida zemplinina)</i> | endogeny | mieszana lub sekwencyjna | Kotsifali, Mandilari | poprawa złożoności aromatycznej win | [64] |
| <i>Starmerella bacillaris (Candida zemplinina)</i> | endogeny | sekwencyjna | Shiraz | wyższa zawartość laktonów i terpenów | [87] |
| <i>C. stella</i> | komercyjny i endogeny | mieszana | Cabernet sauvignon | poprawa złożoności aromatycznej win; wyższa zawartość estrów, kwasów tłuszczowych i norizoprenoidów | [56] |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | endogeny | mieszana lub sekwencyjna | Cabernet sauvignon Ecolly | wyższa produkcja terpenów, C13-norizoprenoidów, estrów octanowych, estrów etylowych i kwasów tłuszczowych | [45] |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | komercyjny i endogeny | mieszana | Cabernet sauvignon | wyższa produkcja alkoholi wyższych | [56] |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | endogeny | sekwencyjna | Bolero, Rondo, Regent | wyższa produkcja glicerolu, octanu etylu i kwasu octowego | [55] |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | endogeny | sekwencyjna | Shiraz, Chardonnay | niższa zawartość etanolu; wyższa zawartość octanu etylu, fenyloetanolu i octanu 2-fenyloetanolu | [85] |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | endogeny | mieszana | Merlot | niższa zawartość etanolu; wyższa zawartość octanu etylu, estrów ogółem, alkoholi wyższych ogółem i związków siarki ogółem | [84] |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | endogeny | sekwencyjna | Tempranillo | wyższa produkcja alkoholi wyższych; wyższa produkcja 2-metylo-1-propanolu i metionolu | [31] |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | komercyjny i endogeny | mieszana | Cabernet sauvignon | poprawa złożoności aromatycznej win; wyższa produkcja alkoholi wyższych | [56] |
| <i>M. viticola</i> | endogeny | sekwencyjna | Bolero, Rondo, Regent | wyższa produkcja 2-heksenianu etylu i octanu (Z)-3-heksenyłu | [55] |
| <i>M. fructicola</i> | endogeny | sekwencyjna | Bolero, Rondo, Regent | wyższa zawartość pentanianu etylu, heptanianu etylu i octanu 2-metylopropylu | [55] |
| <i>Pichia kluyveri</i> | komercyjny | sekwencyjna | Shiraz | wyższa zawartość aldehydu octowego i 2-fenylooctanu etylu | [87] |

Tabela I. C.d.

| Gatunek | Komercyjny/ endogeny | Technika inokulacji | Odmiana winorośli | Wpływ na związki aromatyczne i parametry enologiczne win | Piśmien- nictwo |
|--|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|---|--------------------|
| <i>P. fermentans</i> | komercyjny i endogeny | mieszana | Cabernet sauvignon | poprawa złożoności aromatycznej win; wyższa zawartość estrów, kwasów tłuszczowych i norizoprenoidów | [56] |
| <i>Williopsis pratensis</i> | endogeny | sekwencyjna | Tempranillo | wyższa produkcja octanów; wyższa produkcja 2-fenylloctanu etylu | [31] |
| <i>Issatchenkia orientalis</i> i endogeny | komercyjny i endogeny | mieszana | Cabernet sauvignon | wyższa produkcja alkoholi wyższych | [56] |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | endogeny | mieszana lub sekwencyjna | Garnacha | niższa produkcja kwasu jabłkowego | [13] |

aromatów kwiatowych, słodkich, jagodowych i orzechowych [46]. Preparat glikozydazy ze szczepu *Rhodotorula mucilaginosa*, wykazujący wysoki poziom β -glukozydazy, hydrolizował glikozydy związków benzenowych i C13-norizoprenoidów, tak więc poprawiał aromaty kwiatowe i owocowe wina [47]. Z kolei *Kluyveromyces marxianus* miał wysoką aktywność β -liazy, a zatem wykazywał zdolność uwalniania tioli z prekursorów aromatów w winogronach [10]. Wysoki potencjał enzymatyczny drożdży nie-*Saccharomyces* sprawia, że stanowią przydatne narzędzie do poprawy aromatu win [8].

3.3. Bakterie mlekowe

W ciągu ostatnich lat opracowano i wprowadzono do handlu bakteryjne kultury starterowe do prowadzenia fermentacji jabłkowo-mlekowej (MLF). Przyczyniło się to do poprawy wydajności i niezawodności MLF. Najczęściej te kultury starterowe wykorzystują bakterie z gatunku *Oenococcus oeni*. Jednocześnie prowadzono badania mające na celu określenie optymalnego czasu zaszczepienia. Bakteryjne kultury starterowe *O. oeni* mogą być szczepione sekwencyjnie (po AF, technika tradycyjna) lub jednocześnie z drożdżami (na początku lub pod koniec AF) [7].

W winiarstwie najczęściej stosuje się szczepienie sekwencyjne. Opublikowano wiele prac dotyczących wpływu szczepienia sekwencyjnego na aromat i parametry enologiczne win. Costello i wsp. [27] wykazali, że zawartość związków aromatycznych w winie Cabernet Sauvignon, takich jak: diacetyl, mleczan etylu, estry etylowe kwasów tłuszczowych, kwasy lotne, alkohole wyższe, zależy od szczepu *O. oeni*, składu wina (szczególnie zawartości etanolu i pH przed MLF), a także od regionu pochodzenia winogron. Według Gammacurta i wsp. [33] stężenia większości związków lotnych w winach po fermentacji alkoholowej (AF) zależały od odmiany winogron (Cabernet Sauvignon i Merlot), natomiast były nieznacznie zmienione przez bakterie mlekowe. Jednak stężenia rozgałęzionych hydroksylowanych

estrów, takich jak 2-hydroksy-3-metylobutanian etylu i 2-hydroksy-4-metylopentanian etylu, były silnie związane ze szczepem bakterii, natomiast nie zależały od odmiany winogron lub drożdży używanych do AF. López i wsp. [59] badali wina Tempranillo zaszczepione dwiema kulturami starterowymi *O. oeni* i wina Tempranillo poddane spontanicznej MLF. Zaszczepienie win bakteriami mlekowymi *O. oeni* skróciło czas MLF do 19 dni, a wina miały bardziej świeży i owocowy charakter w porównaniu do poddanych spontanicznej MLF. Ponadto niskie początkowe stężenie aminokwasów i wykorzystanie tych związków podczas AF przez zaszczepione drożdże zaowocowało winami o bardzo niskim poziomie amin biogennych po MLF i 3-miesięcznym okresie przechowywania. Zatem wybór odpowiedniego startera ma znaczenie w produkcji win gatunkowych. Malherbe i wsp. [60] zaobserwowali istotne różnice w degradacji kwasu cytrynowego, zależące od kultury starterowej *O. oeni* i odmiany winogron z której wyprodukowano wina (Shiraz i Pinotage). Czynniki te wpłynęły na związki powstające w wyniku metabolizmu kwasu cytrynowego, takie jak: diacetyl, kwas octowy i acetoina. Zastosowanie kultur starterowych spowodowało wzrost stężeń alkoholi wyższych, kwasów tłuszczowych i estrów ogółem, przy większym wzroście estrów etylowych niż estrów octanowych w porównaniu do fermentacji spontanicznej. Ponadto wzrosły stężenia mleczanu etylu, bursztynianu dietylu, oktanianu etylu, 2-metylopropanianu etylu i propionianu etylu. Natomiast poziomy octanu heksylu, octanu izoamylu, octanu 2-fenylloetylu i octanu etylu zmniejszyły się lub pozostały niezmienione, w zależności od szczepu bakterii i odmiany winogron. Ruiz i wsp. [71] stwierdzili istotne statystycznie różnice w degradacji kwasu cytrynowego zarówno między winami z różnych odmian (Syrah, Tinto Pámpa Blanca, Cabernet Sauvignon i Merlot), jak i między szczepami *O. oeni* (komercyjny i endogeny). Endogeny *O. oeni* słabo rozkładał kwas cytrynowy w winach o niskim pH (3,13–3,71) lub wysokiej zawartości alkoholu (12,22–13,20% v/v), co oznacza, że fermentację jabłkowo-mlekową można

Tabela II

Wpływ jednoczesnego i sekwencyjnego szczepienia *S. cerevisiae* i *O. oeni* na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win

| Szczep <i>O. oeni</i> | Odmiana winorośli | Technika inokulacji | Wpływ na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win | Piśmienictwo |
|-----------------------|---|-----------------------------|--|--------------|
| endogeny | Tempranillo, Merlot | jednoczesna lub sekwencyjna | jednoczesna: skrócenie czasu fermentacji, brak wyraźnej degradacji kwasu jabłkowego, brak nadmiernego wzrostu kwasowości lotnej, wyższa zawartość kwasu cytrynowego, niższa zawartość amin biogennych, wyższa zawartość mleczanu etylu, niższa zawartość bursztynianu dietylu sekwencyjna: niższa zawartość kwasu cytrynowego, wyższa zawartość amin biogennych, niższa zawartość mleczanu etylu, niższa zawartość bursztynianu dietylu | [50] |
| komercyjny | Negroamaro | jednoczesna lub sekwencyjna | jednoczesna: skrócenie czasu fermentacji, niższa kwasowość lotna, wyższa zawartość bursztynianu dietylu i mleczanu etylu, wyższa ogólna zawartość estrów, alkoholi i kwasów sekwencyjna: wyższa kwasowość lotna, niższa ogólna zawartość estrów alkoholi i kwasów | [79] |
| komercyjny | Tannat | jednoczesna lub sekwencyjna | jednoczesna: zablokowanie fermentacji, wyższa kwasowość lotna sekwencyjna: zakończenie fermentacji | [62] |
| komercyjny | Cabernet sauvignon, Merlot, Teroldego, Marzemino | jednoczesna lub sekwencyjna | jednoczesna: spowolnienie aktywności drożdży, niższa zawartość kwasu jabłkowego, wyższa zawartość kwasu octowego sekwencyjna: problem z degradacją kwasu jabłkowego | [43] |
| komercyjny | 100 odmian, np. Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Sangiovese, Valpolicella | jednoczesna lub sekwencyjna | jednoczesna: skrócenie czasu fermentacji, niższa zawartość kwasu octowego sekwencyjna: wydłużenie czasu całkowitej degradacji kwasu jabłkowego, wyższa zawartość kwasu octowego | [5] |
| komercyjny | Shiraz | jednoczesna lub sekwencyjna | jednoczesna: skrócenie czasu fermentacji, mniejsze ryzyko zakażenia mikrobiologicznego sekwencyjna: wydłużenie czasu stabilizacji wina | [1] |
| komercyjny | Merlot | jednoczesna lub sekwencyjna | jednoczesna: skrócenie czasu fermentacji, wyższa zawartość octanu etylu, bursztynianu dietylu, diacetylu sekwencyjna: wydłużenie czasu fermentacji, niższa zawartość octanu etylu, bursztynianu dietylu, diacetylu | [3] |
| endogeny | Cabernet franc | jednoczesna lub sekwencyjna | jednoczesna: skrócenie czasu fermentacji, brak nadmiernego wzrostu kwasowości lotnej sekwencyjna: wydłużenie czasu fermentacji | [19] |

przedłużyć bez ryzyka wytworzenia wysokich stężeń diacetylu i acetoiny. Natomiast różnice w zawartości głównych związków lotnych i amin biogennych między szczepami były nieznaczne.

Obecnie proponowane jest jednoczesne szczepienie moszczu drożdżami i bakteriami na początku fermentacji, szczególnie w przypadku moszczów o wysokiej kwasowości lub zawartości cukru, czemu towarzyszy wysoka zawartość etanolu po zakończeniu AF [76]. W przypadku jednoczesnego szczepienia bakterie mają korzystniejsze warunki do wzrostu, ponieważ w moszczu winogronowym jest więcej składników odżywczych niż w winie, mniej alkoholu i innych inhibitorów wytwarzanych przez drożdże, np. peptydów [7]. W Tabeli II przedstawiono wpływ jednoczesnego i sekwencyjnego szczepienia *S. cerevisiae* i *O. oeni* na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win. Niewątpliwą zaletą jednoczesnego szczepienia, zwiększającą opłacalność produkcji win, jest skrócenie czasu winifikacji, co udowodniono w większości badań [1,

3, 5, 19, 50, 79]. Fakt ten stwarza możliwość szybszej stabilizacji wina, a tym samym zmniejsza ryzyko zakażenia mikrobiologicznego [1]. Jednak nieliczne badania wykazały, że jednoczesne szczepienie spowalnia wzrost i pogarsza żywotność komórek drożdży, co może prowadzić do spowolnienia lub zablokowania AF [43, 62], zwiększając przy tym kwasowość lotną spowodowaną wyższą produkcją kwasu octowego przez heterofermentacyjny *O. oeni* (metabolizm cukru). Przeciwnie w innej pracy stwierdzono brak nadmiernego wzrostu kwasowości lotnej [50], a nawet niższą kwasowość lotną w przypadku koinokulacji, w porównaniu do szczepienia sekwencyjnego [5, 79]. Inną zaletą jednoczesnego szczepienia jest niższa zawartość amin biogennych [50].

Zmiany chemiczne podczas jednoczesnego zaszczepienia zależą silnie od szczepów drożdży i bakterii mlekowych, ich wzajemnych interakcji, czasu szczepienia, a także od odmiany winogron i składu chemicznego moszczu [3, 62, 79]. Jednoczesne szczepienie drożdży i bakterii w moszczu o niekorzystnym składzie

chemicznym (niskiej zawartości azotu) może być obiecującą alternatywą dla szczepienia sekwencyjnego. Konieczna jest jednak staranna kontrola składu moshczy, zarówno chemicznego (pH, zawartość cukrów), jak i mikrobiologicznego (negatywne interakcje między drożdżami i bakteriami), w celu uzyskania warunków niezawodnej aktywności mikrobiologicznej w pierwszych etapach produkcji wina [43]. Ponadto istnieje potrzeba dalszych badań nad jednoczesnym szczepieniem przy użyciu bakterii i drożdży w różnych warunkach winiarskich (temperatura, pH, zawartość SO₂, zawartość etanolu), zanim będzie ono zalecane jako praktyka enologiczna [5].

Podobnie jak w przypadku drożdży autochtonicznych, rośnie zainteresowanie zastosowaniem rodzimych szczepów *O. oeni*, w celu zwiększenia regionalnego charakteru win. W kilku laboratoriach wyizolowano i zidentyfikowano rodzime szczepy *O. oeni*, a także oceniono ich wpływ na aromat i inne parametry enologiczne win [19, 22, 32, 36, 50, 72]. Pochodzenie wina nabiera znaczenia w kontekście różnicowania produktów na rynku. Zwiększenie regionalnej tożsamości wina potencjalnie zwiększy jego atrakcyjność i wartość rynkową [7].

Spśród bakterii mlekowych, gatunek *O. oeni* jest najczęściej badany i stosowany w winiarstwie do zapoczątkowania MLF. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie zdolnością przeprowadzania MLF także przez inne rodzaje bakterii mlekowych, takie jak *Lactobacillus* i *Pediococcus* [76]. W przeszłości unikano tych rodzajów ze względu na ich negatywny wpływ na wino. *Lactobacillus* powodował psucie się wina, w tym mysi posmak i nadmiar kwasu octowego, a niektóre szczepy *Pediococcus damnosus* zwiększały lepkość win w związku z syntezą egzopolisacharydów. Jednak nowsze badania wykazały, że niektóre szczepy *Lactobacillus*, a także *Pediococcus* nie wykazują negatywnych cech i nadają się do indukcji MLF [7, 28, 86]. Bravo-Ferrada i wsp. [16] wyizolowali i scharakteryzowali 53 szczepy *Lactobacillus plantarum* z patagońskiego wina Pinot noir, w celu opracowania komercyjnych kultur starterowych. Do dalszych badań wybrali 8 szczepów, na podstawie zdolności do tolerowania alkoholu o stężeniu 14%. Następnie autorzy zbadali tolerancję różnych czynników przez te szczepy (wysoka zawartość etanolu, pH, SO₂), aktywności glukozydazy i tanazy, wykorzystanie cytrynianu, obecność genów biorących udział w syntezie amin biogennych oraz konsumpcję kwasu L-jabłkowego. Wyniki otrzymane dla wybranych szczepów *L. plantarum* porównali z wynikami dla szczepu *O. oeni* UNQOe 73, również wyizolowanego z patagońskiego wina Pinot noir. Izolaty *L. plantarum* wykorzystywały wyższe ilości kwasu jabłkowego niż *O. oeni* UNQOe 73. Izolat UNQLp 155 wykazywał lepszy wzrost niż UNQOe 73 w warunkach stresowych

(50 ppm SO₂, pH 3,5), a także dobrą aktywność malolaktyczną i implantację w sterylnym winie. UNQLp 133 był w stanie rosnać tak samo jak *O. oeni* UNQOe 73 w sterylnym winie. Zdolności do wzrostu i wykorzystania kwasu jabłkowego przez szczepy UNQLp 155 i UNQLp 133 zdecydowały o poddaniu ich dalszym testom w winnicy pod kątem technologicznym. Brizuela i wsp. [17] zbadali zdolność do przetrwania w winie Pinot noir, konsumpcję kwasu L-jabłkowego i wpływ na profil lotny dwóch szczepów *O. oeni* (UNQOe 31b, UNQOe 73.2) i dwóch szczepów *L. plantarum* (UNQLp 11, UNQLp 155). Oba szczepy *O. oeni* i jeden szczep *L. plantarum* (UNQLp 11) pozostały żywotne, zużywając kwas L-jabłkowy z jednoczesnym wzrostem zawartości kwasu L-mlekowego. Po 20 dniach inkubacji zaszczepionego, sterylnego wina, zawartość kwasu L-mlekowego wynosiła 2,86 g/l dla UNQOe 73.2 oraz 2.53 g/l dla UNQLp 11 i UNQOe 31b. Szczepy UNQLp 11 i UNQOe 31b produkowały wyższe stężenia alkoholi i niższe stężenia estrów w porównaniu do UNQOe 73.2. Ponadto UNQOe 73.2 wytwarzał odpowiedni poziom diacetylu (1,15 mg/l) i wyższe stężenia estrów owocowych (octan izobutyli, octan izoamylu, octan heksylu, oktanian etylu, dekanian etylu), które są charakterystyczne dla win Pinot noir. Z kolei Lerm i wsp. [54] stwierdzili, że zarówno szczepy *O. oeni*, jak i *L. plantarum* mogą zostać wykorzystane jako kultury starterowe, przy czym szczepy *L. plantarum* posiadały geny kodujące β-glukozydazę, dekarboksylazę kwasu fenolowego, iminopeptydazę prolinową i aminopeptydazę metioninową. Pierwszą komercyjną kulturę starterową, będącą mieszaniną bakterii *O. oeni* i *L. plantarum*, opracowano w Instytucie Biotechnologii Wina na Uniwersytecie Stellenbosch. Głównym celem dodania kultury *Lactobacillus* do kultury *Oenococcus* był jej korzystny wpływ na cechy sensoryczne [2]. Strickland [74] badał wpływ kilku szczepów *Pediococcus parvulus*, *P. damnosus* i *P. inopinatus* na skład chemiczny i jakość sensoryczną win Pinot noir pochodzących z Oregonu i Waszyngtonu. Poszczególne szczepy znacznie różniły się pod względem degradacji kwasu L-jabłkowego, produkcji kwasu D-mlekowego, diacetylu, a także wpływu na cechy sensoryczne win. Wszystkie szczepy były zdolne do co najmniej częściowej degradacji kwasu jabłkowego, a dwa szczepy całkowicie zdegradowały kwas jabłkowy. Żaden ze szczepów nie wytwarzał wysokiego poziomu amin biogennych. Wszystkie szczepy degradowały kwas p-kumarowy do 4-winylofenolu, co w konsekwencji przyspieszało produkcję 4-etylofenolu przez *Brettanomyces bruxellensis* w układzie modelowym. Ponadto w winach zwiększyły się pożądane aromaty „kwiatowe” i „czerwonych owoców”. Juega i wsp. [51] wykazali, że *P. damnosus*, biorący udział w fermentacji malolaktycznej win białych (Albarino i Caino), nie produkował amin biogennych i egzopolisacharydów.

Zaobserwowali w winach zwiększenie takich cech jak: „ciało”, „miętkość”, aromat miodowy, a także zmniejszenie aromatu ziołowego i kwasowości. Konieczne są dalsze badania nad wpływem *Pediococcus* na właściwości sensoryczne win [86].

Bakterie mlekowe, zarówno *O. oeni*, jak i nie-*O. oeni* mają szeroki zakres aktywności enzymatycznych, z których wiele może potencjalnie wpływać na skład wina, a tym samym na jego właściwości organoleptyczne [6]. Największe znaczenie z punktu widzenia aromatu wina mają: glikozydazy, β -glukozydazy, esterazy, dekarboksylazy kwasów fenolowych i liazy cytrynianowe [23, 40, 41, 48, 82]. Wykazano, że na aktywność enzymatyczną glikozydazy *O. oeni* ma wpływ pH wina, zawartość etanolu i cukru resztkowego [42]. Stopień uwalniania związanych glikozydowo związków aromatycznych zależy nie tylko od rodzaju bakterii mlekowych, ale także od szczepu [44]. Podobne wyniki otrzymano w przypadku badań esterazy [61, 68], czy liazy cytrynianowej [69].

4. Podsumowanie

Zawartość związków lotnych i inne parametry enologiczne win zależą, poza czynnikami technologicznymi, od: gatunku drożdży (*S. cerevisiae*, różne gatunki inne niż *Saccharomyces*) i bakterii (*O. oeni*, nie-*O. oeni*), tego czy moszcz szczepiono tylko drożdżami *S. cerevisiae*, czy też drożdżami nie-*Saccharomyces* i *S. cerevisiae*, techniki szczepienia *S. cerevisiae* i *O. oeni* (jednoczesna, sekwencyjna), aktywności enzymatycznych drożdży i bakterii, a także interakcji między mikroorganizmami. Proponowane jest stosowanie rodzimych szczepów drożdży i bakterii mlekowych, wyselekcjonowanych spośród występujących w danym regionie, do produkcji win najwyższej jakości, posiadających typowe cechy związane z miejscem pochodzenia. Zastosowanie podczas fermentacji wina wybranych drożdży innych niż *Saccharomyces* wraz ze szczepem starterowym *S. cerevisiae* poprawia złożoność aromatyczną i charakterystyczne cechy win. Jednoczesne szczepienie moszczy/win drożdżami i bakteriami mlekowymi może być obiecującą alternatywą dla szczepienia sekwencyjnego, zwiększającą opłacalność produkcji win, poprzez skrócenie czasu winifikacji. Istnieje jednak potrzeba dalszych badań nad jednoczesnym szczepieniem w różnych warunkach winiarskich (temperatura, pH, zawartość SO_2 , zawartość etanolu), zanim będzie zalecane jako praktyka enologiczna. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie zdolnością przeprowadzania MLF przez inne rodzaje bakterii mlekowych, takie jak *Lactobacillus* i *Pediococcus* (do handlu wprowadzono kulturę starterową *L. plantarum* oraz kulturę będącą mieszaną *O. oeni* i *L. plantarum*). Jednak niewiele jest

prac dotyczących tych bakterii, stąd konieczne są dalsze badania w tym kierunku. Drożdże i bakterie wykazują wiele aktywności enzymatycznych, które mogą poprawiać aromat win. Wpływ na aromat win mają również interakcje drożdże-drożdże i drożdże-bakterie.

Piśmiennictwo

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.* **28**, 255–265 (2012)
2. Anchor Oenology, <http://www.oenobrand.com/en/our-innovation/mlf-starter-cultures> (7.04.2020)
3. Antalick G., Perello M.C., de Revel G.: Co-inoculation with yeast and LAB under winery conditions: modification of the aromatic profile of Merlot wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **34**, 223–232 (2013)
4. Azzolini M., Fedrizzi B., Tosi E., Finato F., Vagnoli P., Scrinzi C., Zapparoli G.: Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 303–313 (2012)
5. Azzolini M., Tosi E., Vagnoli P., Krieger S., Zapparoli G.: Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Ital. J. Food Sci.* **3**, 257–263 (2010)
6. 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. Biot.* **92**, 441–447 (2011)
7. Bartowsky E.J., Costello P.J., Chambers P.J.: Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Aust. J. Grape Wine R.* **21**, 663–669 (2015)
8. Belda I., Ruiz J., Alastruey-Izquierdo A., Navascués E., Marquina D., Santos A.: Unraveling the enzymatic basis of wine “flavorome”: a phylo-functional study of wine related yeast species. *Front Microbiol.* **7**, 12 (2016)
9. Belda I., Ruiz J., Esteban-Fernández A., Navascués E., Marquina D., Santos A., Moreno-Arribas M.: Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules*, **22**, 189 (2017)
10. Belda I., Ruiz J., Navascués E., Marquina D., Santos A.: Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β -lyase activity. *Int. J. Food Microbiol.* **225**, 1–8 (2016)
11. Benito S.: The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in wine-making. *Appl. Microbiol. Biot.* **102**, 3081–3094 (2018)
12. Benito S.: The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Appl. Microbiol. Biot.* **102**, 6775–6790 (2018)
13. Benito S., Palomero F., Gálvez L., Morata A., Calderón F., Palmero D., Suárez-Lepe J.A.: Quality and composition of red wine fermented with *Schizosaccharomyces pombe* as sole fermentative yeast, and in mixed and sequential fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotech.* **52**, 376 (2014)
14. Betteridge A., Grbin P., Jiranek V.: Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends Biotechnol.* **33**, 547–553 (2015)
15. Blanco P., Mirás-Avalos J.M., Pereira E., Fornos D., Orriols I.: Modulation of chemical and sensory characteristics of red wine from Mencía by using indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **48**, 63–74 (2014)
16. Bravo-Ferrada B.M., Hollmann A., Delfederico L., La Hens D.V., Caballero A., Semorile L.: Patagonian red wines: selection of

- Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1537–1549 (2013)
17. Brizuela N.S., Bravo-Ferrada B.M., Pozo-Bayón M.Á., Semorile L., Tymczyszyn E.E.: Changes in the volatile profile of Pinot noir wines caused by Patagonian *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains. *Food Res. Int.* **106**, 22–28 (2018)
 18. Callejon R.M., Clavijo A., Ortigueira P., Troncoso A.M., Paneque P., Morales M.L.: Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Anal. Chim. Acta*, **660**, 68–75 (2010)
 19. Cañas P.M.I., Romero E.G., Pérez-Martín F., Seseña S., Palop M.L.: Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. *Food Sci. Technol. Int.* **21**, 203–212 (2015)
 20. Capece A., Siesto G., Romaniello R., Lagreca V.M., Pietrafesa R., Calabretti A., Romano P.: Assessment of competition in wine fermentation among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes in Tuscany region. *LWT – Food Sci. Technol.* **54**, 485–492 (2013)
 21. Capozzi V., Garofalo C., Chiriatti M.A., Grieco F., Spano G.: Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* **181**, 75–83 (2015)
 22. Capozzi V., Russo P., Beneduce L., Weidmann S., Grieco F., Guzzo J., Spano G.: Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 327–334 (2010)
 23. Cappello M.S., Zapparoli G., Logrieco A., Bartowsky E.J.: Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **243**, 16–27 (2017)
 24. Ciani M., Comitini F.: Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.* **61**, 25–32 (2011)
 25. Ciani M., Comitini F., Mannazzu I., Domizio P.: Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* **10**, 123–133 (2010)
 26. Comitini F., Capece A., Ciani M., Romano P.: New insights on the use of wine yeasts. *Curr. Opin. Food Sci.* **13**, 44–49 (2017)
 27. Costello P.J., Francis I.L., Bartowsky E.J.: Variations in the effect of malolactic fermentation on the chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine: Interactive influences of *Oenococcus oeni* strain and wine matrix composition. *Aust. J. Grape Wine R.* **18**, 287–301 (2012)
 28. Du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S.: *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures – an overview. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 876–906 (2011)
 29. Englezos V., Rantsiou K., Cravero F., Torchio F., Giacosa S., Ortiz-Julien A., Gerbi V., Rolle L., Cocolin L.: Volatile profiles and chromatic characteristics of red wines produced with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* **109**, 298–309 (2018)
 30. Englezos V., Torchio F., Cravero F., Marengo F., Giacosa S., Gerbi V., Rantsiou K., Rolle L., Cocolin L.: Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT Food Sci. Technol.* **73**, 567–575 (2016)
 31. Escribano-Viana R., González-Arenzana L., Portu J., Garijo P., López-Alfaro I., López R., Santamaría P., Gutiérrez A.R.: Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts. *Food Res. Int.* **112**, 17–24 (2018)
 32. Franquès J., Araque I., El Khoury M., Lucas P.M., Reguant C., Bordons A.: Selection and characterization of autochthonous strains of *Oenococcus oeni* for vinification in Priorat (Catalonia, Spain). *OENO One*, **52**, 45–56 (2018)
 33. Gammacurta M., Lytra G., Marchal A., Marchand S., Barbe J.C., Moine V., de Revel G.: Influence of lactic acid bacteria strains on ester concentrations in red wines: Specific impact on branched hydroxylated compounds. *Food Chem.* **239**, 252–259 (2018)
 34. Gammacurta M., Marchand S., Albertin W., Moine V., de Revel G.: Impact of yeast strain on ester levels and fruity aroma persistence during aging of Bordeaux red wines. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 5378–5389 (2014)
 35. García M., Esteve-Zarzoso B., Arroyo T.: Non-*Saccharomyces* yeasts: Biotechnological role for wine production (w) Grape and Wine Biotechnology, red. Morata A., Loira I., InTech, Rijeka, 2016, s. 249–272
 36. Garofalo C., El Khoury M., Lucas P., Bely M., Russo P., Spano G., Capozzi V.: Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *J. Appl. Microbiol.* **118**, 1395–1408 (2015)
 37. González S.S., Gallo L., Climent M.D., Barrio E., Querol A.: Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 11–18 (2007)
 38. Gonzalez R., Morales P.: Wine secondary aroma: understanding yeast production of higher alcohols. *Microb. Biotechnol.* **10**, 1449–1450 (2017)
 39. Grieco F., Tristezza M., Vetrano C., Blevé G., Panico E., Mita G., Logrieco A.: Exploitation of autochthonous micro-organism potential to enhance the quality of Apulian wines. *Ann. Microbiol.* **61**, 67–73 (2011)
 40. Grimaldi A., Bartowsky E., Jiranek V.: Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 1061–1069 (2005)
 41. Grimaldi A., Bartowsky E., Jiranek V.: A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* **105**, 233–244 (2005)
 42. Grimaldi A., McLean H., Jiranek V.: Identification and partial characterization of glycosidic activity of commercial strains of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, 362–369 (2000)
 43. Guzzon R., Villega T.R., Pedron M., Malacarne M., Nicolini G., Larcher R.: Simultaneous yeast-bacteria inoculum. A feasible solution for the management of oenological fermentation in red must with low nitrogen content. *Ann. Microbiol.* **63**, 805–808 (2013)
 44. Hernandez-Orte P., Cersosimo M., Loscosa N., Cacho J., Garcia-Moruno E., Ferreira V.: Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **42**, 773–778 (2009)
 45. Hu K., Jin G.J., Xu Y.H., Tao Y.S.: Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* **108**, 119–127 (2018)
 46. Hu K., Qin Y., Tao Y.S., Zhu X.L., Peng C.T., Ullah N.: Potential of glycosidase from non-*Saccharomyces* isolates for enhancement of wine aroma. *J. Food Sci.* **81**, M935–M943 (2016)
 47. Hu K., Zhu X.L., Mu H., Ma Y., Ullah N., Tao Y.S.: A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: its application potential in wine aroma enhancement. *Lett. Appl. Microbiol.* **62**, 169–176 (2016)
 48. Iorizzo M., Testa B., Lombardi S.J., García-Ruiz A., Muñoz-González C., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V.: Selection

- and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release. *LWT-Food Sci. Technol.* **73**, 557–566 (2016)
49. Ivanova Petropulos V., Bogeva E., Stafilov T., Stefova M., Siegmund B., Pabi N., Lankmayr E.: Study of the influence of maceration time and oenological practices on the aroma profile of Vranec wines. *Food Chem.* **165**, 506–514 (2014)
 50. Izquierdo Cañas P.M., Pérez-Martin F., Romero E.G., Prieto S.S., Herreros M.D.L.L.P.: Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines. *Int. J. Food Microbiol.* **156**, 245–254 (2012)
 51. Juega M., Costantini A., Bonello F., Cravero M.C., Martínez-Rodríguez A.J., Carrascosa A.V., García-Moruno E.: Effect of malolactic fermentation by *Pediococcus damnosus* on the composition and sensory profile of Albarino and Caino whitewines. *J. Appl. Microbiol.* **116**, 586–595 (2013)
 52. Lambrechts M.G., Pretorius I.S.: Yeast and its importance to wine aroma – A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97–127 (2000)
 53. Lasik M.: The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: a review. *Eur. Food Res. Technol.* **237**, 843–850 (2013)
 54. Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M.: Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **32**, 280–295 (2011)
 55. Liu J., Arneborg N., Toldam-Andersen T.B., Petersen M.A., Bredie W.L.: Effect of sequential fermentations and grape cultivars on volatile compounds and sensory profiles of Danish wines. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 3594–3602 (2017)
 56. Liu P.T., Lu L., Duan C.Q., Yan G.L.: The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT-Food Sci. Technol.* **71**, 356–363 (2016)
 57. Liu N., Qin Y., Song Y., Ye D., Yuan W., Pei Y., Xue B., Liu Y.: Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains in Shanshan County (Xinjiang, China) for winemaking and their aroma-producing characteristics. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 1781–1792 (2015)
 58. Loira I., Vejarano R., Bañuelos M.A., Morata A., Tesfaye W., Uthurry C., Villa A., Cintora I., Suárez-Lepe J.A.: Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT-Food Sci. Technol.* **59**, 915–922 (2014)
 59. López R., López-Alfaro I., Gutiérrez A.R., Tenorio C., Garijo P., González-Arenzana L., Santamaría P.: Malolactic fermentation of Tempranillo wine: contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition. *Int. J. Food Sci. Tech.* **46**, 2373–2381 (2011)
 60. Malherbe S., Tredoux A.G., 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. Biot.* **39**, 477–494 (2012)
 61. Matthews A., Grbin P., Jiranek V.: Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 329–337 (2007)
 62. Muñoz V., Beccaria B., Abreo E.: Simultaneous and successive inoculations of yeasts and lactic acid bacteria on the fermentation of an unsulfited Tannat grape must. *Braz. J. Microbiol.* **45**, 59–66 (2014)
 63. Nikolaou E., Soufleros E.H., Bouloumpasi E., Tzanetakis N.: Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiol.* **23**, 205–211 (2006)
 64. Nisiotou A., Sgouros G., Mallouchos A., Nisiotis C.S., Michaelidis C., Tassou C., Banilas G.: The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Res. Int.* **111**, 498–508 (2018)
 65. Nogueroles-Pato R., González-Barreiro C., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J.: Quantitative determination and characterization of the main odourants of Mencía monovarietal red wines. *Food Chem.* **117**, 473–484 (2009)
 66. Pérez-Torrado R., Barrio E., Querol A.: Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 1780–1790 (2018)
 67. Pérez-Torrado R., González S.S., Combina M., Barrio E., Querol A.: Molecular and enological characterization of a natural *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* **204**, 101–110 (2015)
 68. Pérez-Martín F., Seseña S., Izquierdo P.M., Palop M.L.: Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *Int. J. Food Microbiol.* **163**, 153–158 (2013)
 69. Pretorius N., Engelbrecht L., du Toit M.: Influence of sugars and pH on the citrate metabolism of different lactic acid bacteria strains in a synthetic wine matrix. *J. Appl. Microbiol.* **127**, 1490–1500 (2019)
 70. Regodón J.A., Pére F., Valdés M.E., De Miguel C., Ramirez M.: A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol.* **14**, 247–254 (1997)
 71. Ruiz P., Izquierdo P.M., Seseña S., García E., Palop M.L.: Malolactic fermentation and secondary metabolite production by *Oenococcus oeni* strains in low pH wines. *J. Food Sci.* **77**, M579–M585 (2012)
 72. Ruiz P., Izquierdo P.M., Seseña S., Palop M.L.: Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int. J. Food Microbiol.* **137**, 230–235 (2010)
 73. Stój A., Czernecki T., Domagała D., Targoński Z.: Comparative characterization of volatile profiles of French, Italian, Spanish, and Polish red wines using headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry. *Int. J. Food Prop.* **20**, S830–S845 (2017)
 74. Strickland M.T.: Effects of *Pediococcus* spp. on Oregon Pinot noir, Master of Science in food science and technology thesis. Oregon State University, Corvallis, 2012
 75. Styger G., Prior B., Bauer F.F.: Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **38**, 1145–1159 (2011)
 76. Sumbly K.M., Grbin P.R., Jiranek V.: Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biot.* **98**, 8111–8132 (2014)
 77. Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A., Pretorius I.: Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine R.* **11**, 139–173 (2005)
 78. Tempère S., Marchal A., Barbe J. C., Bely M., Masneuf-Pomarede I., Marullo P., Albertin W.: The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biot.* **102**, 3995–4007 (2018)
 79. Tristezza M., di Feo L., Tufariello M., Grieco F., Capozzi V., Spano G., Mita G.: Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *LWT – Food Sci. Technol.* **66**, 406–412 (2016)
 80. Tufariello M., Capone S., Siciliano P.: Volatile components of Negroamaro red wines produced in Apulian Salento area. *Food Chem.* **132**, 2155–2164 (2012)
 81. Tufariello M., Chiriatti M.A., Grieco F., Perrotta C., Capone S., Rampino P., Tristezza M., Mita G., Grieco F.: Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile

- profile of Negroamaro wines. *LWT – Food Sci. Technol.* **58**, 35–48 (2014)
82. Ugliano M., Moio L.: The influence of malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* strain on glycosidic aroma precursors and related volatile compounds of red wine. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 2468–2476 (2006)
83. Varela C.: The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biot.* **100**, 9861–9874 (2016)
84. Varela C., Barker A., Tran T., Borneman A., Curtin C.: Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Int. J. Food Microbiol.* **252**, 1–9 (2017)
85. Varela C., Sengler F., Solomon M., Curtin C.: Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* **209**, 57–64 (2016)
86. Wade M.E., Strickland M.T., Osborne J.P., Edwards C.G.: Role of *Pediococcus* in winemaking. *Aust. J. Grape Wine R.* **25**, 7–24 (2018)
87. Whitener M.E.B., Stanstrup J., Carlin S., Divol B., du Toit M., Vrhovsek U.: Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Aust. J. Grape Wine R.* **23**, 179–192 (2017)
88. Zhu F., Du B., Li, J.: Aroma compounds in wine (w) Grape and wine biotechnology, red. Morata A., Loira I., InTech, Rijeka, 2016, s. 273–284