

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244793 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437993**

(22) Data zgłoszenia: **2021.05.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.12.05 BUP 49/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.03.04 WUP 10/2024**

(51) MKP:

C12G 1/022 (2006.01)

C12G 3/02 (2019.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

DOROTA KRĘGIEL, Łódź, PL

EWELINA PAWLIKOWSKA, Stróża, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska, Łódź, PL

(54) Tytuł:

**Sposób zapobiegania rozwojowi mikroflory zanieczyszczającej podczas fermentacji
moszczu z miazgą owocową**

PL 244793 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób zapobiegania rozwojowi mikroflory zanieczyszczającej podczas fermentacji moszczu z miazgą owocową.

Technologia produkcji winiarskiej jest odmienna dla win białych, czerwonych i różowych. Przy produkcji win białych fermentuje się oddzielony od miazgi moszcz z jasnych winogron, natomiast przy produkcji win czerwonych poddaje się fermentacji moszcz z miazgą owocową.

Fermentację moszczu z miazgą owocową stosuje się do owoców kolorowych, szczególnie do wiśni, porzeczek czarnych, śliwek węgerek, aronii, czerwemchy czy tarniny. W czasie tego procesu dochodzi do ekstrakcji barwników i tanin, głównie ze skórki owoców. Taninę ze skórki owocowych jest stosunkowo łatwo uwolnić, gdyż już niewielka ilość alkoholu wyzwała ich ekstrakcję. Jednak w przypadku słabszych jakościowo owoców, uszkodzonych mechanicznie lub nadpsutych, lub też kiedy skórki zawierają mniej barwników i tanin, należy ten proces znacząco skrócić, aby do nastawu nie wprowadzić zbyt wiele tanin gorszej jakości, pochodzących na przykład z pestek owoców. Większość barwników i tanin przechodzi do wina w ciągu pierwszych kilku dni. Proces ekstrakcji jest wspierany przez temperaturę – im jest ona wyższa tym ekstrakcja następuje szybciej. Jednak wówczas szybciej przechodzą do nastawu również gorzkie taniny z pestek.

Zatem dobierając czas fermentacji moszczu z miazgą owocową należy wziąć pod uwagę temperaturę fermentacji, rodzaj i stopień dojrzałości owoców oraz szczep drożdży użyty do fermentacji.

Fermentacja moszczu z miazgą owocową przynosi wiele korzyści, m.in. łatwiejszą obróbkę owoców i więcej pozyskanego moszczu. Niestety, w czasie przechowywania i fermentacji trwającym nawet do 7 dni, moszcz z miazgą owocową jest szczególnie narażona na zainfekowanie drobnoustrojami, w tym bakteriami i grzybami pleśniowymi. Podatność moszczu z miazgą owocową zwłaszcza na wzrost mikroflory grzybowej, w tym pleśni toksynotwórczych z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* lub *Alternaria* stanowi istotny problem technologiczny. Toksyny (mikotoksyny) wytwarzane przez niektóre szczepy pleśni jako wtórne metabolity wykazują różnorodne działania toksyczne (mutagenne, teratogenne i estrogenne). Szczególnie niebezpieczną mikotoksyną w tym środowisku jest patulina – metabolit niektórych gatunków pleśni z rodzaju *Penicillium*, *Aspergillus* oraz *Byssoschlamys*, często występujących jako mikroflora zanieczyszczająca w przetwórnictwie owocowo-warzywnym. Z chemicznego punktu widzenia patulina jest dwupierścieniowym laktonem, związkiem o bardzo dużej toksyczności wynikającej z wysokiej reaktywności z białkami oraz kwasami nukleinowymi. Patulina wykrywana jest dość często w krajowych owocach, sokach owocowych i innych przetworach. Uszkodzenia mechaniczne skórki owoców i wilgotne środowisko stymulują проникnięcie grzybów do miąższu owoców oraz ich wzrost i tworzenie mikotoksyn. (czasopismo *Mycotoxin Research* 2008, 24, 135–139).

Obecność mikotoksyn w produktach winiarskich niesie ze sobą potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumentów (czasopismo *Food Research International* 2018, 103, 478–491). Należy więc bezwzględnie nie dopuszczać do rozwoju grzybów w przerabianym materiale roślinnym.

W celu zapobiegania rozwojowi pleśni w czasie fermentacji moszczu z miazgą owocową zaleca się stosowanie dobrych jakościowo owoców, maksymalne skrócenie procesu nawet do 3 dni, a w niezbędnych przypadkach stosowanie związków chemicznych jako sztucznych stabilizatorów.

Często w celu zapobiegania rozwojowi pleśni w środowisku o pH poniżej 6,5 stosowany jest sorbinian potasu (E202). Jest to łagodnie działający konserwant, zwykle stosowany w stężeniach 0,025–0,10%.

Inną metodę chemiczną może stanowić tzw. siarkowanie. Siarczyny (E221, E225) są często stosowane przez winiarzy, aby zahamować rozwój szkodliwej mikroflory oraz zminimalizować utlenianie związków barwnych. Większość populacji konsumenckiej może bezpiecznie spożywać siarczyny znajdujące się w winie przy minimalnym ryzyku wystąpienia niepożądanych skutków ubocznych. Jednak według amerykańskiej agencji Food and Drug Administration (FDA) szacunkowo 1% populacji jest wrażliwa na siarczyny, a około 5% z tych osób cierpi na astmę. W przypadku osób z astmą, które są wrażliwe na te związki, spożywanie ich może podrażniać drogi oddechowe (czasopismo *Consumer* 1987, 20, 10–13).

Nie zawsze wyżej wymienione sposoby konserwacji można zastosować w produkcji winiarskiej, na przykład w produkcji tak zwanych win organicznych. Są to wyroby produkowane z upraw owoców nie traktowanych herbicydami i pestycydami. Poza tym w tego typu winach istnieje ograniczenie regulujące użycie siarczynów o około 30%.

Znane są drożdże z kładu *Metschnikowia* sp. wykazujące wysoką aktywność anty- drobnoustrojową.

Niniejszy wynalazek rozwiązuje problem zahamowania rozwoju mikroflory zanieczyszczającej podczas fermentacji moszczu z miazgą owocową, bez konieczności stosowania związków chemicznych, mogących zaburzać procesy fermentacyjne oraz wpływać negatywnie na cechy organoleptyczne wina.

Sposób zapobiegania rozwojowi mikroflory zanieczyszczającej podczas fermentacji moszczu z miazgą owocową, **według wynalazku** polega tym, że przed właściwym procesem fermentacji moszcz z miazgą owocową miesza się z biomasą szczepu drożdży należącego do kładu *Metschnikowia pulcherrima*, w postaci zawiesiny o stężeniu komórek $10^5 - 10^8$ jtk/ml stosując biomasę drożdży w ilości 1–10% v/w, lub też do moszczu z miazgą owocową, przed właściwym procesem fermentacji, dodaje się szczep drożdży należący do kładu *Metschnikowia pulcherrima*, w postaci pasty o stężeniu komórek drożdży $10^9 - 10^{10}$ jtk/g stosując pastę drożdży w ilości 1–10% w/w. Proces fermentacji prowadzi się spontanicznie lub z udziałem kultur drożdży szlachetnych stosowanych w ilości $10^6 - 10^9$ jtk/ml w temperaturze 15–30°C w czasie 5–7 dni.

Sposób według wynalazku znajduje zastosowanie w procesie fermentacji materiału roślinnego świeżego lub po rozmrożeniu. Sposób według wynalazku zapewnia skuteczne zahamowanie rozwoju grzybów strzępkowych i promieniowców w miazdze z jednoczesną stymulacją procesów fermentacyjnych. Produkt fermentowany uzyskany po zastosowaniu sposobu według wynalazku posiada korzystne cechy organoleptyczne, a obecność drożdży antagonistycznych w stosunku do grzybów strzępkowych i promieniowców działa stabilizująco podczas pierwszych kilku dni fermentacji.

Sposób według wynalazku ilustrują poniższe przykłady z powołaniem się na rysunek, na którym Fig. 1B i Fig. 2B przedstawiają wykresy ilustrujące wzrost drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* rasy Tokay oraz mikroorganizmów zanieczyszczających moszcz z miazgą owocową, bez dodatku drożdży z kładu *Metschnikowia pulcherrima*, zaś Fig. 1A, Fig. 2A przedstawiają wykresy ilustrujące wzrost drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* rasy Tokay oraz mikroorganizmów zanieczyszczających moszcz z miazgą owocową, z dodatkiem drożdży należących do kładu *Metschnikowia pulcherrima* w postaci zawiesiny (dawka 5% v/w), zaś Fig. 3 przedstawia wykresy ilustrujące wzrost drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* rasy Tokay oraz mikroorganizmów zanieczyszczających moszcz z miazgą owocową, z dodatkiem drożdży z kładu *Metschnikowia pulcherrima* w postaci pasty (dawka 1% w/w).

Przykład 1

Do kolby o pojemności 1 l wprowadzono 500 g moszczu z miazgą truskawkową. Mieszanina moszczu i miazgi zawierała mikroflorę niepożądaną, jak grzyby strzępkowe *Botrytis cinerea* w liczbie 10^2 jtk/g, oraz bakterie z rodzaju *Streptomyces* w liczbie 10^2 jtk/g. Do mieszaniny moszczu i miazgi dodano zawiesinę drożdży z kładu *Metschnikowia pulcherrima*, o stężeniu komórek 5×10^6 jtk/ml, w ilości 5% (v/w). Następnie mieszaninę moszczu i miazgi owocowej oraz drożdży zaszczepiono czystą kulturą drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* Tokay w postaci zawiesiny o stężeniu komórek 2×10^8 jtk/ml, użytej w ilości 2% v/v. Następnie kolbę zamknięto czopem i prowadzono fermentację w temperaturze 25°C w czasie 5 dni.

Po 5 dniach fermentacji, w mieszaninie moszczu i miazgi nie stwierdzono komórek pleśni oraz promieniowców na poziomie większym niż 10 jtk/g. Mieszanina moszczu miazgi po 5 dniach charakteryzowała się korzystnymi cechami organoleptycznymi (orzeźwiający, przyjemny owocowy zapach). Jednocześnie odnotowano znaczący wzrost liczby komórek drożdży (2×10^7 jtk/g) (Fig. 1A rysunku).

Równolegle do kolby o pojemności 1 l wprowadzono 500 g takiej samej mieszaniny moszczu i miazgi truskawkowej. Mieszanina zawierała mikroflorę niepożądaną jak grzyby strzępkowe *Botrytis cinerea* w liczbie 10^2 jtk/g, oraz bakterie z rodzaju *Streptomyces* w liczbie 10^2 jtk/g. Materiał owocowy zaszczepiono czystą kulturą drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* rasy Tokay użytych w postaci zawiesiny o stężeniu komórek 2×10^8 jtk/ml, w ilości 2% v/w. Kolbę zamknięto czopem i prowadzono fermentację w temperaturze 25°C w czasie 5 dni.

Po 5 dniach fermentacji, w moszczu z miazgą stwierdzono obecność grzybów strzępkowych *Botrytis cinerea* w liczbie 6×10^3 jtk/g i bakterii z rodzaju *Streptomyces* w liczbie 6×10^4 jtk/g (Fig. 1B rysunku). Uzyskana po fermentacji mieszanina charakteryzowała się zdecydowanie mniej korzystnymi cechami organoleptycznymi (woń alkoholowa z domieszką stęchłego, piwnicznego zapachu).

Przykład 2

Do kolby o pojemności 1 l wprowadzono 500 g moszczu z miazgą owocową z jabłek i aronii (1:1). Mieszanina moszczu i miazgi zawierała mikroflorę niepożądaną, jak grzyby strzępkowe *Penicillium expansum* w liczbie 10^2 jtk/g, oraz bakterie z rodzaju *Streptomyces* w liczbie 10^2 jtk/g. Do mieszaniny moszczu z miazgą owocową dodano zawiesinę drożdży z kładu *Metschnikowia pulcherrima* o stężeniu komórek 2×10^7 jtk/ml, w ilości 5% (v/w). Mieszaninę moszczu z miazgą owocową oraz drożdży zaszczerpiono czystą kulturą drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* Tokay w postaci zawiesiny o stężeniu komórek 2×10^8 jtk/ml, użytej w ilości 2% v/w. Następnie kolbę zamknięto czopem i prowadzono fermentację w temperaturze 25°C w czasie 5 dni.

Po 5 dniach fermentacji nie odnotowano obecności grzybów strzępkowych *Penicillium expansum* i bakterii z rodzaju *Streptomyces* na poziomie większym niż 10 jtk/g. Mieszanina moszczu z miazgą owocową charakteryzowała się korzystnymi cechami organoleptycznymi (orzeźwiający, kwaśny zapach). Jednocześnie odnotowano znaczący wzrost liczby komórek drożdży (Fig. 2A rysunku).

Równolegle do kolby o pojemności 1 l wprowadzono 500 g takiej samej mieszaniny moszczu z miazgą jabłkowo-aroniową (1:1) z mikroflorą niepożądaną. Mieszaninę zaszczerpiono czystą kulturą drożdży *Saccharomyces cerevisiae* rasy Tokay użytą w postaci zawiesiny o stężeniu komórek 2×10^8 jtk/ml, w ilości 2% v/w. Następnie prowadzono fermentację w temperaturze 25°C w czasie 5 dni.

Po 5 dniach fermentacji moszczu z miazgą owocową stwierdzono obecność grzybów strzępkowych *Penicillium expansum* w liczbie 1×10^3 jtk/g i bakterii z rodzaju *Streptomyces* w ilości 3×10^4 jtk/g (Fig. 2B rysunku). Podobnie, jak w przykładzie 1, mieszanina po fermentacji wykazywała niekorzystne cechy organoleptyczne (kwaśno-stęchły zapach).

Przykład 3

Do kolby o pojemności 1 l wprowadzono 500 g moszczu z miazgą owocową z jabłek i aronii (1:1). Mieszanina moszczu i miazgi zawierała mikroflorę niepożądaną, jak grzyby strzępkowe *Penicillium expansum* w liczbie 10^2 jtk/g, oraz bakterie z rodzaju *Streptomyces* w liczbie 10^2 jtk/g. Do mieszaniny moszczu z miazgą owocową dodano drożdże z kładu *Metschnikowia pulcherrima* w postaci pasty o stężeniu komórek 5×10^9 jtk/g, w ilości 1% (w/w). Mieszaninę moszczu z miazgą owocową oraz drożdży zaszczerpiono czystą kulturą drożdży winiarskich *Saccharomyces cerevisiae* Tokay w postaci zawiesiny o stężeniu komórek 5×10^7 jtk/ml, użytej w ilości 2% v/w. Następnie kolbę zamknięto czopem i prowadzono fermentację w temperaturze 25°C w czasie 5 dni.

Po 5 dniach fermentacji nie odnotowano obecności grzybów strzępkowych *Penicillium expansum* i bakterii z rodzaju *Streptomyces* na poziomie większym niż 10 jtk/g. Mieszanina moszczu i miazgi owocowej po fermentacji charakteryzowała się korzystnymi cechami organoleptycznymi (orzeźwiający, kwaśny zapach). Jednocześnie odnotowano znaczący wzrost liczby komórek drożdży (Fig. 3 rysunku).

W trzech opisanych powyżej przykładach wykazano, że zastosowanie dawki 5% v/w drożdży z kładu *Metschnikowia pulcherrima* w postaci zawiesiny o stężeniu komórek $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ jtk/ml lub w postaci pasty w dawce 1% w/w o stężeniu komórek 5×10^9 jtk/g do fermentacji moszczu z miazgą powoduje zahamowanie rozwój grzybów strzępkowych i promieniowców z jednoczesnym zachowaniem korzystnych walorów sensorycznych miazgi poddanej fermentacji.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób zapobiegania rozwojowi mikroflory zanieczyszczającej podczas fermentacji moszczu z miazgą owocową, **znamienny tym**, że przed właściwym procesem fermentacji moszcz z miazgą owocową miesza się z biomasą szczepu drożdży należącego do kładu *Metschnikowia pulcherrima*, w postaci zawiesiny o stężeniu komórek $10^5 - 10^8$ jtk/ml, stosując biomasę drożdży w ilości 1–10% v/w, lub też do moszczu z miazgą owocową, przed właściwym procesem fermentacji, dodaje się szczep drożdży należący do kładu *Metschnikowia pulcherrima*, w postaci pasty o stężeniu komórek drożdży $10^9 - 10^{10}$ jtk/g, stosując pastę drożdży w ilości 1–10% w/w, przy czym proces fermentacji prowadzi się spontanicznie lub z udziałem kultur drożdży szlachetnych stosowanych w ilości $10^6 - 10^9$ jtk/ml w temperaturze 15–30°C w czasie 5–7 dni.

Rysunki

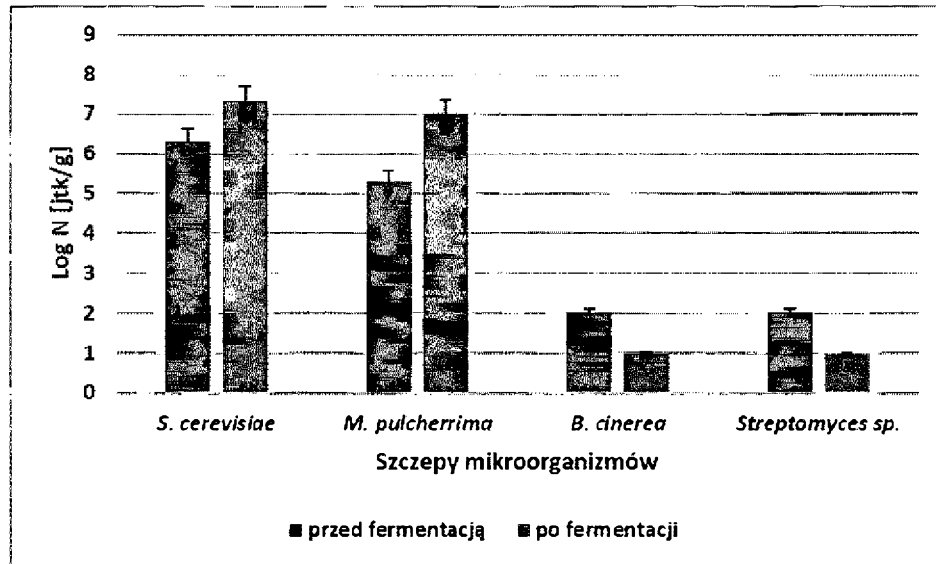


Fig. 1A

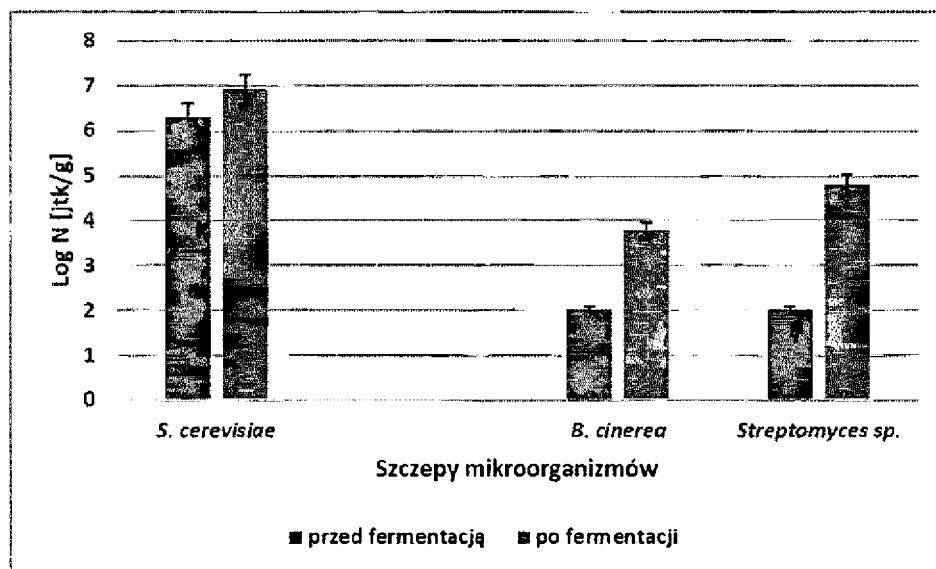


Fig. 1B

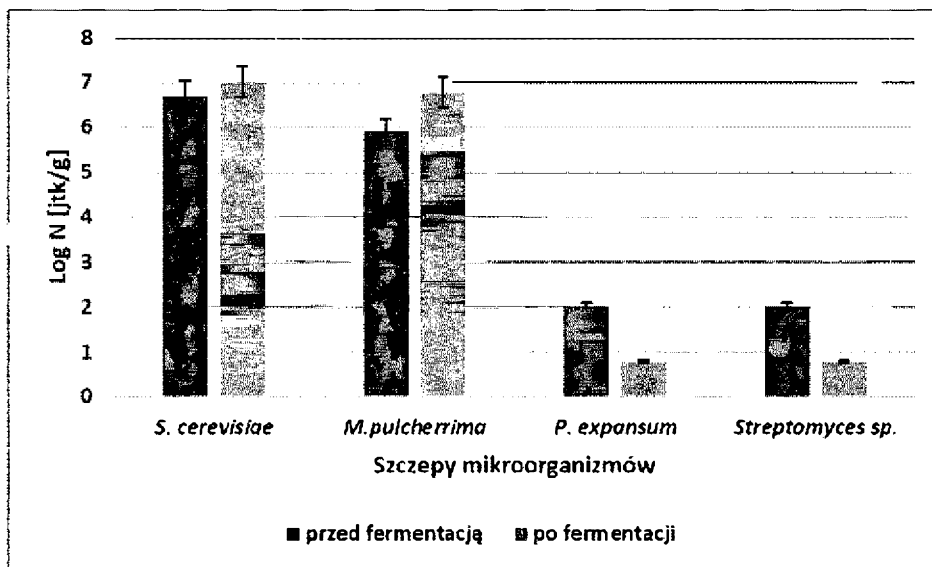


Fig. 2A

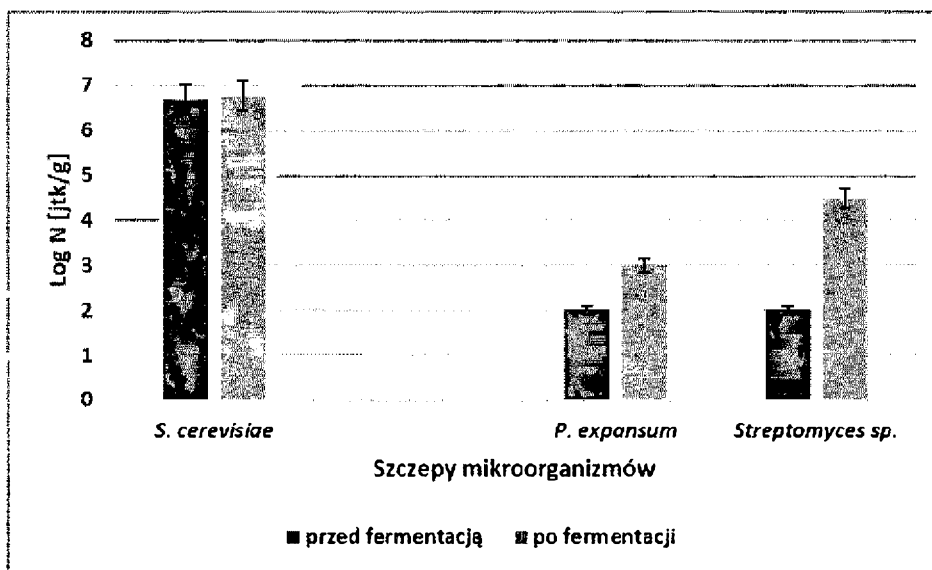


Fig. 2B

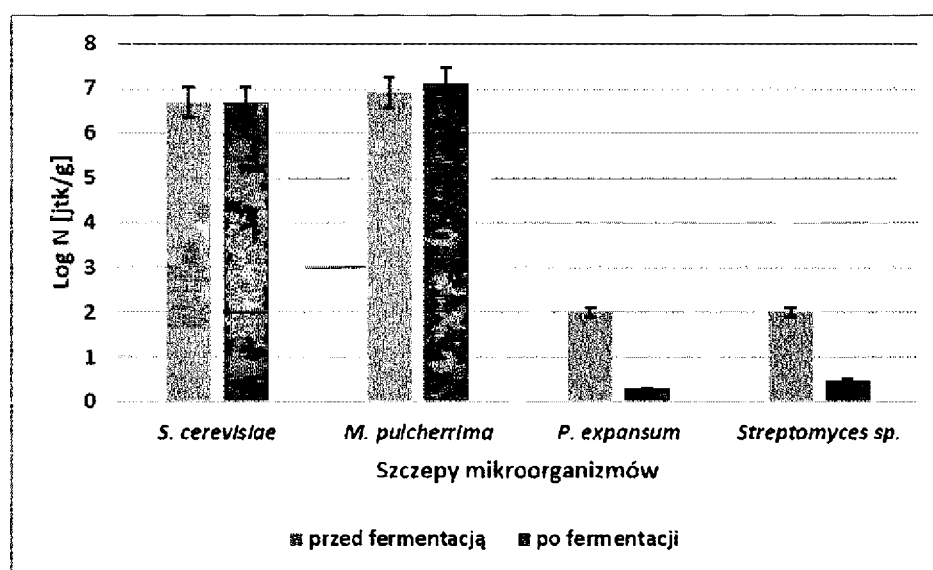


Fig. 3