



Т.Н.Танащук, к.т.н., с.н.с., нач. отдела микробиологии,
В.А.Загоруйко, д.т.н., проф., член-корр. НААН, и.о. директора,
Т.К.Скорикова, к.т.н., с.н.с. отдела микробиологии,
О.Е.Кухаренко, аспирант,
М.Ю.Шаламитский, аспирант,
 Национальный институт винограда и вина «Магарах»,
Е.Э.Травникова, аспирант, гл. винодел
 ГП «Алушта»

ОЦЕНКА РИСКОВ ПРОИЗВОДСТВА ШАМПАНСКИХ ВИНОМАТЕРИАЛОВ И ВИН НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ ЭКОЛОГИИ ДРОЖЖЕВОЙ И БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДИКОЙ МИКРОФЛОРЫ

Производство сортовых шампанских виноматериалов в условиях современного рынка вина становится все более актуальным. Их качество зависит от многих факторов: климатических условий, географического расположения виноградника, агротехнических и технологических приемов и др. [1-3]. Одним из основных условий приготовления сортовых виноматериалов для производства шампанского Украины и игристых вин является применение селекционных культур дрожжей, оказывающих существенное влияние на раскрытие особенностей того или иного сорта винограда при строгом соблюдении микробиологического контроля на всех этапах производства.

Учитывая происходящие глобальные изменения климата и техническое перевооружение предприятий отрасли, изучение основной и сопутствующей микрофлоры в процессе приготовления вина продолжает оставаться актуальным. Знания о микробиологическом состоянии производства имеют большое практическое значение, поскольку качество получаемой винопродукции и её безопасность для потребителя во многом зависит от состава микроорганизмов и от их симбиотических, синергических и антагонистических взаимоотношений, изменяющихся в процессе технологических операций.

В современных условиях пищевых производств наилучшую возможность для обеспечения выпуска безопасной продукции даёт подход, основанный на системе НАССР («Hazard Analysis and Critical Control Points» – «Анализ риска и критические контрольные точки»). Первым этапом разработки системы НАССР является работа по проведению анализа опасных факторов на производстве, наличие которых может сказаться на качестве готовой продукции и представлять угрозу для её безопасности. В виноделии одним из таких факторов является микробиологическая характеристика технологического цикла на всех его этапах. Данная система позволяет оценить микробиологическое состояние этапов производства, определить критические точки обсемененности нежелательными группами микроорганизмов, вовремя предотвратить их развитие.

Изучение и контроль качественного и количественного состава микрофлоры, её физиологического состояния позволяют оценить состояние виноматериалов и вин до появления в них химических и органолепти-

В статье представлены результаты исследования особенностей экологии дрожжевой и бактериальной микрофлоры производства шампанских виноматериалов по ходу технологического процесса на ряде винодельческих предприятий АР Крым. Дана оценка качественному составу сопутствующей микрофлоры на основных этапах производства.

Ключевые слова: идентификация микроорганизмов, селективные питательные среды, пленчатые дрожжи, дрожжи-сахаромицеты, апикулятусы, сахаромикоды, шизосахаромицеты, молочнокислые бактерии, уксуснокислые бактерии.

ческих изменений, а также рекомендовать меры по устранению деятельности вредных микроорганизмов для виноделия и создать благоприятные условия для развития полезных.

В данной работе приводятся результаты изучения качественного состава микрофлоры отдельных технологических этапов производства виноматериалов на ряде предприятий АР Крым (ОАО «Агрофирма «Золотая Балка», ГП «ЗШВ «Новый Свет», ГП «Гурзуф», ГП «Ливадия», ПАО «Солнечная Долина», ГП «Алушта» и др.). Исследования проводились в сезоны виноделия 2009-2012 гг.

Объектами исследования являлись: виноград, поступивший на переработку; виноградное сусло на этапе осветления; виноматериалы на дображивании; виноматериалы на хранении; необработанные шампанские виноматериалы, дрожжевые разводки и бродильные смеси; готовая продукция.

При проведении исследований использовали методы, общепринятые в микробиологии [4-6].

Отбор проб и подготовку их к анализу проводили согласно требованиям ГОСТ 26668-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов», ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

Для наиболее точного выявления качественного состава микрофлоры винограда применяли провокационное тестирование: виноград согласно требованиям ДСТУ 2366:2009 «Виноград свіжий технічний» без следов повреждения, здоровый, чистый отбирали с машин на заводе в стерильную посуду, дробили, закрывали стерильной ватно-марлевой пробкой и оставляли на брожение. Микроскопирование бродящего сусла проводили на этапе появления признаков брожения, активного брожения и на этапе окончания брожения. Образцы вы-

севали на чашки Петри с агаризованным соевым суслом. Культивирование проводили при температуре $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 6-7 суток.

Оценку микробиального состояния производственных образцов давали по результатам микроскопирования проб после центрифугирования и по результатам их посевов на жидкие и плотные селективные питательные среды.

Родовая идентификация выделенных изолятов микроорганизмов проводилась на основании оценки их морфологических и биохимических характеристик.

Результаты изучения микробиологического состояния различных этапов производства виноматериалов и игристых вин позволили определить качественный состав дрожжевой и бактериальной микрофлоры, установить критические точки обсемененности нежелательными группами микроорганизмов. На диаграммах (рис. 1-7) представлены данные о частоте (%) встречаемости представителей различных групп микроорганизмов в производственных образцах.

На всех предприятиях обнаружены представители дрожжевой микрофлоры: апикулятусы, сахаромицеты, сахаромикоды, пленчатые дрожжи, бреттаномикеты.

Особый интерес представляют данные об экологии микрофлоры винограда. Представления о ней постоянно изменяются по мере накопления информации. Многочисленные попытки выделить *S. cerevisiae* и *S. bayanus* со здоровых и свежих фруктов (включая виноград) показали, что дрожжи на растениях в естественной среде не встречаются, либо встречаются в очень ограниченных количествах [7]. На сегодняшний день существует мнение, что дрожжи *S. cerevisiae* и *S. bayanus* в природных средах не встречаются, поскольку они эволюционировали как «промышленные» виды в результате селективной адаптации микроорга-

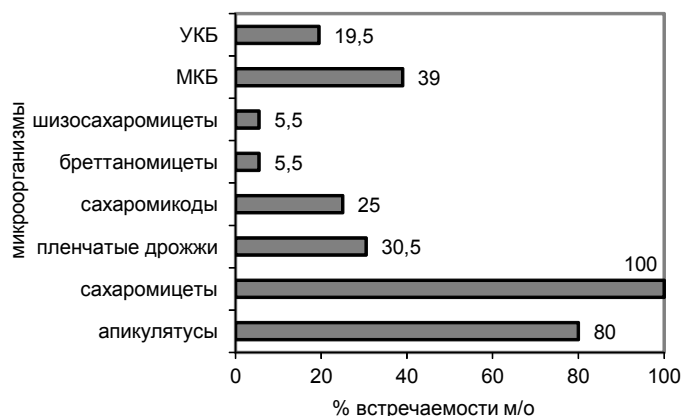


Рис. 1. Качественный состав микрофлоры винограда, поступившего на переработку

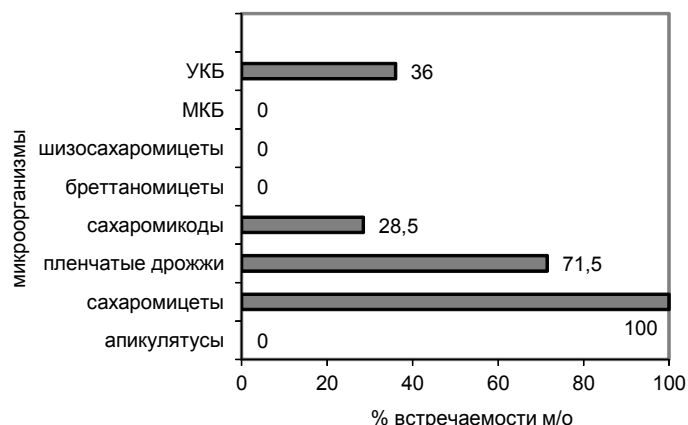


Рис. 2. Качественный состав микрофлоры суслу на освещении

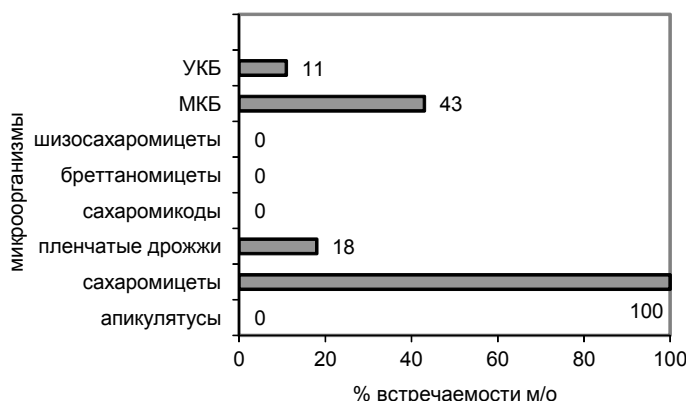


Рис. 3. Качественный состав микрофлоры виноматериалов на дображивании

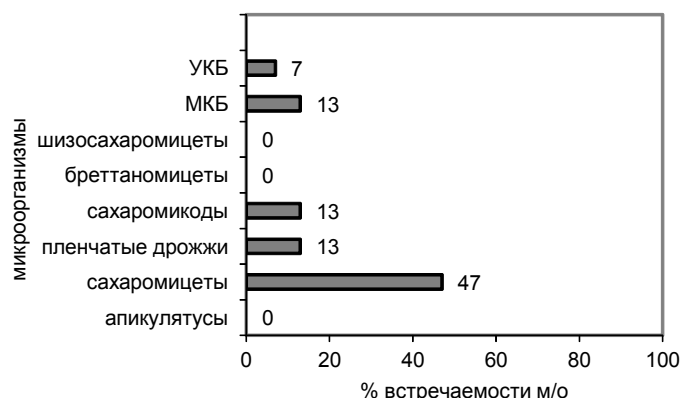


Рис. 4. Качественный состав микрофлоры виноматериалов на хранении

низмов вида *S.paradoxus*, естественной средой обитания которых являются растения [8, 9]. Контаминация винограда происходит главным образом в процессе сбора и транспортировки, при этом количество микроорганизмов и их состав напрямую зависят от качества винограда, условий транспортировки и сроков переработки.

Анализ образцов винограда, поступающего на переработку, показал (рис.1), что присутствующая на нем микрофлора весьма разнообразна. Наиболее часто встречаемыми являются дрожжи апикулятусы (род *Hanseniaspora/Kloeckera*) и сахаромицеты (род *Saccharomyces*).

Дрожжи *Hanseniaspora/Kloeckera* были обнаружены на начальной стадии брожения, что подтверждает их низкую спиртоустойчивость. По литературным данным, они всегда присутствуют на виноградных ягодах и вследствие высокой скорости размножения составляют 90% дрожжей на первой стадии брожения [2, 10]. Нами отмечено, что при низких температурах (15-20°C) чувствительность представителей данной группы дрожжей к спирту понижается. Дрожжи рода *Hanseniaspora* составляли до 5% от общего количества отвитых колоний, выросших при посеве проб осадков выбродившего суслу, содержание этанола в которых составило 8-10% об. Продукты метаболизма данной группы дрожжей могут влиять на процесс размножения культурных винных дрожжей, способствуя снижению их бродительной активности, а также влиять на вкус и аромат виноматериала из-за увеличения в нем содержания летучих кислот и эфиров. Продукты жизнедеятельности апикулятных

дрожжей также могут оказывать негативное влияние на процессы бутылочной шампанзации, при этом происходит затруднение осветления вина после вторичного брожения и образование трудно удаляемых при ремюаже «масок».

Во время интенсивного разбраживания винограда количество дрожжей-сахаромицетов увеличивалось и к концу брожения становилось преобладающим. Таким образом, на стадии брожения дрожжи-сахаромицеты, в качестве «промышленных» видов, способны конкурировать с селекционными культурами дрожжей и могут придавать готовому продукту неприятные вкус и аромат из-за большого содержания сложных эфиров, ди-ацетилла, серосодержащих летучих веществ или уксусной кислоты.

Представители нежелательной микрофлоры винограда также в значительном количестве представлены пленчатыми дрожжами (в 30,5% образцов) и дрожжами рода *Saccharomycodes* (в 25% образцов) (рис. 1).

Пленчатые дрожжи являются представителями вредной микрофлоры брожения, продукты обмена которых тормозят рост и снижают бродительную энергию шампанских дрожжей. Они вызывают помутне-

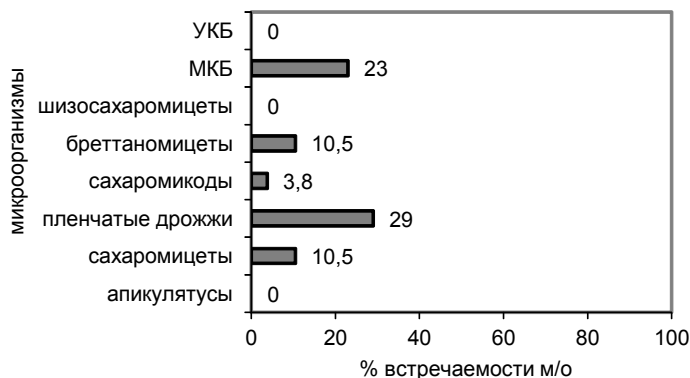


Рис. 5. Качественный состав микрофлоры шампанских виноматериалов (необработанных)

ния вин. Обнаружение пленчатых дрожжей почти в трети исследуемых проб винограда (рис. 1), поступившего на переработку, а также их присутствие на всех этапах производства (рис. 2-7) указывает на необходимость глубоких исследований экологии представителей данной группы микроорганизмов в условиях современного производства игристых вин и усиления санитарного контроля.

В последнее время отмечается тенденция к увеличению частоты встречаемости дрожжей рода *Saccharomycodes*, которые обладают повышенной способностью к синтезу уксусноэтилового эфира, придающего неприятный прокисший запах винам. В нашем исследовании данные дрожжи были обнаружены не только на винограде из всех регионов АР Крым, а также – на всех этапах производства, что свидетельствует о необ-

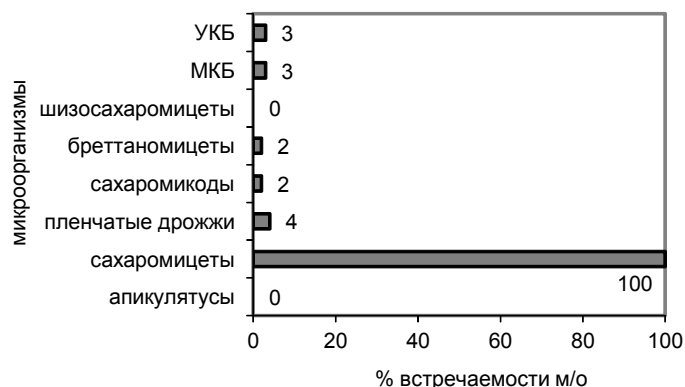


Рис. 6. Качественный состав микрофлоры дрожжнок и бродильных смесей

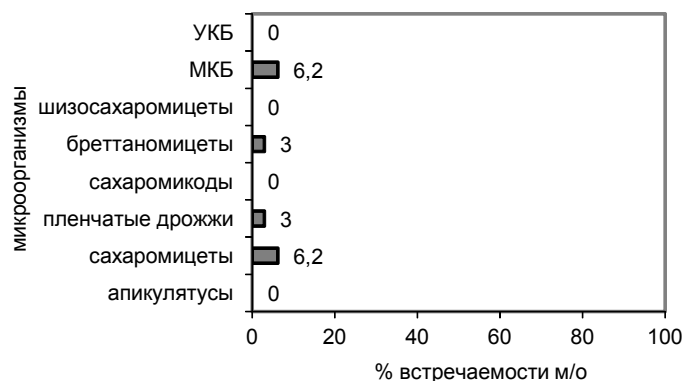


Рис. 7. Качественный состав микрофлоры игристого вина

ходимости жесткого микробиологического контроля на производстве с целью предотвращения их развития.

Частота встречаемости на винограде дрожжей рода *Brettanomyces* невелика и составляет как и дрожжей-шизосахаромицетов около 5%. Оценка проб производственных образцов показала, что дрожжи рода *Brettanomyces* представляют существенную угрозу для шампанского производства, поскольку значительное их количество было обнаружено в 10,5% проб необработанных шампанских виноматериалах и в 2% проб бродильной смеси (рис. 5-6).

Бактериальная микрофлора представлена молочнокислыми бактериями (МКБ) и уксуснокислыми бактериями (УКБ) на всех этапах производства. Количество УКБ отмечалось в незначительном количестве – от единичных клеток до 2-10 клеток в поле зрения и небольших скоплениях в виде пленки. Обнаружение УКБ в 19,5% образцов винограда, поступающего на переработку (рис.1) и в 36% образцов сусла, поступающего на осветление (рис.2), указывает на необходимость усиления входящего контроля винограда и санитарного контроля производства.

В осадках спонтанно сброженного виноградного сусла количество обнаруженных МКБ находилось в прямой зависимости от значения титруемой кислотности ягоды. Так, МКБ были обнаружены в 39% проб сброженного сусла из винограда с высокой титруемой кислотностью (10-12 г/дм³). Наиболее часто МКБ встречались в виноматериалах на дображивании (рис. 3) и в необработанных виноматериалах (рис. 5) – в 43% и 23% проанализированных образцов соответственно.

Помутнение готовой продукции было вызвано представителями дрожжевой микрофлоры – сахаромикетами, пленчатыми дрожжами, бреттаномикетами, а также МКБ (рис. 7).

Обследование образцов винограда и винопродукции позволило выделить в чистую линию 70 изолятов микроорганизмов.

Изучение морфологических и физиологических свойств 58 изолятов пленчатых дрожжей позволило сформировать коллекцию из 24 изолятов (табл. 1).

Систематическое определение изолятов пленчатых дрожжей показало, что наиболее часто в пленке, образующейся на поверхности вина, встречаются дрожжи родов *Candida* (25%) и *Pichia* (34%), в 25% случаев дрожжи были отнесены к роду *Hansenula* и

Систематическая характеристика изолятов пленчатых дрожжей, выделенных при изучении разных этапов приготовления виноматериалов

Таблица 1

Принадлежность к роду	Кол-во изолятов/%	Морфологические признаки		Ассимиляция нитратов
		Форма клеток	Форма спор	
<i>Candida</i>	6 / 25	удлиненная, вытянутая	споруляция отсутствует	варьирует
<i>Pichia</i>	8 / 34	округлая, удлинённая	полусферические	не ассимилируют
<i>Hansenula</i>	6 / 25	овально-вытянутая	полусферические	ассимилируют
<i>Brettanomyces</i>	2 / 8	мелкие, заостренные, удлинённые с боковым почкованием	споруляция отсутствует	не ассимилируют
Требуется уточнения	2 / 8	вытянутые	варьирует	варьирует

Таблица 2

Характеристика идентифицированных МКБ по способности к культивированию

Морфология клеток МКБ	Количество образцов	Рост на солодовом яблочном сусле (накопительная культура)	Рост на плотной питательной среде (рассев накопительной культуры)	Количество фертильных линий
Кокки	31			
мелкие кокки, единичные, парами, в цепочках	19	10	4	4
крупные кокки, яйцевидной формы, в парах и цепочках	12	2	2	2
Палочки	15			
	5	3	3	3
крупные палочки, в парах, в коротких и длинных цепочках	10	3	3	3

8% к роду *Brettanomyces*.

Микроскопическая картина 220 исследованных образцов винопродукции позволила идентифицировать МКБ в 46 пробах.

Анализ их морфологических особенностей показал, что в основном это бактерии кокковой формы, 30% из которых имеют крупные клетки яйцевидной формы и накапливают в культуре небольшую биомассу. Морфология колоний одноклеточных и представлена колониями размером менее 1 мм, округлыми, прозрачными, блестящими, у отдельных представителей с фестончатым краем. В чистую линию выделено 12 фертильных линий, что указывает на избирательность отдельных штаммов МКБ к составу среды и условиям культивирования (табл. 2).

Представленный анализ микробиоло-

гического состояния производства игристых вин позволяет сделать основные выводы:

- на всех этапах производства выявлены разные группы микроорганизмов-представителей дикой микрофлоры;
- при одинаковом качественном составе частота их встречаемости различна на отдельных производственных этапах;
- обозначены основные критические точки микробиологической оценки по стадиям производства игристых и шампанских вин: виноград; сусло на осветлении; виноматериалы на дображивании; виноматериалы на хранении; шампанские виноматериалы; дрожжанки и бродильные смеси; готовое вино;
- критические точки «виноград» и «сусло на осветлении» можно считать наиболее



важными с точки зрения ужесточения требований к санитарному и микробиологическому контролю, а также необходимости разработки рекомендаций по максимальному удалению микроорганизмов из сусла перед брожением;

– присутствие диких дрожжей-сахаромицетов подтверждает необходимость применения селекционированных рас дрожжей с высокой активностью брожения;

– из нежелательных групп микроорганизмов, оказывающих отрицательное влияние на качество и безопасность готовой продукции, можно отметить плёнчатые дрожжи и дрожжи сахаромикоды, присутствие которых, вероятно, связано с устойчивостью к высоким дозам сернистого ангидрида;

– данные по обнаружению бактериальной микрофлоры на разных этапах производства не отличаются от данных многочисленных исследований экологии МКБ и УКБ. Их наличие в основном зависит от качества сырья, санитарного состояния производства и применяемых технологических приёмов. Сложность выделения МКБ из производства указывает на необходимость модификации методов их культивирования.

Таким образом, присутствие посторонних микроорганизмов на всех этапах про-

изводственного процесса указывает на то, что система мероприятий, гарантирующих оптимизацию технологических процессов, должна строиться с учетом особенностей биологии и физиологии микроорганизмов и способствовать максимальному ограничению их количества.

Учитывая значительное влияние на качественный и количественный состав дикой микрофлоры винодельческого производства многочисленных факторов, исследования в данном направлении целесообразно продолжить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. – К.: Наукова думка, 1991. – 328 с.
2. B.S.Valles, R.P. Bedrinana, N.F. Tascon, A. Q. Simon, R.R. Madrera. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of sider // Food Microbiology. – 2007. – №24. – P.25-31.
3. Mercado, A. Dalcero, R. Masuelli, M. Combina. Diversity of Saccharomyces strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years // Food Microbiology. – 2007, №24. – P.403.
4. Н.И. Бурьян Практическая микробиология ви-

ноделия. – Симферополь: Таврида, 2003. – 560 с.

5. ИК 10-04-05-40-89 Инструкция по микробиологическому контролю винодельческого производства, утв. 01.06.1989.

6. ИК 10-04-05-11-87 Инструкция по микробиологическому контролю производства Советского шампанского, утв. 01.04.1987.

7. Martini A., Ciani M., Scorzetti G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces// Am.J.Enol.Viticult., 1996.

8. Querol A., Fernandes-Espinar M., J., Del Olmo M., Barrio E. Adaptive evolution of wine yeast // Int.J.Food microbial., 2003, 86, p.3-10.

9. Vaughan-Martini A., Martini A. Facts myths and legends in the prime industrial microorganism// J. Ind. Microbiol., 1995, 14, p. 514-522.

10. E. di Maro, D. Ercolini, S.Coppola. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesce grape.// International Journal of Food Microbiology.// International Journal of Wine Research. – 2007. – № 117. – P.201-210.

Поступила 03.07.2013

© Т.Н.Танащук, 2013

© В.А.Загоруйко, 2013

© Т.К.Скоринова, 2013

© О.Е.Кухаренко, 2013

© М.Ю.Шаламитский, 2013

© Е.Э.Травникова, 2013