

663.2:577.1

Г69

В.А. Горина

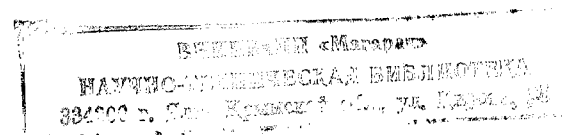
**ПРОБЛЕМНЫЕ
ВОПРОСЫ БИОЛОГИИ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ
БАКТЕРИЙ ВИНА**

**СИМФЕРОПОЛЬ
«ТАВРИЯ ПЛЮС»
2000**

В.А. Горина

**ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ
БИОЛОГИИ
МОЛОЧНОКИСЛЫХ
БАКТЕРИЙ ВИНА**

8p.1



СИМФЕРОПОЛЬ
«ТАВРИЯ ПЛЮС»
2000

Украинская академия аграрных наук

Институт винограда и вина "Магарах"

Рецензент: доктор биологических наук Н.И. Бурьян

В.А. Горина
ПРОБЛЕМНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ
БАКТЕРИЙ ВИНА. -Симферополь: «Таврия Плюс», -2000. -104 с.
ISBN 966-7503-40-2

Освещены вопросы регулирования кислотности виноматериалов на основе использования молочнокислых бактерий. Представлены результаты многолетних исследований экологии и физиологических особенностей молочнокислых бактерий виноматериалов различных климатических регионов и их связь с химическим составом вина, оптимальные режимы культивирования молочнокислых бактерий и яблочно-молочного брожения. Приведены материалы по скринингу штаммов молочнокислых бактерий для индуцированного яблочно-молочного брожения, основные аспекты технологии биологического кислотопонижения и потенциальные возможности его проведения при приготовлении виноматериалов в различных регионах бывшего Советского Союза. Представлены результаты исследования явления бактериофагии молочнокислых бактерий. Предназначена для учёных-микробиологов, практических специалистов виноделия и других отраслей бродильной промышленности.

Печатается по постановлению РИС ИВиВ «Магарах»:
Авидзба А.М., д.с.-х.н.; Иванченко В.И., д.с.-х.н.; Амирджа-
нов А.Г. д.б.н.; Бузни А.Н. к.э.н.; Валушко Г.Г. д.т.н.; Гержи-
кова В.Г. д.т.н.; Дикань А.И., д.с.-х.н.; Загоруйко В.А. д.т.н.;
Кишковская С.А. д.т.н.; Мелконян М.В. д.б.н.; Николаев
Е.В., д.с.-х.н.; Сачаво М.С. д.т.н.; Якушина Н.А. д.с.-х.н.

ISBN 966-7503-40-2

© Институт винограда
и вина «Магарах», 2000

Содержание

Введение	5
1. Экология и систематика молочнокислых бактерий	6
2. Развитие молочнокислых бактерий в зависимости от химического состава вин	15
3. Особенности развития молочнокислых бактерий в процессе яблочно-молочного брожения	21
3.1. Влияние соотношения винной и яблочной кислот на скорость яблочно-молочного брожения	28
3.2. Особенности потребления яблочной кислоты и угле- водов в процессе размножения МКБ рода <i>Leuconostoc</i> ...	29
3.3. Скрининг штаммов молочнокислых бактерий для индуцирования яблочно-молочного брожения	31
3.4. Разработка режимов индуцированного яблочно- молочного брожения.	38
3.5. Практические аспекты яблочно-молочного брожения при приготовлении виноматериалов	43
4. Взаимоотношения дрожжей и молочнокислых бактерий ...	47
5. Явление бактериофагии у молочнокислых бактерий вина .	62
5.1. Оптимизация условий выявления фаголизиса у молочнокислых бактерий вина	63
5.2. Лизогения молочнокислых бактерий вина	66
5.3. Основные биологические свойства фагов <i>Lact.</i> <i>plantarum</i>	71
5.3.1. Активность и спектр антибактериального действия	71
5.3.2. Морфология фагов	73
5.3.3. Морфология негативных колоний	76
5.3.4. Адсорбция и основные фазы внутриклеточного развития фагов <i>Lact. plantarum</i>	77
5.3.5. Антигенные свойства фагов <i>L. plantarum</i>	79

5.3.6. Изучение оптимальной множественности инфекции фагов <i>L. plantarum</i>	81
5.3.7. Влияние инактивирующих агентов	82
5.4. Влияние основных химических компонентов вина на стабильность и литическую активность фагов	86
5.5. Изменчивость фага под влиянием хозяина	87
5.6. Изменчивость молочнокислых бактерий под влиянием специфических фагов	88
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
Список использованной литературы	92

Введение

В микрофлоре вина молочнокислые бактерии (МКБ) играют значительную роль. Некоторые особенности биологии МКБ позволяют им развиваться во всех типах вин. Многообразие процессов, вызываемых молочнокислыми бактериями, приводит к тому, что интерес к этой группе микроорганизмов не теряет своей актуальности, несмотря на многочисленные исследования в этом направлении. Широкая распространённость МКБ вина сочетается со сложностью их выделения и культивирования в лабораторных и производственных условиях.

Рекомендации производству по регулированию жизнедеятельности микроорганизмов и прогнозированию изменений, вызываемых ими в винах, невозможны без тщательного изучения их физиологических особенностей в конкретных и возможно разнообразных условиях.

Нами изучались виноматериалы различных типов разных регионов бывшего Советского Союза с целью связать характер микрофлоры с химическим составом вина.

Много внимания уделялось яблочно-молочному брожению и отработке режимов индуцирования биологического кислотопонижения на основе физиологических особенностей молочнокислых бактерий.

Исследование бактериофагии молочнокислых бактерий, обитающих в вине, и его роли в регулировании яблочномолочного брожения представляет новое направление в микробиологии виноделия.

Хочется надеяться, что представленный материал расширит представление о биологии этой интересной группы микроорганизмов и поможет в решении практических задач виноделия.

1. Экология и систематика молочнокислых бактерий

Выделение из вин и классификация молочнокислых бактерий выполнены во многих винодельческих районах мира. Основной вклад в изучение молочнокислых бактерий вина внесли французские исследователи: Пейно Э., Риберо-Гайон Ж., Лафон-Лафуркад С., Домерк С., Сюдро Р. и др., исследования которых обобщены Риберо-Гайоном Ж. и соавт. [74]. Молочнокислые бактерии вина изучали Ранкин Б. и Форначон Ж. [173] в винах Австралии, Росси И., Костамагна Л., Клементи Ф. [178] - в Италии, Марэ Р. и Соцци [151,152] - в Швейцарии, Ингрэхэм Ж., Вогн Р., Кук Г. [135], Райс А. [175] - в Америке, Чэлфэн Ж., Гольдберг И., Мателс Р. [104] - в Израиле. В результате установлено, что в зависимости от климатических условий и типа вин с преобладанием гомоили гетероферментативной группы выделяются представители родов: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Источником молочнокислых бактерий в вине являются виноград, заводское оборудование и коммуникации.

В нашей стране этому вопросу уделялось значительно меньше внимания. Обстоятельные исследования по экологии МКБ принадлежат Квасникову Е.И. и его ученикам [41,43]. Квасниковым Е.И., Кондо Г.Ф. [42] установлено, что наибольшую угрозу виноделию Средней Азии представляют молочнокислые бактерии. При изучении штаммов, выделенных из вин Средней Азии и Казахстана, в сопоставлении со штаммами, выделенными из различных природных субстратов, установлена их идентичность.

В винах Молдавии определение видового состава молочнокислых бактерий проведено Юстратовой Л.С. [32]. Автор указывает, что в этом регионе наиболее часто выделяются гомоферментативные палочки, затем гетероферментативные палочки, тогда как гетероферментативные кокки не встречаются. Однако, в работах Кондо Г.Ф. [47] отмечается частое присутствие гетероферментативных кокков в винах Молдавии.

Выделение в чистую культуру и таксономическое определение молочнокислых бактерий из армянских вин осуществлено Петян Э.О. [65] и Авакяном Б.П. [1].

Рабинович З.Д. и Бурьян Н.И. [70] определили видовой состав молочнокислых бактерий в винах Крыма, Гянджинского района Азербайджана, Одесской области. Выделенные штаммы принадлежали к гомоферментативным палочкам *Lact.*

plantarum, коккам *Pediococcus cerevisiae*, гетероферментативным палочкам *Lact. brevis* и *Lact. buchneri*, коккам *Leuconostoc gracile* и *Leuc. oenos*. Из работ, посвященных экологии молочнокислых бактерий в отдельных винодельческих районах СНГ, надо отметить исследования Гогоберидзе Р.Г. [10] грузинских вин и Журавлёвой В.П. с соавт. [35] туркменских вин. Ивановой И.П. и Баштанной И.И. [38] при изучении молочнокислых бактерий в производстве шампанского бутылочным методом из 302 образцов готовой продукции и производственных объектов выделено 100 штаммов чистых культур молочнокислых бактерий, представленных, в основном, гомоферментативными кокками (38 шт.) рода *Streptococcus*, гомоферментативными палочками (27 шт.) рода *Lactobacillus* подрода *Streptobacterium*, а также в небольшом количестве гетерококками (3 шт.) рода *Leuconostoc* и гетероферментативными палочками (4 шт.) рода *Lactobacillus* подрода *Betabacterium*. Показано, что концентрация этанола и диоксида серы, принятые в шампанском производстве, не ограничивают развитие молочнокислых бактерий.

Молочнокислые бактерии в испанских винах при их приготовлении и хранении описаны Пардо Зунига [162].

Классификация молочнокислых бактерий очень трудна, что связано с некоторыми особенностями этой группы микроорганизмов. Во-первых, молочнокислые бактерии очень широко распространены в природе в разнообразных местах обитания. Нередко обнаруживаются молочнокислые бактерии, отдельные признаки которых не характерны для всей группы. Во-вторых, трудность классификации заключается в широкой изменчивости многих свойств этих микроорганизмов, особенно при культивировании их на разных средах и в разных условиях. Среди молочнокислых бактерий часто обнаруживаются штаммы, которые не могут быть отнесены к тому или иному виду или подроду, а занимают как бы промежуточное положение.

Подробный анализ имеющихся схем классификации молочнокислых бактерий проведен Квасниковым Е.И. и Нестеренко О.А. [43], Риберо-Гайоном Ж. с соавт. [74], Бурьян Н.И. [5,6]. В целом в систематике бактерий так мало внимания уделено молочнокислым бактериям, что трудно найти место для молочнокислых бактерий вина.

Молочнокислые бактерии, выделяемые из вин, отличаются от МКБ других мест обитания способностью размножаться при низких значениях pH (2,6-3,2) в присутствии спирта и в среде, достаточно бедной питательными веществами.

Классификация молочнокислых бактерий вин по [74]

Кокки	Гомоферментативные	<i>Pediococcus cerevisiae</i>	P-
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	P+
	Гетероферментативные	<i>Leuconostoc gracile</i>	P-
		<i>Leuconostoc oenos</i>	A+
		<i>Leuconostoc oenos</i>	X+
Палочки	Гомоферментативные	<i>Leuconostoc oenos</i>	P+
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	P±C+
		<i>Lactobacillus casei</i>	P-C±
	Гетероферментативные	<i>Streptobacterium Sp</i>	P-
		<i>Lactobacillus fructus</i>	P-
		<i>Lactobacillus desidiosus</i>	A+
		<i>Lactobacillus hilgardii</i>	X+
		<i>Lactobacillus brevis</i>	P+

Сбраживают: A+ арабинозу; X+ ксилозу; P+ пентозы (арабинозу, ксилозу), C+ лимонную кислоту.

Не сбраживают: P+ пентозы (арабинозу, ксилозу); C- лимонную кислоту.

ние гексоз палочками часто слабо выражено и проявляет от одного штамма к другому все степени ферментативной активности. Напротив, пентозы сбраживаются легче и по этому признаку молочнокислые бактерии вина легко классифицируются.

Пентозный тест является основой для дифференциации по многим соображениям. Во-первых, он унифицирует базу классификации палочек и кокков. Во-вторых, сбраживание пентоз бактериями является единственной ярко выраженной чертой сбраживания, поскольку она стабильна и не адаптивна. Наконец, возможность трансформировать пентозы имеет технологический интерес, потому что она является мерой опасности бактериальных изменений. Однако, ценность пентозного теста не исключает необходимости изучения других свойств описываемых молочнокислых бактерий.

В системе мероприятий по биологической стабилизации вин важное место занимает создание условий для своевременного прохождения яблочно-молочного брожения в высококислотных материалах и предотвращения молочнокислых процессов в других типах вин. Для разработки рекомендаций по регулированию кислотности вин большое значение

Пейно Э. и Домерк С. [166] отмечают, что установить классификацию бактерий вина на основе систематики бактерий другого происхождения невозможно. Педерсон С. [164] выделил молочнокислые бактерии вина в отдельную группу, назвав "неактивными бактериями" из-за их чрезвычайно медленного роста даже на средах, богатых питательными веществами.

Работы по классификации бактерий, выделенных из вина, довольно многочисленны, однако они не всегда основаны на большом количестве штаммов. Пейно Э., Домерк С. [166] на 400 штаммах проанализировали имеющиеся частные схемы классификации и оценили весомость используемых в них признаков. Предлагаемая ими классификация использует схемы Вогна Р. и соавт. по гетеропалочкам [74], Рогозы М. и соавт. [177], Рогозы М. и Шарп М. [176] по гомопалочкам, Гарвей Е. [122,123] по лейконостокам и Накагавы А. и Китахара К. [74] по педиококкам и основывается, прежде всего, на морфологии клеток (палочки или кокки), характере брожения глюкозы (гомо- или гетеро-) и на брожении пентоз — свойстве, которое, по мнению Пейно, имеет особое энологическое значение.

В таблице 1.1. приводится классификация молочнокислых бактерий вина на основании пентозного теста и сбраживания лимонной кислоты [74]. По экологической классификации имеется две разновидности *Lact. plantarum*: гомоферментативные бактерии, сбраживающие пентозы и разлагающие лимонную кислоту, и бактерии, разлагающие лимонную кислоту и не сбраживающие пентоз. Такая характеристика бактериальных видов удобна для практического виноделия.

Распределение кокков и палочек по функциям сбраживания пентоз явилось неожиданным и заслуживает особого внимания. Оказалось, что кокки могут быть чаще всего пентозонегативными или арабинозоположительными. Кокки, которые сбраживают ксилозу, в вине чрезвычайно редки. Ещё более редки палочки, которые сбраживают арабинозу. Также немногочисленны кокки, которые сбраживают обе пентозы, и палочки, которые не сбраживают никакую. Противоположность поведения кокков и бацилл по отношению к сбраживанию пентоз выражает параллелизм, который существует между формой клетки и некоторыми функциями брожения.

Следует отметить, что ещё в первой классификации Орла-Иенсена С. [161] брожение арабинозы и ксилозы служило критерием для идентификации лактобацилл. Броже-

имеют данные по экологии молочнокислых бактерий.

В период с 1972 по 1990 гг. на наличие молочнокислых бактерий нами было обследовано большое количество вино-материалов различных регионов Советского Союза. В чистые линии выделены молочнокислые бактерии всех систематических групп (табл.1,2). Как видно, самыми редкими в молочнокислой микрофлоре обследованных вин являются представители рода *Pediococcus*. Они встретились только однажды и проявили пониженную жизнеспособность при хранении, погибнув уже при первых пересевах.

Несколько чаще, но тоже относительно редко, встречаются в изученных винах гомоферментативные палочки. Основным источником их выделения были образцы хересуемого вино-материала из-под плёнки. Выделение из хереса молочнокислых бактерий оказалось чрезвычайно трудным, несмотря на практически постоянное их присутствие в процессе хересования. Выделенные гомопалочки были нежизнеспособны при хранении и быстро погибали в лабораторных условиях.

Наиболее частыми представителями молочнокислой микрофлоры в вино-материалах обследованных регионов являются гетероферментативные палочки и кокки. При этом прослеживается совершенно чёткая связь между характером выделяемой микрофлоры, типом вино-материала и климатическим регионом.

Этот тезис можно проследить на вино-материалах Киргизии, весьма контрастной в климатическом отношении. Из вино-материалов различных типов было выделено около 700 чистых линий МКБ. При определении их принадлежности к биохимической группе все они оказались гетероферментативными [21].

Для идентификации были отобраны 139 штаммов, отличающихся по морфологии. Анализ морфолого-культуральных особенностей изученных молочнокислых бактерий позволил выделить 4 группы (табл.1.3). Как видно из представленных данных, большим разнообразием отличалась морфология колоний. Интересным кажется выделение очень мелких тонких палочек, часто образующих длинные нити и скопления и дающих слабый рост на жидкой среде.

Все бактерии были неподвижны и не способны к спорообразованию, росли при 15°C и не давали роста при 45°C.

Изучение биохимических свойств позволило определить видовой состав изученных молочнокислых бактерий (табл.1.4).

Таблица 1.2

Молочнокислая микрофлора различных вино-материалов

Наименование бактерий	Происхождение	Количество штаммов
Гетероферментативные кокки рода <i>Leuconostoc</i>	Закарпатье, 1979 г., сухие вино-материалы	9
	Киргизия, 1977-1979 гг., сухие и крепленые вино-материалы	26
	Анапа (Кубань), 1977 г., сухой вино-материал	4
	ОПБ «Магарац» (Крым), 1981 г., сухой вино-материал	20
	ОПБ «Магарац», 1979 г., сухой вино-материал	18
	Симферополь, 1981 г., крепленый вино-материал	14
	Совхоз-завод «Виноградный» (Крым) 1989-1990 гг., сухой вино-материал	15
Гомоферментативные палочки рода <i>Lactobacillus</i>	ОПБ «Магарац», 1984 г., крепленый вино-материал	34
	Киргизия, 1978 г., сухой и крепленый вино-материал	15
	Симферополь, крепленый вино-материал, 1972 г.	90
Гетероферментативные палочки рода <i>Lactobacillus</i>	Киргизия, 1977-79 гг., крепленый вино-материал	600
	Совхоз-завод «Виноградный», 1989-1990 гг., столовый вино-материал	25
Гомоферментативные кокки рода <i>Pediococcus</i>	Симферополь, 1972 г., крепленый вино-материал	5

Представленный материал указывает на подавляющее преобладание гетероферментативных палочек в микрофлоре киргизских вин, причём палочек, различных по морфологии. Наибольшим разнообразием отличались молочнокислые бактерии яблочных соков. Интерес представляло выделение бак-

Таблица 1.3

**Морфолого-культуральные свойства
молочнокислых бактерий**

Морфология клеток	Морфология колоний
Короткие толстые палочки в парах и цепочках	Мелкие, круглые, выпуклые, край ровный, гладкие, блестящие, коричневые, консистенция маслянистая
	Довольно крупные, плосковыпуклые, бугристые, блестящие, край неровный, бесцветные, консистенция зернистая
	Мелкие, плоские, неправильной формы, прозрачные, матовые
Очень мелкие короткие палочки в парах, одиночные, реже в цепочках	Довольно крупные, выпуклые, правильной формы, беловатые, гладкие, блестящие, консистенция маслянистая
	Мелкие, выпуклые, гладкие, блестящие, край ровный, бесцветные, консистенция маслянистая
Мелкие, тонкие палочки, короткие и длинные, есть сильно вытянутые, в парах	Довольно крупные, конусообразные, округлые, край неровный, гладкие, блестящие, консистенция маслянистая
	Средней величины, слабос выпуклые, бугристые, неправильной формы, прозрачные
Очень мелкие бактерии типа <i>Leuconostoc</i> , точечные, в парах и коротких цепочках	Очень мелкие, в виде росинок, гладкие, блестящие, выпуклые

терий вида *Lact. hilgardii*. В отечественной литературе мы не встречали сведений об обнаружении этого вида молочнокислых бактерий в вине, хотя зарубежные исследователи считают его обычным для плодово-ягодных и виноградных вин. *Lact. hilgardii* в большом количестве выделяются с винограда и чаще из больных вин, чем из вин с яблочно-молочным брожением. Однако этот вид считают хорошим проводником яблочно-молочного брожения, так как яблочная кислота сбраживается им при pH 3,0-3,2. Присутствие этих бактерий в

Таблица 1.4

Видовой состав молочнокислой микрофлоры вин Киргизии по [166]

Происхождение культуры	Изучено штаммов	Морфологическая группа	Название вида
Виноматериал виноградный столовый	12	палочки	<i>Lactobacillus hilgardii</i> X ⁺
Виноматериал виноградный столовый	2	кокки	<i>Leuconostoc oenos</i>
Виноматериал виноградный крепленый	5	палочки	<i>Lactobacillus hilgardii</i> X ⁺
Виноматериал виноградный столовый	2	кокки	<i>Leuconostoc oenos</i>
Сок яблочн. спирт.	51	палочки	<i>Lactobacillus hilgardii</i> X ⁺
Сок яблочн. спирт.	10	палочки	<i>Lact. brevis</i> P ⁺
Сок яблочн. спирт.	48	палочки	<i>Lact. buchneri</i> P ⁺
Сок вишн. спирт.	1	палочки	<i>Lact. brevis</i> P ⁺
Сок вишн. спирт.	8	палочки	<i>Lactobacillus hilgardii</i> X ⁺

Обозначения: X⁺ ксилитоположительные;

P⁺ пентозоположительные.

столовых виноградных материалах, а также гетероферментативных кокков рода *Leuconostoc* свидетельствует о потенциальной возможности осуществления спонтанного биологического кислотопонижения вин и создаёт предпосылки для регулирования их кислотности.

Lact. brevis и *Lact. buchneri* - технологически самые нежелательные виды. Они выделяются почти всегда из больных вин. Хорошая сопротивляемость спирту и кислотности, способность утилизировать пентозы позволяет развиваться этим бактериям в винах с пониженным содержанием гексоз.

Выделение большого количества указанных бактерий должно настораживать и требует тщательного микробиологического контроля на всех стадиях приготовления вина.

Систематическое положение определяли и у 33 штаммов рода *Leuconostoc*, выделенных из анапских и киргизских вин (табл.1.5). При идентификации особое внимание уделялось сбраживанию пентоз. Учитывалась также характерная особенность бактерий рода *Leuconostoc* - их неспособность образовывать аммиак из аргинина [166].

Из 33 штаммов только 2 были отнесены к виду *Leuconostoc oenos*, остальные 31 штамм к виду *Leuconostoc mesenteroides* var. *gracile*.

Все культуры в большей или в меньшей степени, в зависимости от интенсивности роста, были способны к образованию CO_2 из глюкозы.

Полученные нами результаты вполне согласуются с мнением большинства исследователей о преимущественном преобладании гетероферментативных форм молочнокислых бактерий в винах, изготавливаемых в регионах с жарким климатом.

Таблица 1.5

Видовой состав молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*

Количество штаммов	Происхождение	Образование газа из глюкозы	Образование NH_3 из аргинина	Сбраживание ксилоты	Сбраживание арабинозы	Название вида
5	Анапа	+	-	-	-	<i>Leuc. mesenteroides</i>
26	Киргизия	+	-	-	-	— " —
2	Киргизия	+	-	-	+	<i>Leuc. Oenos A⁻</i>

Условные обозначения: + наличие признака;
- отсутствие признака

2. Развитие молочнокислых бактерий в зависимости от химического состава вин

В виноделии молочнокислые бактерии занимают особое место благодаря сложности и многообразию вызываемых ими изменений в винах. Влияние молочнокислых бактерий на качество вина зависит от его химического состава и физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов. Следует отметить, что молочнокислые бактерии развиваются во всех типах вин.

Молчнокислые бактерии утилизируют сахара (глюкозу, фруктозу, арабинозу и ксилоту), органические кислоты (яблочную, лимонную, винную), глицерин. При этом образуется молочная кислота и в большей или в меньшей степени летучие продукты (уксусная и янтарная кислоты, этиловый спирт, углекислый газ и др.). Помимо основных продуктов молочнокислые бактерии образуют некоторое количество вторичных продуктов брожения, играющих большую роль в сложении вина. К ним относятся диацетил, ацетон, 2,3-бутилентглицоль.

Только сбраживание яблочной кислоты в молочную, называемое яблочно-молочным брожением, является полезным и желательным при производстве некоторых типов вин.

Рибери-Гайон Ж. и соавт. [74] приводят систему бактериологического влияния на вина по степени возрастающей опасности:

- сбраживание арабинозы, лимонной кислоты и ксилоты - ограниченные изменения вина с образованием небольших количеств летучих кислот и небольшая потеря качества;

-сбраживание винной кислоты, глицерина, глюкозы и фруктозы - серьезные изменения вина до полной потери его качества, повышенное образование летучих кислот.

Степень опасности, которую бактерии представляют для вина, зависит от свойств вида и характеристики вина. Наименее опасны те бактерии, которые сбраживают яблочную кислоту, не затрагивая сахаров, либо сбраживают сахара без образования летучих кислот. Гетероферментативные кокки из среды, содержащей сахара и яблочную кислоту, в первую очередь используют яблочную кислоту. Это свойство делает гетероферментативные кокки наиболее желательными агентами яблочно-молочного брожения. Особенно подходящими для этой цели являются штаммы, не сбраживаю-

щие лимонную кислоту и арабинозу.

Другим подходящим возбудителем яблочно-молочного брожения считают гомоферментативные палочки. Они рекомендуются исследователями на том основании, что при сбраживании глюкозы не образуют летучих кислот, особенно те штаммы бактерий, которые не сбраживают пентоз и лимонной кислоты.

Гомоферментативные кокки, согласно исследованиям Пейно и Домерк [166], малополезны в молодых винах и нежелательны в старых. Энологическая ценность данного типа бактерий спорна.

Гетероферментативные палочки приносят наибольший вред, что подтверждается их частым присутствием в больных десертных и крепких винах и редким - в столовых винах на стадии яблочно-молочного брожения. У них не наблюдается несоответствия порогов рН сбраживания яблочной кислоты и сахаров, характерного для гетероферментативных кокков, а потребление сахаров происходит по гетероферментативному типу с образованием летучих кислот.

Молочнокислые бактерии вызывают заболевания вин, характеризующиеся изменением определённых составных частей или образованием нежелательных продуктов обмена.

Винную кислоту могут разлагать гомо- и гетероферментативные палочки и гетероферментативные кокки. Обладают этим свойством не все молочнокислые бактерии, а лишь отдельные штаммы. При разложении винной кислоты кислотность вина уменьшается, появляется "плоскость" вкуса.

Глицерин могут разлагать отдельные представители всех видов молочнокислых палочек и кокков. При этом образуются уксусная, молочная и пропионовая кислоты, углекислый газ и остро пахнущий акролеин с резкими вкусовыми качествами.

Разложение фруктозы с образованием маннита осуществляют в малоокислотных винах, содержащих этот сахар, гетероферментативные молочнокислые бактерии. При этом вино приобретает неприятный кисло-сладкий вкус. Маннитному брожению обычно сопутствует молочнокислое сбраживание углеводов, сопровождающееся повышением кислотности.

Молочнокислое брожение углеводов по гетероферментативному пути сопровождается обычно большим повышением летучей кислотности (до 4 г/дм³) и накоплением молочной кислоты. Заболеванию подвергаются, в основном, малоокислотные вина. Гомоферментативное брожение саха-

ров проходит без повышения содержания летучих кислот, но со значительным увеличением количества молочной кислоты; кислотность вина повышается. Брожение может сопровождаться возникновением неприятного кислого вкуса и тонов "квашения".

При развитии молочнокислых бактерий наблюдается образование летучих кислот. Основное их количество составляет уксусная кислота, в меньшем количестве накапливаются пропионовая и муравьиная кислоты. Особенно много кислот образуется при гетероферментативном брожении сахаров, а также при разложении винной кислоты и глицерина. Источником образования летучих кислот является использование бактериями лимонной кислоты с образованием молочной и уксусной кислот и углекислого газа. Обычно оно проходит параллельно с разложением яблочной кислоты.

Диацетил и ацетон образуются молочнокислыми бактериями в процессе биологического кислотопонижения. Считают, что образование диацетила не связано с видовыми особенностями молочнокислых бактерий и имеются большие колебания способности его синтеза в пределах вида. Диацетил и ацетон оказывают значительное влияние на сложение вина. По данным А.К. Родопуло и А.Ф. Писарниченко [77], вина игристые и сухие высокого качества содержат следы диацетила; вина среднего качества - 0,4-0,8 мг/дм³, вина низкого качества - свыше 0,8 мг/дм³.

Процессы, вызываемые в вине молочнокислыми бактериями, определяются не только систематическим положением инфицирующего микроорганизма, но в большой степени зависят от химического состава вина. В этой связи нами сделана попытка проследить, из каких виноматериалов бактерии выделяются чаще всего и чем отличаются эти виноматериалы. В табл. 2.1 представлены данные, отражающие эти показатели в винах Киргизии.

Результаты показывают, что наибольший процент выделения бактерий приходится на плодово-ягодные виноматериалы. Интересно, что в яблочных материалах не были обнаружены гетероферментативные кокки рода *Leuconostoc*. Не обнаружены они и в вишнёвых виноматериалах, характеризующихся очень высокой кислотностью. Из столовых виноградных виноматериалов бактерий выделено заметно больше, чем из крепленых. Для всех типов виноматериалов прослеживается такая тенденция: чем ниже кислотность, тем больше процент выделенных бактерий. Не удалось выделить

Таблица 2 1

бактерий из высококислотных столовых виноматериалов, где они были бы весьма желательны в качестве агентов биологического кислотопонижения. Выделение гетероферментативных палочек из низкокислотных виноматериалов свидетельствует о том, что вина находятся либо в стадии заболевания (на что указывает повышенное содержание летучей кислотности в некоторых материалах), либо имеют потенциальную возможность такого заболевания.

С целью выявления возможностей снижения кислотности вин биологическим способом нами был исследован состав органических кислот виноматериалов различных регионов бывшего Советского Союза [22,29,].

Показано (табл. 2.2), что высокое содержание яблочной кислоты, достигающее $6,0 \text{ г/дм}^3$, в виноматериалах Одесской области при умеренном количестве винной кислоты создаёт исключительно благоприятные условия для яблочно-молочного брожения. При содержании винной кислоты свыше $4,0 \text{ г/дм}^3$ рекомендуется предварительное химическое понижение кислотности на $1,5-2,0 \text{ г/дм}^3$. Аналогичные выводы следуют из анализа кислот в виноматериалах Севастопольской зоны и Закарпатской области. Относительно низким содержанием винной кислоты отличались виноматериалы Закарпатья, её количество составляло до 4 г/дм^3 , тогда как массовая концентрация яблочной кислоты превышала 7 г/дм^3 . Небольшие количества яблочной кислоты выявлены при обследовании виноматериалов Азербайджана, хотя и здесь в двух виноматериалах есть реальные возможности для развития процесса яблочно-молочного брожения. Неожиданно высоким для этой зоны оказалось содержание винной кислоты (до $4,9 \text{ г/дм}^3$). В виноматериалах Киргизии массовая концентрация винной кислоты варьирует по сортам: для Рислинга и Ркацители она составила $4,2-4,5 \text{ г/дм}^3$, в других сортах заметно ниже. В образцах с высоким содержанием молочной кислоты ($1,4-3,8 \text{ г/дм}^3$) прошло спонтанное яблочно-молочное брожение, причём это были образцы, в которых массовая концентрация винной кислоты не превышала $3,0 \text{ г/дм}^3$. В материалах с более высоким содержанием винной кислоты спонтанное кислотопонижение не прошло, несмотря на достаточный запас яблочной кислоты. Это говорит о целесообразности предварительного снижения кислотности химическим способом для создания благоприятных условий для ЯМБ.

Таким образом, широкий анализ кислот в виноматериалах различных природных зон показал наличие благоприят-

Тип виноматериала	Массовая концен- трация, г/дм ³		Количество образцов		Морфо- логичес- кая группа
	титру- емых кислот	летучих кислот	об- сле- до- вано	выделе- ны МКБ, в скоб- ках % от обследо- ванных	
Северная зона Киргизии					
Столовый виноградный	6,0-6,5	0,3-0,6	6	5(83,3)	палочки кокки
Столовый виноградный	7,3-8,0	0,3-0,8	7	3(42,8)	палочки кокки
Столовый виноградный	8,5-9,7	0,5-0,6	3	0	
Крепленный виноградный	4,5-6,0	0,2-0,8	14	6(42,8)	палочки
Крепленный виноградный	6,1-6,9	0,2-0,3	17	3(17,6)	кокки
Сок яблочный спиртованный	3,0-4,5	0,3-0,9	18	14(77,8)	палочки
Сок яблочный спиртованный	5,0-5,3	0,4-0,6	5	3(60)	палочки
Сок вишневый спиртованный	7,6	1,6	1	1(100)	палочки
Сок вишневый спиртованный	10,4- 10,6	0,1-0,6	3	1(33,3)	палочки
Сок вишневый спиртованный	14,4- 15,7	0,1	2	1(50)	палочки
Южная зона Киргизии					
Столовый виноградный	4,1	0,2-0,3	2	2(100)	палочки кокки
Столовый виноградный	5,3-6,4	0,3-0,6	7	1(14,3)	палочки
Крепленный виноградный	2,9-3,6	0,2-0,3	15	3(20)	палочки
Крепленный виноградный	4,5-6,0	0,2-1,0	3	2(65,7)	палочки

ных условий для развития молочнокислых бактерий. Яблочно-молочное брожение считается не только фактором снижения кислотности высококислотных виноматериалов, но и важнейшим фактором биологической стабильности. Поэтому его прохождение следует считать целесообразным и для низкокислотных вин, где запас яблочной кислоты очень низок и снижение кислотности за счёт её сбрасывания окажется несущественным.

Таблица 2.2
Содержание основных кислот в виноматериалах различных регионов виноделия

Наименование виноматериала	Массовая концентрация кислот, г/дм ³		
	винной	яблочной	молочной
Одесская область			
Алиготе	2,6-2,8	5,2-5,4	0,4
Сильванер	2,4-3,0	5,3-5,4	0,4
Фетяска	2,4-3,0	5,1-5,2	0,4
Пино	3,0-4,0	5,5-5,8	0,3-0,5
Ркацители	4,5	6,0	0,4
Севастопольская зона Крыма			
Рислинг	2,5-2,8	4,4-4,6	0,4
Ркацители	1,6-4,0	3,2-4,4	0,3-0,4
Закарпатская область			
Ноа	3,5-3,7	6,4-7,2	0,1-0,5
Траминер	1,8	5,0	0,1
Леанка	1,7-2,2	4,2-5,2	0,1-0,2
Изабелла	3,0-3,3	6,2-6,3	0,2
Рислинг	2,7-3,9	3,9-4,8	0,1-0,4
Мюллер-Тургау	1,5-2,3	4,2-4,3	0,1-0,3
Азербайджан			
Ркацители	4,9	1,3	0,2
Матраса	2,3	3,7	0,2
Баян ширей	3,0-4,3	1,6-2,3	0,2
Киргизия			
Кульдзинский	2,8-3,0	4,0-4,2	0,6-0,7
Баян ширей	2,7-3,0	1,3-2,8	1,4-3,8
Ркацители	4,2-4,4	4,2-4,7	0,3-0,5
Рислинг	4,2-4,5	1,6-1,8	0,6-0,7
Пино	2,1-3,3	2,0-4,0	0,1-3,0
Каберне	1,8-2,2	1,7-1,8	0,1-2,9

3. Особенности развития молочнокислых бактерий в процессе яблочно-молочного брожения

Из всех процессов, вызываемых в вине молочнокислыми бактериями, полезным является только разложение яблочной кислоты в высококислотных винах. Разложение других компонентов приводит к нежелательным изменениям вина и является безусловно вредным. Разложение яблочной кислоты, называемое яблочно-молочным брожением, играет значительную роль и в производстве игристых вин.

Имеется обширная литература по механизму этого процесса, который до сих пор нельзя считать до конца установленным. Суть его сводится к превращению яблочной кислоты в молочную с помощью ряда ферментов, некоторые из которых являются адаптивными и проявляются бактериями при наличии яблочной кислоты. Рибера-Гайон Ж. [74], Радлер Ф. [172] показали, что для разложения 1 г яблочной кислоты бактериями необходимо 0,1-0,2 г глюкозы в качестве источника энергии.

Многочисленные исследования [1, 65, 70, 74, 90, 92, 146, 147, 166] показали, что из вин подвергавшихся яблочно-молочному брожению, изолируются различные виды молочнокислых бактерий, как гомоферментативных (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*), так и гетероферментативных (*Lact. buchneri*, *Lact. brevis*, *Lact. hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citrovorum*, *Leuconostoc vini*, *Leuconostoc gracile*).

Считается общепризнанным, что яблочно-молочное брожение в вине может быть вызвано любым видом молочнокислых бактерий. Однако, для качества вина этот вопрос имеет особое значение. Предпочтение следует отдавать бактериям, которые при разложении яблочной кислоты не затрагивают другие компоненты вина и поэтому не накапливают или накапливают в минимальных количествах побочные продукты.

С этой точки зрения наиболее благоприятными агентами кислотопонижения являются гомоферментативные палочки *Lactobacillus plantarum* и гетероферментативные кокки рода *Leuconostoc*.

Яблочно-молочное брожение в винах с "зелёной" кислотностью значительно улучшает вкус, делая его мягким и гармоничным. Кроме того, яблочная кислота в вине в количестве более 2 г/дм³ является фактором биологической де-

стабилизации. Поэтому, при приготовлении столовых и шампанских виноматериалов прохождение яблочно-молочного брожения является весьма желательным с точки зрения повышения их качества и биологической стабильности.

При благоприятных условиях процесс яблочно-молочного брожения довольно легко проходит спонтанно, благодаря естественной молочнокислой микрофлоре.

Рибери-Гайон Ж. и соавторы [74], обобщив многочисленные сведения о разложении кислоты в винах, указывают, что уже в начале века яблочно-молочное брожение рассматривали как обычное явление в виноделии. По мнению авторов, без яблочно-молочного брожения не было бы выдающихся бордоских вин, исходя из этого, они обосновали необходимость не препятствовать этому процессу при приготовлении тонких высококачественных вин.

Для ординарных вин массового потребления яблочно-молочное брожение представляет собой ещё один элемент стабильности и часто значительного улучшения качества.

Необходимость яблочно-молочного брожения для повышения качества и стабильности вин подчёркивает в своём обзоре Гнаеджи Ф. [125], утверждавший, что получение стабильного вина высокого качества требует, чтобы за спиртовым брожением как можно скорее проходило яблочно-молочное брожение.

Соцци Т. и соавт. [189], обобщая сведения о яблочно-молочном брожении, указывают на то, что вина, претерпевшие ЯМБ, вследствие большей стабильности требуют значительно меньшее количество диоксида серы для предупреждения развития микроорганизмов. Авторы сообщают также о существующей в некоторых странах с жарким климатом, таких как Австралия, практике добавления в сусло винной и яблочной кислот для понижения значения рН до 3,2-3,5, способствуя тем самым яблочно-молочному брожению для получения высококачественных вин типа шампанского, а также вин Бордо, Мерло и др.

Минарик Э. [158] утверждает, что не требует доказательства тот факт, что яблочно-молочное брожение в относительно северных винодельческих странах - Швейцария, Чехословакия, Германия - является чрезвычайно важным биологическим процессом, влияющим на формирование качества вина.

Проведение биологического кислотопонижения путём введения в вино культуры молочнокислых бактерий связан с определёнными трудностями.

Размножение инокулированных в вино молочнокислых бактерий затрудняет довольно ограниченный набор питательных компонентов, в особенности азотистых веществ. Большое значение имеет соотношение винной и яблочной кислот и его рН. Чем выше содержание яблочной кислоты, тем легче индуцируется процесс ЯМБ.

Брешо К. [101] показано, что при содержании яблочной кислоты больше 40 ммоль яблочно-молочное брожение начинается после спиртового брожения и частично проходит параллельно со спиртовым брожением, если яблочной кислоты меньше 40 ммоль.

Решающее влияние рН на развитие яблочно-молочного брожения отмечено в работах Михеля М. [157], Бусбура, Кунке Р. [100], Манка де Награ М., Страссер де Саад А. [150], Рабинович З.Д. [69,68], Гробман М. [128], Рунжик-Перик В. [179]. Скорость брожения была прямо пропорциональна первоначальным значениям рН. Этим авторы объясняют более лёгкое прохождение яблочно-молочного брожения в красных винах, поскольку фенольные вещества снижают ОВ-потенциал.

В крупных резервуарах яблочно-молочное брожение проходит легче, чем в мелкой таре, что связывают с длительным сохранением благоприятной для развития молочнокислых бактерий температуры [47,49].

Важным моментом проведения индуцированного яблочно-молочного брожения является вопрос о периоде внесения бактериальной культуры. Многие авторы считают нецелесообразным проведение кислотопонижения в присутствии сахаров из-за риска нежелательных процессов [134].

Однако, в сообщениях Пейно Э., Домерк С. [165], Галзи П., План С. [121], Голландеса Ж. [120], Вебба Р. и Ингрэхэма Ж. [196] убедительно показано, что при внесении молочнокислых бактерий до окончания спиртового брожения шансы на успешное прохождение яблочно-молочного брожения значительно возрастают.

Как известно, непрерывное культивирование микроорганизмов явилось основой усовершенствования многих технологических процессов. Технология биологического кислотопонижения виноматериалов в непрерывном потоке разработана Орешкиной А.Е., Сарисвили Н.Г., Трофимченко А.В. [3]. Сущность способа заключается в комплексном использовании дрожжей и молочнокислых бактерий, что даёт возможность вести биологическое кислотопонижение и регулировать окислительно-восстановительные процессы при

производстве столовых вин. Промышленная установка сконструирована в НПО "Яловены" [45,46], на Одесском заводе шампанских вин [85].

Имеются сообщения об опыте использования сухих культур молочнокислых бактерий для проведения яблочно-молочного брожения [7,40], однако он не доведен до промышленного внедрения.

В последние годы много внимания уделяется анализу возможности использования для биологического кислотопожнения иммобилизованных микроорганизмов. Отработаны режимы иммобилизации молочнокислых бактерий в гелях альгината и каррагината, изучены условия проведения яблочно-молочного брожения иммобилизованными бактериями. Показана перспективность данного направления исследований [56, 114, 115].

Гнаежди и соавт. [126,127], испытав различные опытные и коммерческие препараты бактерий яблочно-молочного брожения, пришли к выводу об их ненадежности вследствие низкой жизнеспособности бактерий и отсутствии активности в вине. Кроме того, авторы рекомендуют использование нескольких штаммов молочнокислых бактерий одновременно или друг за другом в связи с обнаруженным явлением лизиса бактерий в процессе яблочно-молочного брожения специфическими бактериофагами [189,190].

Источником молочнокислых бактерий в шампанском производстве являются, в основном, поступающие виноматериалы. Благодаря своим малым размерам (0,5-0,6 мкм) бактерии попадают в тиражную смесь после контрольной фильтрации купажа (за исключением обеспложивающей фильтрации). Присутствие молочнокислых бактерий при шампанзации и послетиражной выдержке резко ухудшает структуру осадка. Разложение же яблочной кислоты при этом играет значительную роль в сложении качества готового шампанского.

К сожалению, сведения о значении яблочно-молочного брожения в шампанском производстве крайне ограничены и противоречивы. Родопуло А.К. [75,76] на основании изучения превращения органических кислот в процессе приготовления виноматериалов и шампанзации считал целесообразным снижение содержания яблочной кислоты. Пиерра Ж. [169] при изучении яблочно-молочного брожения в винах Шампани отмечал, что в шампанских виноматериалах процесс этот не всегда желателен из-за риска конкуренции бактерий с дрожжами при шампанзации. Поэтому при получе-

нии шампанских виноматериалов стремятся к завершению яблочно-молочного брожения до вторичного брожения.

Цаков Д. и Спиров Н. [86] при исследовании влияния яблочно-молочного брожения на качество шампанского отметили, что яблочная кислота повышает вкусовые качества шампанских виноматериалов и улучшает шампанские, т.е. пенистые и игристые свойства. Однако авторы не определяют каких-либо количественных границ в содержании яблочной кислоты и указывают на необходимость тщательного анализа при оценке целесообразности проведения яблочно-молочного брожения.

Павлов Д. [62] в обзоре положительных и отрицательных сторон яблочно-молочного брожения подчеркнул, что вопрос о его целесообразности решается не шаблонно, а исходя из количественного соотношения винной и яблочной кислот в вине, и сочетании с другими аналитическими показателями.

Цветанов О. и Бамбалов Г. [88,89] при изучении влияния яблочно-молочного брожения на качество красных игристых вин указывают, что наиболее высококачественные вина с кондициями "полусухое" получают из виноматериалов, где не проходило яблочно-молочное брожение, тогда как вина с кондициями "брют" можно получать из виноматериала сорта Каберне-Совиньон с прошедшим кислотопожением.

Процесс яблочно-молочного брожения не сводится к простому уменьшению количества яблочной кислоты.

Зинченко В.И. [37], придавая важное значение водорастворимым полисахаридам в формировании мягкого вкуса вина, исследовал влияние яблочно-молочного брожения на изменение полисахаридов в белых столовых винах. Им показано, что молочнокислые бактерии в процессе яблочно-молочного брожения способствуют заметному обогащению вина полисахаридами бактериального происхождения, сложными углеводов- и азотсодержащими соединениями (гликопротеинами с преобладанием в углеводном составе моносахаридов галактозы, арабинозы и частично уроновых кислот). Поэтому яблочно-молочное брожение является весьма эффективным технологическим приемом для получения достаточно экстрактивных белых столовых вин с мягким гармоничным вкусом. Однако, поскольку накопление углеводов-белковых соединений может вызвать помутнение коллоидного характера, предложено обработку столовых виноматериалов проводить после завершения яблочно-молочного брожения [39].

Изучение ароматических веществ вина с прошедшим

биологическим кислотопонижением [156] показало, что в 70-100% случаев яблочно-молочное брожение вызывает повышение концентрации следующих веществ: н-бутилового эфира уксусной кислоты, 3-гидрокси-2-бутанола, этилового эфира молочной кислоты, этилового эфира н-октановой кислоты, 2-октанолола, изопентилового эфира молочной кислоты, метилового эфира н-декановой кислоты, фенил-этилового эфира гексановой кислоты.

Показано увеличение интенсивности окраски молодого красного вина после яблочно-молочного брожения на 20-80% по сравнению с контролем. Объясняется это тем, что в процессе яблочно-молочного брожения в результате конденсации, адсорбции и окисления сформировались стабильные и интенсивно-окрашенные комплексы окрашивающих веществ [174]. Эта взаимосвязь подтвердилась снижением содержания свободных антоцианов и увеличением степени конденсации в опытных винах в отличие от контрольных.

Дитрих Х. и соавт. [113] при изучении влияния яблочно-молочного брожения на химический состав молодых вин установили увеличение концентрации D-лактата, этилового эфира молочной кислоты, уксусной кислоты, акролеина, приведенного экстракта, глюконовой кислоты и иногда глицерина. Концентрация высших спиртов (C_3 - C_5) была приблизительно одинаковой.

Таким образом, представленные данные литературы убедительно показывают неослабевающий интерес к молочнокислым бактериям вина в контексте решения проблемы регулирования кислотности вин. Однако, несмотря на многочисленные исследования в этом направлении, нерешённым остаётся вопрос о надёжности и гарантированности проведения индуцированного яблочно-молочного брожения путём скрининга активных штаммов-кислотопонижателей и создания условий для биологического кислотопонижения за счёт естественной молочнокислой микрофлоры. Кроме того, совершенно очевидно, что в отечественном виноделии этому вопросу уделялось мало внимания, что сдерживает введение в практику яблочно-молочного брожения, являющегося важнейшим фактором повышения качества и стабильности виноматериалов и вин.

Изучение особенностей развития молочнокислых бактерий для индуцирования яблочно-молочного брожения предполагает прежде всего оптимизацию условий культивирования этих микроорганизмов, отличающихся достаточно высокими питательными потребностями.

С целью выбора оптимальной среды для накопления биомассы молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc* при приготовлении разводки чистой культуры нами изучены натуральные среды (табл. 3.1). Учёт бактерий вели по интенсивности мутности, замеряемой на фотоэлектрокалориметре с последующим пересчётом на количество клеток в 1 см^3 .

Для проведения процесса был избран температурный режим 37°C , поскольку в некоторых руководствах он рекомендуется для быстрого размножения молочнокислых бактерий. Перемешивание осуществляли каждые 3 часа, создавая условия умеренной аэрации.

Анализ представленных данных убедительно показывает целесообразность аэрации при культивировании молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*. Оптимальным для накопления биомассы оказался температурный режим $26-28^\circ\text{C}$. Лучшими питательными средами явились смесь солодового сусла с виноградным и солодовое сусло с яблочной кислотой.

Такой режим и питательная среда рекомендованы для приготовления разводки молочнокислых бактерий в производственных условиях для проведения процесса яблочно-молочного брожения.

Таблица 3.1
Интенсивность роста молочнокислых бактерий
на различных питательных средах

Питательные среды	Количество клеток бактерий, млн/ см^3			
	26-28 $^\circ\text{C}$		37 $^\circ\text{C}$	
	с перемешиванием	без перемешивания	с перемешиванием	без перемешивания
Солодовое сусло 3,5% СВ	2500	2000	195	175
Виноградное сусло 17 г/100 см^3 сахара	1060	880	580	560
Смесь солодового сусла с виноградным (1:1)	7600	3900	2480	600
Смесь виноградного сусла с водой (1:1)	750	590	700	365
Яблочное сусло	1100	960	1820	1260
Солодовое сусло 3,5% СВ + 2 г/ дм^3 яблочной кислоты	3506	2255	2245	1150

3.1. Влияние соотношения винной и яблочной кислот на скорость яблочно-молочного брожения

В высококислотных винах ингибиторами бактерий являются как высокая концентрация ионов водорода, так и недиссоциированные формы винной кислоты при наличии небольших количеств яблочной. С целью определения влияния соотношения винной и яблочной кислот в виноматериале на процесс яблочно-молочного брожения в наших исследованиях разводку молочнокислых бактерий вносили в вино, в которое по расчёту добавляли винную кислоту до 4-6 г/дм³ (табл. 3.2). Яблочно-молочное брожение прошло при всех сочетаниях винной и яблочной кислоты, при этом чем больше было яблочной кислоты, тем интенсивнее прошёл процесс её утилизации. Содержание винной кислоты до 6 г/дм³ при наличии активной популяции бактерий не тормозит процесс кислотопоножения. Остаточные количества яблочной кислоты в пределах 1-2 г/дм³ остаются неиспользованными. Изменения рН были незначительны и не превышали 0,1.

Таблица 3.2

Влияние соотношения винной и яблочной кислот на процесс яблочно-молочного брожения

Содержание кислот, г/дм ³		Массовая концентрация титруемых кислот, г/дм ³			рН
винной	яблочной	исходная	после ЯМБ	разность от исходной	
4	2	7,8	6,9	0,9	3,3/3,3
4	4	9,8	8,4	1,4	3,2/3,3
4	6	12,3	10,3	2,0	3,2/3,2
5	2	8,8	7,8	1,0	3,2/3,3
5	4	10,7	9,3	1,4	3,1/3,2
5	6	12,9	11,0	1,9	3,1/3,2
6	2	9,9	8,9	1,0	3,1/3,3
6	4	11,7	10,3	1,4	3,04/3,3
6	6	13,7	11,7	1,9	3,1/3,1

3.2. Особенности потребления яблочной кислоты и углеводов в процессе размножения МКБ рода *Leuconostoc*.

При анализе метаболизма молочнокислых бактерий, используемых в качестве агентов биологического кислотопоножения, большой интерес представляет вопрос о связи потребления яблочной кислоты и сахаров с накоплением биомассы бактерий.

В литературе существует мнение, что разложение яблочной кислоты начинается только тогда, когда рост бактерий достигает логарифмической фазы: оно продолжается во время стационарной фазы и даже в фазе отмирания [74]. По данным авторов, численность популяции должна превзойти 1 млн клеток на 1 см³, чтобы яблочно-молочное брожение действительно началось.

В наших исследованиях ставилась задача выяснить закономерности потребления сахаров и яблочной кислоты при накоплении биомассы молочнокислыми бактериями рода *Leuconostoc*.

Объектом исследования служили 2 штамма (101-11-3 и А-11-4). В качестве питательных сред использовали смесь солодового сусла с массовой долей сухих веществ 3% с яблочным суслом в соотношении 1:1 и разбавленное в 2 раза водой виноградное сусло с добавлением дрожжевого экстракта в количестве 0,3 г на 100 см³. Массовая концентрация титруемых кислот в смесях составила 4,1 и 3,0 г/дм³, массовая концентрация сахаров - 6,98 и 9,45 г/100 см³. Культивирование проводили при температуре 26°C.

На рисунке 3.1 показаны кривая роста молочнокислых бактерий (штамм А-П-4 на смеси солодового сусла с яблочным соком) и динамика снижения содержания яблочной кислоты и углеводов. Логарифмическая фаза роста была достигнута через 12-14 часов. Утилизация яблочной кислоты наблюдалась в процессе размножения бактерий и завершилась к 34 часам культивирования. Массовая концентрация сахаров за этот период снизилась незначительно, на 0,15-0,20 г/100 см³.

За 20 суток культивирования снижение массовой концентрации углеводов составило 1,4-1,6 г/дм³ на смеси солодового сусла с яблочным и несколько выше - 2,7-3,0 г/дм³ на виноградном сусле, что составило в среднем 20 и 30% соответственно. За счёт этого несколько повысилась массо-

вая концентрация титруемых кислот.

Существенных различий между использованными штаммами не обнаружено. Влияние среды культивирования выразилось в более ярком проявлении основных закономерностей роста на смеси солодового сусла с яблочным соком, чем на разбавленном виноградном сусле. Это связано, прежде всего, с низким содержанием яблочной кислоты ($2,0 \text{ г/дм}^3$). Установлено, что процесс утилизации яблочной кислоты тем интенсивнее, чем выше её концентрация. Кроме того, смесь солодового сусла с яблочным в большей степени отвечает

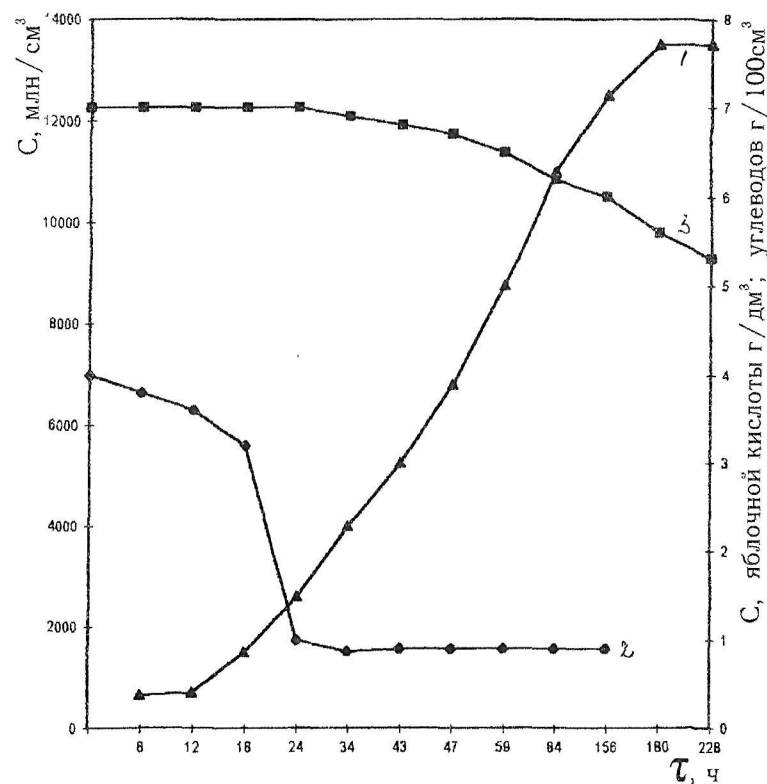


Рис. 3.1. Утилизация яблочной кислоты и углеводов в процессе размножения молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*;

- ▲— концентрация клеток молочнокислых бактерий, млн/см³;
- ◆— концентрация яблочной кислоты, г/дм³;
- концентрация углеводов, г/100см³.

потребностям молочнокислых бактерий по сравнению с разбавленным в 2 раза виноградным суслом. Таким образом, результаты исследования закономерностей потребления яблочной кислоты и углеводов молочнокислыми бактериями доказали, что в процессе культивирования молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc* на питательных средах с яблочной кислотой её утилизация наблюдается в самом начале логарифмической фазы и завершается задолго до её окончания. Потребление углеводов при этом было чрезвычайно низким не только в процессе размножения бактерий, но и в дальнейшем до прекращения их жизнедеятельности.

Установленные факты имеют принципиальное значение в плане использования молочнокислых бактерий для индуцирования яблочно-молочного брожения и свидетельствуют об отсутствии опасности его проведения в присутствии сахаров и высокой кислотности. Это не снимает необходимости контроля за процессом яблочно-молочного брожения. Развитие нежелательных изменений после утилизации яблочной кислоты вызваны не деятельностью внесенных бактерий, а развитием других групп молочнокислых бактерий, охотно развивающихся на фоне пониженной кислотности, обычно гетероферментативных палочек рода *Lactobacillus*, по нашим наблюдениям. Зарубежные исследователи указывают при этом на деятельность гомоферментативных кокков рода *Pediococcus* [74,103].

3.3. Скрининг штаммов молочнокислых бактерий для индуцирования яблочно-молочного брожения

Многочисленными исследованиями отечественных и зарубежных учёных установлено, что наиболее желательными агентами яблочно-молочного брожения являются гетероферментативные кокки, представленные родом *Leuconostoc*. Предпочтение им отдано по двум причинам. Среди молочнокислых бактерий это самые кислотовыносливые, способные развиваться в вине при pH 2,8. При высокой кислотности гетероферментативные кокки из раствора сахара и яблочной кислоты используют в первую очередь яблочную кислоту. Этим объясняется тот факт, что из вин на стадии яблочно-молочного брожения выделяются обычно бактерии рода *Leuconostoc*.

Исследования теории и практики биологического кислотопонижения связаны с использованием, главным обра-

зом, гетероферментативных кокков. В США для этой цели используется *Leuconostoc oenos* ML-34 и *Leuconostoc oenos* PSU-1. Французскими исследователями при изучении индуцированного яблочно-молочного брожения установлено возможное использование гомоферментативных молочнокислых бактерий наряду с гетероферментативными кокками.

В связи с неблагоприятными климатическими условиями в большинстве винодельческих районов СНГ актуальна проблема биологического кислотопонижения, отсюда возникла необходимость подбора культур для проведения яблочно-молочного брожения.

С этой целью нами изучен набор штаммов молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*, имеющийся в коллекции микроорганизмов ИВиВ "Магарач". Культуры были выделены из виноматериалов Киргизии, Закарпатья, Краснодарского края и Крыма в 1976-1981 годах. Предполагалось определить предельную концентрацию клеток бактерий и время их накопления; изучить влияние питательных сред на концентрацию бактерий; изучить влияние этилового спирта на скорость размножения бактерий и предельную концентрацию клеток бактерий; определить время сбраживания яблочной кислоты в виноградном сусле различными штаммами бактерий при совместном культивировании с дрожжами. Исследования проводили на 44 культурах, одна из которых, под шифром СЛР, состояла из смеси различных штаммов бактерий рода *Leuconostoc*, и была предложена З.Д. Рабинович в 1971 г. для индуцированного яблочно-молочного брожения. В качестве питательных сред использовали смесь солодового сусла (7% СВ) с яблочным соком в отношении 1:1, рН 3,15 и титруемой кислотностью 6,4 г/дм³ и пастеризованное виноградное сусло с титруемой кислотностью 14,5 г/дм³. Разводку молочнокислых бактерий культивировали на смеси солодового сусла с яблочным в течение 4 суток. Разводку дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* расы Феодосия 1-19 готовили на виноградном сусле в течение 2 суток. Концентрацию клеток бактерий определяли нефелометрически. Об устойчивости бактерий к этанолу судили по их способности развиваться в среде в присутствии спирта. Глубину утилизации яблочной кислоты определяли методом бумажной хроматографии.

Установлено, что максимальная концентрация клеток бактерий на среде из солодового сусла и яблочного сока достигается в течение 3-4 суток. Чётко выделяются штаммы, дающие высокие предельные концентрации клеток (2,9-

4,8·10⁸): (48-11-5; 101-5; 101-11-1; 101-1-3; 5-11-4; 5-11-5; 5-11-8; 5-11-10; А-1-2; А-1-10; А-1-11; А-11-4; 39-2). У некоторых штаммов предельные концентрации не превышали 1,2·2,0·10⁸. Однако высокая концентрация клеток бактерий не коррелировала с периодом их накопления. По этому показателю выделяются другие культуры: 21-2; 39-1; 39-2; ОК-43-2; ОК-43-3; ОК-43-7; 47-1; 47-2; 47-5; 47-6; 52-1; 101-11-2.

Объёмная доля этилового спирта в количестве 5 и 10% задерживает накопление клеток бактерий во времени, однако предельная концентрация их оказывается на уровне контрольной. Отмечены штаммы, мало чувствительные к спирту, у которых задержка роста не отмечалась либо не превышала 1-2 суток (21-1; ОК-43-5; ОК-43-7; 47-1; 47-5; 48-11-5; 52-2; 101-1-1; 101-11-1; 101-11-3; А-1-2; А-1-11; А-11-4). Интересная особенность обнаружена у штаммов: 101-1-2; 101-1-3 5-1-1; 5-11-2; 5-11-4; 5-11-5; 5-11-6; 5-11-8; 5-11-9; 5-11-10; СЛР. Их рост стимулировался в присутствии небольших доз этанола, разница во времени достижения предельной концентрации бактерий составляла у некоторых штаммов 3 суток.

На пастеризованном виноградном сусле размножение бактерий было медленным, а концентрация клеток очень низкой и не превышала 0,4-6,0·10⁷. Кроме того, клетки бактерий были значительно меньших размеров, чем на смеси солодового сусла с яблочным соком.

Таким образом, изучение таких свойств, как предельная концентрация бактерий, период их накопления, влияние этилового спирта на размножение бактерий не позволило выделить по этим показателям определённые культуры. В связи с этим особое внимание было уделено процессу сбраживания яблочной кислоты, который проводили на пастеризованном виноградном сусле при одновременном введении дрожжей и бактерий. В течение 10 суток с момента инокуляции разводки завершилось сбраживание яблочной кислоты штаммами: 39-1; 39-3; 47-5; 52-2; 52-4; 101-1-1; 101-1-2; 101-1-3; 101-11-1; 101-11-2; А-1-2; А-1-10; А-1-10; А-1-11. Снижение массовой концентрации титруемых кислот составило 3-4 г/дм³. У 11 культур этот процесс продолжался несколько дольше (14 суток), но у штаммов 101-11-3 и А-11-9 выбраживание яблочной кислоты было наиболее глубоким и снижение кислотности составило 5,4 г/дм³ и 4,5 г/дм³ соответственно. Уменьшение массовой концентрации титруемых кислот различными штаммами было в пределах 2,2-5,4 г/дм³. Были штаммы, которые провели процесс яблочно-молочного брожения только за 43-51 сутки.

Анализ полученных данных показал, что повышенная активность по отношению к яблочной кислоте не коррелировала со скоростью накопления клеток и предельной её концентрацией. Культура СЛР имела средний уровень по предельной концентрации клеток, стимулировалась невысокими дозами этанола, однако оказалась на последнем месте по способности утилизировать яблочную кислоту. Очевидно, потеря активности в отношении яблочной кислоты связана с длительным содержанием культуры в коллекции.

Результаты изучения активности кислотопонижения культурами молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*, выделенными из виноматериалов Симферополя и ОПБ "Магарач", представлены в табл. 3.3. Использовали пастеризованное виноградное сусло с массовой концентрацией титруемых кислот 9,2 г/дм³ и сахаров 12, 8 г/100 см³.

Показано, что минимальный срок сбраживания яблочной кислоты (7-10 суток) наблюдался у штаммов ОПБ 7-1-6; ОПБ 7-1-2. Основное снижение кислотности проходило в течение первых трёх суток, что подтверждает установленный нами ранее факт сбраживания яблочной кислоты в период логарифмической фазы роста МКБ рода *Leuconostoc*. Разница в объёмной доле спирта между контролем и опытными образцами объясняется тем, что молочнокислые бактерии в процессе размножения и ЯМБ используют сахар в качестве источника энергии. Низкое содержание спирта в образцах с затянувшимся процессом кислотопонижения объясняется, очевидно, его испарением. Выявлены также различия в питательных потребностях молочнокислых бактерий, в связи с чем качество используемого виноградного сусла в большей степени сказывается на деятельности одних штаммов по сравнению с другими.

Таким образом, в результате проведенной работы отобраны штаммы молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*, малочувствительные к этанолу и наиболее глубоко и быстро выбраживающие яблочную кислоту. Некоторые из этих штаммов (А-11-9; 101-11-3; А-1-2) во время сезона виноделия 1980 года были испытаны в производственных условиях для проведения индуцированного биологического кислотопонижения на предприятиях Крымсовхозвинпрома (совхоз-завод "Золотая балка", совхоз им. С. Перовской, совхоз-завод "Коктебель" и совхоз "Золотое поле"). Все три культуры дали хорошие результаты, рекомендованы для внедрения в производство и рассылаются по заявкам на заводы первичного виноделия.

Таблица 3.3

Характеристика виноматериалов после яблочно-молочного брожения на различных штаммах молочнокислых бактерий

Штамм	Массовая концентрация титруемых кислот, г/дм ³	Снижение кислотности, г/дм ³	Время завершения ЯМБ, сут.	Массовая концентрация			pH
				остаточного сахара, г/100 см ³	этанола, г/100 см ³	летучих кислот, г/дм ³	
ОПБ 7-II-5	7,2	2,2	41	0,2	6,9	0,4	3,5
ОПБ 4-7	7,0	2,3	20	0,2	7,2	0,6	3,6
ОПБ 4-3	7,0	2,1	70	0,2	4,7	0,3	3,6
103-II-3	6,8	2,3	24	0,2	6,9	0,5	3,5
ОПБ 4-8	6,8	2,3	17	0,2	7,1	0,5	3,5
ОПБ 7-II-2	7,0	2,1	15	0,2	7,1	0,5	3,5
ОПБ 7-II-I	6,8	2,3	10	0,2	7,4	0,6	3,6
ОПБ 7-I-10	7,0	2,1	14	0,2	7,1	0,7	3,6
Смесь	7,4	2,0	24	0,2	7,1	0,7	3,6
ОПБ 7-I-6	7,0	2,1	7	0,2	7,4	0,6	3,5
ОПБ 7-II-7	7,0	1,3	30	0,2	6,8	0,4	3,5
ОПБ 7-I-4	7,0	2,1	17	0,2	7,1	0,7	3,5
ОПБ 4-1	7,0	2,3	24	0,2	7,0	0,5	3,5
ОПБ 7-II-4	6,9	2,0	50	0,2	5,8	0,3	3,4
А-2-9	8,7	0,3	50	0,2	6,8	0,4	3,4
ОПБ 4-5	7,0	2,1	20	0,2	6,9	0,5	3,5
ОПБ 7-II-8	6,1	3,2	73	0,2	5,0	0,2	3,6
ОПБ 7-I-2	7,0	1,3	7	0,2	7,3	0,5	3,6
А-2-4	8,2	0,9	40	0,2	6,7	0,3	3,4
ОПБ 4-9	6,8	2,2	35	0,2	6,9	0,5	3,5
ОПБ 7-I-I	6,7	2,4	10	0,2	6,8	0,5	3,6
ОПБ 4-5	6,7	2,3	73	0,2	7,8	0,1	3,5
ОПБ 4-6	7,0	2,1	53	0,2	5,2	0,5	3,6
Контроль	10,6	-	-	0,2	7,7	0,4	3,3

Сложность получения большой биомассы гетероферментативных кокков на предприятиях первичного виноделия не исключает возможность использования гомоферментативных палочек, дающих большую биомассу по сравнению с гетероферментативными кокками.

С целью подбора активных кислотопонижателей была проанализирована коллекция гомоферментативных палочек, выделенных нами ранее из виноматериалов различного происхождения. Яблочно-молочное брожение проводили путём введения бактериальной разводки совместно с дрожжевой в пастеризованное виноградное сусло. Разводку бактерий готовили на смеси солодового сусла с яблочным в соотношении 1:1 и использовали двухсуточную в количестве 4%, 2-суточную дрожжевую культуру расы Феодосия 1-19 вносили в количестве 2%. Для исследования использовали пастеризованное виноградное сусло с содержанием сахаров 13 г/100 см³ и титруемых кислот 11 г/дм³. Помимо 18 штаммов гомоферментативных палочек, в исследование по кислотопонижению были включены для сравнения 2 штамма гетероферментативных кокков рода *Leuconostoc* (А-П-4 и 101-П-3), отобранные нами ранее как наиболее активные. Процесс проводили при температуре 27°C.

В табл. 3.4 представлена характеристика виноматериалов после яблочно-молочного брожения на разных штаммах молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus* и *Leuconostoc*.

По скорости проведения яблочно-молочного брожения выделяются прежде всего гетероферментативные кокки А-П-4 и 101-П-3. На используемом сусле они утилизировали яблочную кислоту в течение 3 суток и завершили процесс кислотопонижения задолго до окончания спиртового брожения. Основное количество штаммов гомоферментативных палочек провели яблочно-молочное брожение за 14-16 суток. 4 штамма завершили процесс только через 21-35 суток, а в образцах с 4 штаммами в течение 40 суток наблюдения снижение кислотности не наблюдалось. Продолжительность яблочно-молочного брожения определялась с момента внесения разводки.

Существенных различий в степени снижения кислотности в виноматериалах при использовании различных штаммов молочнокислых бактерий не обнаружено, оно составляло 2,7-3,1 г/дм³. Яблочная кислота была утилизована до остаточных количеств. За счёт выпадения винного камня несколько снизилось содержание винной кислоты. Разница в накоплении летучих кислот гомоферментативными палоч-

Таблица 3.4

Характеристика виноматериалов после биологического кислотопонижения

Штамм	Продолжительность ЯМБ, сут.	Массовая концентрация титруемых кислот, г/дм ³	Снижение кислотности, лотн. г/дм ³	Массовая концентрация летучих кислот, г/дм ³	Массовая концентрация органических кислот, г/дм ³		
					винной	яблочной	молочной
46-III-2	21	7,9	3,0	0,6	4,6	1,0	2,6
А-П-4	3	7,7	3,0	0,6	4,2	1,4	2,4
101-П-2	3	7,5	3,0	0,6	3,8	1,6	2,6
46-П-4	яблочно-молочное брожение не прошло						
46-П-3	35	7,7	2,9	0,5	3,6	1,4	1,8
О-21-6	14	8,0	2,6	0,4	3,7	2,4	1,5
46-III-4	14	8,0	2,8	0,4	4,0	2,0	1,8
48-П-4	16	7,8	2,9	0,4	4,1	1,2	1,6
46-I-4	21	7,8	3,1	0,4	4,5	1,4	2,4
А-IV-10	21	7,9	2,7	0,4	4,8	1,6	2,4
49-2	14	7,9	2,8	0,4	3,2	1,5	2,2
49-5	35	7,9	2,7	0,5	3,8	1,5	1,6
А-IV-П	16	7,9	3,1	0,6	3,8	1,2	2,6
О-21-5	яблочно-молочное брожение не прошло						
44-I-2	яблочно-молочное брожение не прошло						
46-IV-2	18	7,9	2,8	0,5	3,7	1,1	2,0
49-I	16	8,0	2,7	0,4	3,1	1,2	2,2
46-IV-6	14	7,6	2,9	0,5	3,8	1,0	2,1
К-39-2	16	8,0	2,7	0,5	4,2	0,9	1,8
44-П-4	яблочно-молочное брожение не прошло						
42-П-4	16	8,0	2,7	0,4	3,4	1,1	1,7
Исходное сусло	-	11,3	-	-	4,8	7,70	0,0

ками и гетероферментативными кокками была незначительна [17].

Таким образом, решающим фактором при отборе штаммов является активность утилизации яблочной кислоты и

скорость проведения яблочно-молочного брожения. По этому признаку лучшие из гомоферментативных палочек в 4-5 раз уступают гетероферментативным коккам и вряд ли окажутся перспективными для индуцированного кислотопонижения.

3.4. Разработка режимов индуцированного яблочно-молочного брожения

В решении проблемы яблочно-молочного брожения важное место занимает вопрос о времени внесения молочнокислых бактерий в процессе приготовления вина. Наиболее безопасным для качества продукта является проведение кислотопонижения в виноматериалах, поскольку при введении молочнокислых бактерий в сусло существует опасность сбраживания ими сахаров, в результате чего могут появиться квашеные тона. Однако осуществление процесса яблочно-молочного брожения связано с большими трудностями. Вино содержит довольно ограниченный набор питательных веществ, что затрудняет размножение бактерий. Лимитирующими факторами являются этанол и диоксид серы. Поэтому введение в вино селекционированной бактериальной культуры не всегда даёт положительные результаты.

Большинство исследователей при изучении индуцированного яблочно-молочного брожения используют введение бактерий в виноматериалы [95,96,97,143,112]. При этом кислотопонижение проходит в течение 19-50 недель. Отмечается лёгкость прохождения яблочно-молочного брожения при одновременном засеве сусла бактериями и дрожжами. Тем не менее рекомендуется введение бактерий в выброженный виноматериал [168].

Галзи К. и План С. [120] предлагают введение бактерий в выброженный виноматериал до окончания спиртового брожения при условии использования гомоферментативных молочнокислых бактерий, тогда как Вебб Р. и Кунке Р. [145] предлагают использование гетероферментативных кокков в таких же условиях.

Нашими многолетними исследованиями индуцированного яблочно-молочного брожения в производственных условиях установлено, что наиболее благоприятным является внесение разводки молочнокислых бактерий в бродящее сусло с остаточным сахаром 5-6 г/100 см³ или в сусло после от-

стаивания вместе с чистой культурой дрожжей.

Было проведено исследование влияния времени внесения разводки молочнокислых бактерий на динамику утилизации яблочной кислоты. Использовали 5 штаммов рода *Leuconostoc*, предварительно отобранных нами как активные кислотопонижатели, и разводку, состоящую из смеси трёх штаммов. Бактерии вносили в количестве 4% в виноградное сусло вместе с чистой культурой дрожжей и в сбраживаемое сусло при остаточном содержании сахаров 6-8 г/100 см³.

Результаты показывают (табл. 3.5), что все исследуемые штаммы оказались близкими по активности сбраживания яблочной кислоты. При введении молочнокислых бактерий в сусло перед брожением вместе с чистой культурой дрожжей яблочно-молочное брожение завершилось за 7 суток. Окончание процесса кислотопонижения совпало с завершением спиртового брожения. При этом снижение титруемой кислотности заметно уже на 2-3 сутки, несмотря на накопление органических кислот при спиртовом брожении и максимальное повышение титруемой кислотности в этот период, обусловленное спиртовым брожением. При внесении разводки бактерий в процессе брожения при остаточном содержании сахара 6—8% яблочно-молочное брожение затянулось до 18-23 суток, причём снижение кислотности наблюдалось только через 12-15 суток после внесения бактерий.

Динамика изменения титруемой кислотности, вызванного различными штаммами, отличалась незначительно. Исследование смеси трёх штаммов дало такие же результаты, как и использование чистых культур.

Снижение массовой концентрации кислот в образцах после яблочно-молочного брожения составило 2,3-3,1 г/дм³. В контрольном варианте без внесения молочнокислых бактерий после брожения она оказалась равной 11,6 г/дм³, тогда как в опытных образцах была в пределах 7,2-7,7 г/дм³. Значение pH в виноматериалах после кислотопонижения повысилось на 0,15-0,20 по сравнению с контролем.

Таким образом, по скорости проведения процесса яблочно-молочного брожения отобранные штаммы рода *Leuconostoc* практически не отличались друг от друга, так же, как и от исследованных ранее штаммов 101-11-3 и А-11-4. Что касается периода внесения разводки молочнокислых бактерий, то лабораторные исследования подтвердили отмеченное в производстве бесспорное преимущество одновре-

Таблица 3.5

Характеристика процесса яблочно-молочного брожения

Штамм	Период внесения культуры	Продолжительность ЯМБ, сут.	Снижение титруемой кислотности, г/дм ³	Массовая концентрация			рН
				титруемых кислот, г/дм ³	остаточных сахаров, г/100 см ³	легучих кислот, г/дм ³	
101-П-3	до брожения	7	3,1	7,3	0,2	0,5	3,5
101-П-3	в процессе брожения	21	2,9	7,3	0,1	0,5	3,5
ОПБ 7-I-6	до брожения	7	2,3	7,2	0,1	0,6	3,5
ОПБ 7-I-6	в процессе брожения	21	2,8	7,2	0,1	0,6	3,5
ОПБ 7-II-I	до брожения	7	2,6	7,2	0,2	0,6	3,5
ОПБ 7-II-I	в процессе брожения	23	2,3	7,7	0,2	0,5	3,5
ОПБ 7-I-I	до брожения	7	2,6	7,2	0,2	0,4	3,5
ОПБ 7-I-I	в процессе брожения	23	2,3	7,7	0,2	0,6	3,5
А-II-4	до брожения	7	2,6	7,3	0,17	0,4	3,47
А-II-4	в процессе брожения						
ОПБ 7-I-6, ОПБ 7-I-1, ОПБ 7-II-1	до брожения	7	2,6	7,2	0,16	0,6	3,5
ОПБ 7-I-6	в процессе брожения	18	2,8	7,2	0,12	0,7	3,5
Контроль	без МКБ			11,6	0,11	0,33	3,3

менного введения бактерий вместе с чистой культурой дрожжей в сусло перед брожением. Такой приём значительно ускоряет яблочно-молочное брожение, которое начинается без какого-либо периода адаптации. При этом не было отмечено появления посторонних тонов в виноматериале. Следовательно, при нормальных условиях виноделия, отсутствии возможности остановки спиртового брожения и использования высококислотных сусел нет оснований опасаться введения молочнокислых бактерий вместе с чистой культурой дрожжей в сусло перед брожением [16].

Проведение индуцированного кислотопонижения в производственных условиях во время сезона переработки винограда выдвинуло ряд дополнительных требований к используемым штаммам. Основная трудность возникает в создании оптимальных для развития молочнокислых бактерий температурных условий при резком снижении температуры воздуха.

В связи с этим изучали активность яблочно-молочного брожения при пониженных температурах на различных штаммах, включая выделенные в последние годы из виноматериалов со спонтанным кислотопонижением.

Объектом исследования служили 56 штаммов молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc* из коллекции ИВиВ "Магарач", выделенные нами в период 1976-1985 гг. Использовали пастеризованное виноградное сусло с массовой концентрацией сахаров 15,6 г/100 см³ и титруемых кислот 10,35 г/дм³, рН 3,19. Двухсуточную культуру бактерий в количестве 3,5% по объёму и дрожжей в количестве 2% вносили одновременно. Посевы инкубировали при температуре 8-12°C. Анализ динамики органических кислот показал, что через 8 суток практически ни в одном образце содержание яблочной кислоты не изменилось. Через 24 суток во многих образцах процесс яблочно-молочного брожения завершился. Отмечены лучшие в этом отношении штаммы: 83-III-4; 23-11-10; 52-5; 23-11-3; 47-5; А-1-10; 52-6; 23-11-1; 21-1; ОПБ 7-11-2; 47-2; 23-11-4; 101-1-2; 47-5; А-11-9; ОПБ 7-1-7; 101-11-1; 23-11-6; 52-2.

Отобранный 21 штамм молочнокислых бактерий использовали при тех же условиях для изучения динамики процесса яблочно-молочного брожения в условиях пониженных температур. Наблюдения вели в течение 2 месяцев. Почти все штаммы при температуре 8-12°C размножаются и осуществляют процесс яблочно-молочного брожения (табл. 3.6). Безусловно, процесс этот замедлен, и у лучших штаммов он

Таблица 3.6

**Динамика утилизации яблочной кислоты
молочнокислыми бактериями при температуре 8-12°C**

Штамм	Массовая доля титруемых кислот, г/дм ³							Снижение титруемых кислот, г/дм ³
	10 сут.	19 сут.	26 сут.	35 сут.	40 сут.	47 сут.	54 сут.	
A-1-10	9,5	9,3	8,5	7,0	6,9	6,8	6,7	3,4
47-6	9,9	9,3	8,9	7,8	7,2	7,2	7,0	3,1
ОПБ 7-11-2	9,6	9,4	8,5	7,2	6,9	6,7	6,5	3,6
101-1-1	10,0	9,8	8,7	8,0	7,4	7,0	6,8	3,3
101-1-2	9,6	9,3	8,3	7,0	6,9	6,7	6,6	3,6
52-6	9,8	9,2	8,2	6,8	6,6	6,6	6,4	3,8
52-5	10,0	9,5	8,6	6,9	6,8	6,8	6,6	3,6
21-1	9,9	9,5	8,7	7,2	6,9	6,8	6,7	3,5
23-III-4	9,4	9,2	8,2	6,4	6,4	6,2	6,2	3,9
23-II-1	10,0	10,1	9,7	8,0	7,9	7,5	7,4	2,8
23-II-6	10,0	9,7	9,2	8,1	7,9	7,5	7,4	2,7
47-2	9,8	9,4	9,1	7,4	6,8	6,5	6,6	3,6
52-2	9,9	8,9	9,5	6,9	6,8	6,6	6,3	3,8
A-II-9	9,9	9,1	8,6	7,4	7,2	6,9	6,4	3,7
23-II-10	10,2	9,8	9,2	8,0	7,8	7,5	7,4	2,8
47-5	9,9	9,2	9,0	7,0	6,8	6,5	6,4	3,7
23-11-3	9,8	9,4	9,3	7,7	7,1	6,6	6,4	3,7
23-11-4	10,0	9,4	9,1	7,5	7,4	6,9	7,0	3,2
101-11-3	10,0	9,2	8,6	7,5	7,2	6,9	6,5	3,6
Контроль	10,7	10,1	9,6	9,6				0,6

завершился через 1,5-2 мес. с момента внесения бактерий. Снижение массовой концентрации титруемых кислот составило от 2,7 до 3,9 г/дм³. Содержание яблочной кислоты снизилось до остаточных количеств, при этом основная часть яблочной кислоты была утилизирована через 30-35 суток, в дальнейшем шло медленное дображивание. Частичное снижение кислотности происходило также за счёт выпадения винного камня.

Отмечены лучшие штаммы: 101-11-3; 23-11-3; 47-5; A-11-9; 52-2; 23-11-4; 52-6; ОПБ 7-11-2; A-1-10, дающие интен-

сивный рост и отличающиеся повышенной способностью к утилизации яблочной кислоты при обычных температурах. Штаммы 101-11-3, A-11-9, рекомендованные нами ранее для проведения индуцированного яблочно-молочного брожения, могут быть использованы и для биологического кислотопо-нижения при пониженных температурах. К ним можно доба-вить такие штаммы, как ОПБ 7-11-2, 23-11-4, 52-6 и др. В производственных условиях при проведении яблочно-молоч-ного брожения при пониженной температуре следует исполь-зовать повышенные дозы бактериальной разводки (до 4% по объёму). Температура 8-12°C не исключает процесс, а лишь замедляет его, что вполне согласуется с литературными дан-ными по этому поводу.

Таким образом, полученные нами результаты чётко по-казали, что понижение температуры до 8-12°C не препят-ствует ни возникновению, ни прохождению яблочно-молоч-ного брожения. Для проведения биологического кислотопо-нижения при пониженных температурах могут быть реко-мендованы используемые для индуцированного яблочно-мо-лочного брожения штаммы 101-11-3, A-11-9, а также вновь выделенные штаммы ОПБ 7-11-2, 52-6, 23-11-4 и др. [18].

3.6. Практические аспекты яблочно-молочного брожения при приготовлении виноматериалов

Временная технологическая инструкция по снижению кислотности виноградных вин биологическим способом была утверждена Главвино СССР 18 сентября 1974 г. В сезон виноделия 1976 г. она апробировалась нами на нескольких винзаводах (Анапский на Кубани, им. С.Перовской и П.Оси-пенко в Крыму, Шабский в Одесской области). Анализ по-лученных данных подтвердил трудности индуцирования яб-лочно-молочного брожения при введении молочнокислых бактерий в вино. Ни в одном опыте процесс не завершился до конца, хотя жизнеспособные бактерии удавалось обнару-жить в виноматериалах через 1,5 мес. после их внесения. Резкое похолодание останавливало процесс, и в лучшем слу-чае, он проходил весной следующего года. Вино содержит довольно ограниченный набор веществ, что затрудняет раз-множение молочнокислых бактерий, отличающихся высоки-ми питательными потребностями. С целью исключения раз-множения бактерий яблочно-молочное брожение в винома-териалах проводили с использованием большой биомассы бактерий, иммобилизованных на наполнителе, которым слу-

жила буковая стружка. Как известно, закрепление микроорганизмов на наполнителе способствует более равномерному распределению клеток, улучшению газового режима, повышению активности обменных процессов.

Результаты исследования интенсивности сбраживания яблочной кислоты в периодических условиях в установке с наполнителем (табл.3.7) показывают, что активность молочнокислых бактерий в отношении яблочной кислоты падает. Однако на протяжении 1,5 месяцев бактерии сбраживали 2,5-3,0 г/дм³ яблочной кислоты, продолжительность процесса яблочно-молочного брожения от цикла к циклу увеличивалась. После подращивания бактерий, осуществляемого путём заполнения установки питательной средой, активность процесса повышалась, но также быстро падала.

Использование наполнителей целесообразно при непрерывных способах ведения процесса. Поточный процесс производили в течение месяца в цилиндрических стеклянных резервуарах с наполнителем объёмом 1500 см³ по схеме, предложенной Трофимченко и соавт. [84]. При анализе данных, полученных при работе аппарата в течение месяца, показано, что дополнительное введение разводки молочнокислых бактерий несколько ускоряло процесс сбраживания яблочной кислоты, однако, резких различий в скорости яблочно-молочного брожения с аппаратом без дополнительного введения молочнокислых бактерий отмечено не было. Интенсивность процесса в аппарате с наполнителем значительно превосходила таковую в аппарате без наполнителя и соответствовала одно- и 8-суточному циклу (табл.3.7). Таким образом, отработанный режим биологического кислотопонижения вин в потоке характеризуется следующими параметрами: культура бактерий - молочнокислые бактерии рода *Leuconostoc*, культура дрожжей - *S. cerevisiae* раса Феодосия 1-19; аппарат с наполнителем (буковые ролики); температура - 16-17°C; суточный цикл брожения при титруемой кислотности виноматериала не выше 10-11 г/дм³.

Последующие многолетние исследования яблочно-молочного брожения в производственных условиях показали, что наиболее рациональным является биологическое кислотопонижение, возникающее спонтанно и не требующее дополнительных затрат. При создании благоприятных условий спонтанное яблочно-молочное брожение успешно проходит в период переработки винограда на заводах первичного виноделия. Практика многих лет показывает, что при мягком режиме сульфитации (не выше 100 мг/дм³) спонтанная мо-

Таблица 3.7

**Интенсивность яблочно-молочного брожения
в установке с большой биомассой
молочнокислых бактерий на наполнителях**

Номер цикла	Продолжительность цикла, сут.	Снижение массовой концентрации титруемых кислот, г/дм ³	Скорость снижения массовой концентрации титруемых кислот, г/дм ³ в сутки
I	2	1,6	0,8
II	3	1,5	0,5
III	4	1,3	0,3
IV	5	1,3	0,3
V	6	1,1	0,2
VI	7	1,4	0,2
подращивание разводки	7		
VII	2	1,7	0,8
VIII	5	1,6	0,3
IX	6	1,6	0,3

лочнокислая микрофлора всегда присутствует в высококислотных виноматериалах. Спонтанно возникшее яблочно-молочное брожение нуждается в контроле и имеет то преимущество, что не только освобождает от трудоёмкой работы по приготовлению разводки молочнокислых бактерий, но и является более надёжным вследствие большей конкурентоспособности спонтанной микрофлоры, поскольку не нуждается в адаптации к условиям развития.

Многолетний опыт изучения естественной микрофлоры виноматериалов различных типов и различных климатических зон показал, что в высококислотных суслах и виноматериалах обычно присутствуют гетероферментативные кокки рода *Leuconostoc*. Снижение кислотности является для них механизмом обеспечения более благоприятных условий для своего развития, поэтому яблочная кислота является первым источником углерода, утилизируемым бактериями в средах с высокой кислотностью. Однако, снижение кислотности среды благоприятно не только для гетероферментативных кокков, но и для гетероферментативных палочек, ча-

сто сопутствующих им.

Вот почему, создавая условия для развития спонтанного яблочно-молочного брожения, необходимо тщательно контролировать процесс и после утилизации яблочной кислоты подавить дальнейшее развитие молочнокислых бактерий. Обычно для этого достаточно до 20 мг/дм³ свободного диоксида серы, к которому молочнокислые бактерии очень чувствительны.

Однако известно также, что спонтанный процесс кислотопонижения возникает не во всех виноматериалах и зависит от ряда факторов: инфицированности молочнокислыми бактериями, величины рН, содержания и соотношения винной и яблочной кислот, дозы и времени внесения диоксида серы, температуры брожения и хранения. Вот почему необходимость индуцированного яблочно-молочного брожения не теряет своей остроты.

Наши исследования закономерностей развития молочнокислых бактерий в процессе яблочно-молочного брожения дали основание для производственной проверки индуцирования процесса внесением разводки бактерий в сусло после отстаивания или в бродящее сусло с остаточным сахаром 5-8 г/100 см³. Это позволило проводить яблочно-молочное брожение вслед за спиртовым на стадии осветления виноматериала.

Проведение биологического кислотопонижения по такой схеме приводит к получению кондиционных по кислотности виноматериалов уже на предприятиях первичного виноделия. Виноматериалы, в которых прошёл процесс яблочно-молочного брожения, отличались мягкостью вкуса и чистым сортовым ароматом. Благодаря этому большая часть виноматериалов могла быть принята на выдержку, что даёт предприятию значительный экономический эффект. Полученные результаты и накопленный опыт позволили внести существенные коррективы в существующую инструкцию по биологическому кислотопонижению вин и разработать новую технологическую инструкцию по проведению биологического кислотопонижения при приготовлении столовых виноматериалов.

В течение ряда лет проводились заводские испытания технологии направленного биологического кислотопонижения в условиях первичного виноделия (винзаводы Крыма: им С.Перовской, им П.Осипенко, "Коктебель", "Золотое поле"; Закарпатской области: "Береговский", "Виноградовский"). В качестве разводки использовали отобранные нами

как активные штаммы-кислотопонижатели молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc* в дозе 3-4%. Процесс проходил почти до полной утилизации яблочной кислоты, остаточные количества которой составляли 0,8-1,2 г/дм³. При должном внимании сотрудников лаборатории к этому процессу в течение сезона переработки винограда биологическое кислотопонижение можно провести практически во всём объёме перерабатываемого сырья.

На основании полученных данных в сезон виноделия 1979 г. были проведены межведомственные испытания технологии направленного кислотопонижения при приготовлении столовых вин. Испытания проводили на базе совхоза-завода им. С.Перовской на сорте Рислинг рейнский при приготовлении виноматериала на марку Рислинг крымский. Технология получила положительную оценку и была рекомендована к внедрению в практику виноделия. Технологическая инструкция была утверждена Главплотвинпромом Украины 7.09.1981 г. [82]

В последние годы на винзаводы по их заявкам высылались культуры молочнокислых бактерий и при необходимости специалисты завода проводили процесс индуцированного кислотопонижения в сезон переработки винограда.

4. Взаимоотношения дрожжей и молочнокислых бактерий

Известно, что взаимоотношения между микроорганизмами складываются по-разному. Полярными проявлениями этих взаимоотношений являются симбиоз и антагонизм. Факт антагонизма дрожжей хорошо известен в практике процессов брожения. Он проявляется по отношению к другим дрожжам, а также иным видам микроорганизмов.

Особенности взаимоотношений молочнокислых бактерий и дрожжей в различных природных субстратах широко освещены в монографиях Квасникова Е.И. [41, 43, 44]. Явление антагонизма между бактериями и дрожжами в бродильных производствах и, в частности, в виноделии достаточно изучено [74, 79, 116, 130, 148]. Показано влияние дрожжей спиртового брожения на развитие молочнокислых бактерий и возникновение яблочно-молочного брожения. Некоторые виды дрожжей, очевидно способствуют ему, тогда как другие задерживают или полностью блокируют яблочно-молочное брожение.

Интересны взаимоотношения дрожжей и молочнокис-

лых бактерий в смешанных культурах. Буадрон М. [98] показал, что в смешанных культурах численность дрожжей бывает в 2-10 раз меньше, чем в чистой, то есть бактерии также оказывают неблагоприятное влияние на дрожжи, причём скорее на их рост, чем на брожение. Подавление спиртового брожения объясняется двумя причинами. Во-первых молочнокислые бактерии используют небольшие количества пировиноградной кислоты и ацетальдегида - промежуточных продуктов спиртового брожения, которые стимулируют рост дрожжей. Во-вторых, молочнокислые бактерии выделяют в среду L-орнитин, ингибирующий спиртовое брожение [98, 99].

Антагонизм между дрожжами и бактериями может быть различной природы и объясняется двумя основными причинами: эффектом конкуренции за питательные вещества вплоть до полного их исчерпания одним из партнёров; несопряжённым с конкуренцией синтезом и накоплением веществ различной природы, ингибирующих развитие другого организма.

Взаимоотношения дрожжей и молочнокислых бактерий в виноделии имеют большое значение. С точки зрения проведения индуцированного яблочно-молочного брожения необходим подбор расы дрожжей и штамма молочнокислых бактерий, которые при совместном культивировании способствуют завершению спиртового брожения и прохождению яблочно-молочного брожения. Напротив, в винодельческих районах, заинтересованных в предотвращении спонтанного кислотопонижения, можно подобрать расы дрожжей, тормозящих развитие молочнокислых бактерий. Особое место занимает этот вопрос в шампанском производстве, где во время вторичного брожения при наличии в купажном виноматериале яблочной кислоты и молочнокислых бактерий в достаточных количествах может возникнуть процесс яблочно-молочного брожения, приводящий к нарушению технологического процесса. Поэтому при подборе рас дрожжей для первичного и вторичного брожения в виноделии необходимо учитывать и характер взаимоотношений этих дрожжей с молочнокислыми бактериями.

При изучении взаимоотношений дрожжей с молочнокислыми бактериями нами использованы расы дрожжей, применяемые для получения шампанских виноматериалов и шампанизации из коллекции микроорганизмов ИВиВ "Магара" (в скобках указан коллекционный номер).

Раса 47-К (527) - *S. cerevisiae*, фенотип "киллер", используется в первичном виноделии.

Раса Ф-1-19(271) - *S. cerevisiae*, используется в первич-

ном виноделии.

Раса Ленинградская (307) - *Sacch. bayanus*, используется в первичном виноделии.

Раса 15 (580) - *Sacch. bayanus*, используется для шампанизации. Раса 30 (587) - *Sacch. bayanus*, используется для шампанизации. Раса 5(584) - *S. cerevisiae*, используется для шампанизации.

Раса Шампанская 7-10с - *S. cerevisiae*, используется для шампанизации.

Раса Артёмовская (588) - *Sacch. cerevisiae*, используется для шампанизации.

Раса Шампанская 81 (524) - *S. cerevisiae*, используется для шампанизации.

Раса Шампанская 83 (585) - *S. cerevisiae*, используется для шампанизации.

При изучении природы ингибирующего действия дрожжей по отношению к молочнокислым бактериям выбор дрожжей осуществлялся по фенотипу [6]:

I - 244 - *S. cerevisiae*, холодостойкая, фенотип "S";
 II - 432 - *S. bayanus*, фенотип "K";
 III - 118 - *S. cerevisiae*, Ркашители-6, фенотип "S";
 IV - 107 - *S. cerevisiae*, фенотип "N";
 V - 467 - *S. cerevisiae*, Кишинёв, фенотип "N";
 VI - 125 - *S. cerevisiae*, Романешты, фенотип "K";
 VII - 109 - *S. cerevisiae*, фенотип "N";
 VIII - 279 - *S. cerevisiae*, Кокур-3, фенотип "K";
 IX - 134 - *S. cerevisiae* Кахури-3-4, фенотип "S";
 X - 435 - *S. bayanus*, фенотип "K",
 при этом: фенотип "S" чувствительный; фенотип "K" - киллер, фенотип "N" - нейтральный.

Использованные в экспериментах молочнокислые бактерии из коллекции института "Магара" выделены нами в 1978-89 гг. из виноматериалов различных природных зон бывшего Советского Союза. Больше количество штаммов принадлежало к роду *Leuconostoc* (1-30), меньшее - к роду *Lactobacillus* (31-40):

1 - 101-1-3	21-ОПБ 7-1-2
2 - ОК-43-3	22-101-11-1
3 - 5-1-7	23-101-11-3
4 - 47-2	24 - 25-11-4
5 - 52-6	25 - 25-11-5
6 - 5-П-8	26 - 47-6
7 - 25-П-3	27 - ОПБ 7-П-2
8 - А-П-9	28 - А-1-10

9 - 48-П-5	29 - 83-Ш-4
10 - 25-П-6	30 - 101-П-2
11 - 5-П-5	31 - 7-1-10
12 - 21-1	32 - 4-Ш-7
13 - 52-2	33 - 7-1-7
14 - 23-П-7	34 - К-134-6
15 - 10-1-2	35 - К-134-5
16 - ОПБ 7-П-4	36 - К-144-9
17 - 47-5	37 - К-28-3
18 - 52-5	38 - 1-П-1
19 - ОПБ 7-1-1	39 - 1-Ш-6
20 - 5-П-6	40 - К-24-23

Взаимоотношение дрожжей и молочнокислых бактерий изучали в условиях совместного культивирования на виноградном сусле с массовой концентрацией сахаров 20 г/100 см³. Дрожжи вносили в количестве 2% в возрасте 3 суток, молочнокислые бактерии в количестве 4% в возрасте 5 суток. В контрольных вариантах для дрожжей использовали виноградное сусло, а для молочнокислых бактерий - параллельно виноградное сусло и смесь солодового сусла с яблочным в соотношении 1:1. Посевы инкубировали при температуре 26-27°C при периодическом перемешивании в течение 2 мес. В полученных виноматериалах определяли соотношение яблочной и молочной кислот, параллельно прямым микроскопированием устанавливали среднее количество молочнокислых бактерий в поле зрения микроскопа.

Исследование взаимоотношения дрожжей и молочнокислых бактерий в производственных условиях проведено при закладках опытных тиражей на Артёмовском заводе шампанских вин. В качестве источника молочнокислых бактерий использовали инфицированный производственный купаж.

В табл. 4.1 представлены результаты изучения взаимоотношений 10 штаммов молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc* с различными расами дрожжей. При этом первые 6 штаммов выделены из опытных тиражей Артёмовского завода шампанских вин в 1989 г., последние 4 штамма хранились в коллекции (1977-1979 гг.). Полученные данные свидетельствуют о том, что характер взаимоотношений молочнокислых бактерий с дрожжами зависит от обоих партнёров. Что касается дрожжей, то их влияние на молочнокислые бактерии связано с расовыми особенностями. Наиболее сильным стимулирующим эффектом отличались расы 587, 271, 520, 585, Раса 584 не способствовала развитию ни одного штамма молочнокислых бактерий, будучи либо нейтральной

Таблица 4.1
Взаимоотношения молочнокислых бактерий
с дрожжами

Штамм МКБ	Раса дрожжей									
	527	580	527	584	271	520	588	524	585	307
11-15-6	-	++	++	+	++	++	++	++	++	+
1-30-2	-	-	++	+	++	++	+	-	++	+
1-30-5	-	++	+	+	++	++	++	+	+	+
1-520-2	-	-	++	-	++	++	++	-	++	-
1-520-5	-	-	++	-	++	++	-	-	++	-
A-11-9	-	-	+	-	+	++	-	-	+	-
0-18-4	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
5-11-10	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
101-11-3	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
ОПБ										
7-11-5	-	++	++	+	++	++	+	-	++	++

Условные обозначения:

- “++” - стимуляция роста молочнокислых бактерий дрожжами, прошло яблочно-молочное брожение, при микроскопировании много бактерий в поле зрения;
- “+” - отсутствие стимуляции или ингибирования молочнокислых бактерий, очень медленно проходит яблочно-молочное брожение, бактерий до 10 клеток в поле зрения;
- “-” - ингибирование роста молочнокислых бактерий дрожжами, содержание яблочной и молочной кислот на уровне контроля, при микроскопировании единичные клетки молочнокислых бактерий не в каждом поле зрения.

в этом отношении, либо проявляя антагонистические свойства. Близки к ней культуры 524 и 307, которые проявили стимулирующие действие только по отношению к одному штамму из десяти. Особое место занимает раса 527 (киллер), ингибирующая все обследованные штаммы молочнокислых бактерий. В отдельном эксперименте показано, что при совместном культивировании дрожжей расы 527 с 70 штаммами молочнокислых бактерий (51 рода *Leuconostoc* и 19 рода *Lactobacillus*) ни одна культура не обнаружила роста.

Анализ отношения молочнокислых бактерий к совместному культивированию с дрожжами вызывает предположение о его зависимости от срока хранения культуры в условиях коллекции. Среди молочнокислых бактерий, проявив-

ших положительный тест на стимулирующее действие дрожжей, были главным образом, свежевыделенные из производства штаммы. Из штаммов, длительное время хранящихся в коллекции, только А-11-9 стимулировался расой 520. 6 рас дрожжей из 10 исследованных способствовали развитию штамма ОПБ 7-П-5, выделенного в 1981 г. Остальные штаммы молочнокислых бактерий, выделенные в 1978-1979 гг., при совместном культивировании с дрожжами либо не реагировали на их присутствие, либо ингибировались ими.

Результаты исследования взаимоотношений дрожжей и молочнокислых бактерий с учётом природы ингибирующего фактора обобщены в табл. 4.2.

При этом показано полное соответствие микроскопической картины и данных хроматографического определения органических кислот. Так, отсутствие на хроматограмме яблочной кислоты сопровождается большим количеством клеток молочнокислых бактерий в поле зрения. При наличии яблочной кислоты микроскопическая картина оказалась более сложной: - единичные клетки не в каждом поле зрения, что свидетельствует об отсутствии роста молочнокислых бактерий; - наличие до 5 клеток молочнокислых бактерий в поле зрения, свидетельствующее об очень слабом развитии бактерий; - присутствие 5-10 клеток бактерий в поле зрения при меньшей концентрации яблочной кислоты, соответствующее началу процесса яблочно-молочного брожения.

Среди испытанных 40 штаммов молочнокислых бактерий выделяются культуры, у которых складываются с дрожжами вполне благоприятные взаимоотношения. Это культуры 1,2,4,14,24,25, соответствующие штаммам 101-1-3; ОК-43-3; 47-2, 23-П-7; 25-П-4; 25-П-5 рода *Leuconostoc* и 35,36, соответствующие штаммам К-134-5 и К-144-9 рода *Lactobacillus*.

С другой стороны, можно отметить культуры молочнокислых бактерий, на которые присутствие дрожжей сказывается неблагоприятно независимо от расы. Это штаммы 83-Ш-4; 101-П-2 рода *Leuconostoc* (номера 29 и 30) и 7-1-10; 4-Ш-7; 7-17 и 1-Ш-6 рода *Lactobacillus* (номера 31,32, 33 и 39). Обнаруженный факт свидетельствует о непригодности таких культур для индуцирования яблочно-молочного брожения.

В табл. 4.3 эти данные обобщены в отношении влияния рас дрожжей на рост молочнокислых бактерий. Анализ представленных результатов позволяет выделить среди исследованных рас дрожжей культуры, в большей степени способствующие развитию молочнокислых бактерий и проведению

ими яблочно-молочного брожения. Это расы 125, 435, 467, 134. Напротив, выявлены расы дрожжей, в большей степени ингибирующие рост молочнокислых бактерий, нежели стимулирующие его; это прежде всего раса 118, в меньшей степени расы 107, 244, 432.

Совершенно очевидно, что стимулирующий или ингибирующий эффект дрожжей не связан с их фенотипом. Среди 10 исследованных рас дрожжей не выявлено ни одной, которая давала бы однозначный эффект со всеми штаммами молочнокислых бактерий, при этом, для большинства рас дрожжей преобладают нейтральные взаимоотношения. Это подтверждает тезис о том, что характер взаимоотношений зависит от обоих партнёров.

На следующем этапе изучено взаимоотношение дрожжей и молочнокислых бактерий в производственных условиях (винзавод совхоза "Виноградный", Крым). В связи с тем, что виноматериалы этого завода отличаются зачастую большой обсеменённостью молочнокислыми бактериями, предполагалось выявить влияние используемой для брожения расы дрожжей на наличие и проявление жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Исследованы более 20 образцов виноматериалов, находящихся на дрожжах, а также снятых с густового осадка и непосредственно дрожжевые осадки. Анализ проводили путём прямого микроскопирования, посева на селективную питательную среду и хроматографического определения органических кислот.

Установлено, что молочнокислые бактерии присутствуют практически во всех обследованных виноматериалах. Рост на селективной питательной среде через 2-3 суток культивирования выявил высокую жизнеспособность молочнокислых бактерий. При этом молочнокислая микрофлора оказалась достаточно разнообразной: обнаружены как палочковидные формы рода *Lactobacillus*, так и кокковые рода *Leuconostoc*. Хроматографический анализ органических кислот в виноматериалах показал, что яблочно-молочное брожение прошло не во всех образцах. При этом контрастно выделялись виноматериалы, выбродившие на расе 47-К и находящиеся на дрожжевом осадке. Виноматериалы, полученные с использованием расы 47-К, но уже снятые с осадка дрожжей, соответствовали началу яблочно-молочного брожения. Это даёт основание предполагать, что для подавления развития молочнокислых бактерий дрожжами расы 47-К важен сам факт их присутствия. После осветления виноматериалов и снятия их с дрожжевого осадка снимается ингибирующий эф-

Таблица 4.2

**Взаимоотношения молочнокислых бактерий
с различными расами дрожжей**

Расы дрож- жей	Штамм МКБ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
244	«S»	-	++	+	+	-	+	+	-	++	+	-	+	+	-	+	++	-	+	-	-
432	«K»	++	+	+	-	-	-	++	-	++	+	+	+	+	++	+	-	+	+	-	-
118	«S»	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	++	+	+	+	+	-	-
107	«N»	++	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	++	+	+	++	+	++	-	-
467	«N»	+	++	+	++	++	-	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	-	+
125	«K»	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-
109	«N»	-	++	+	++	++	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	++	-
273	«K»	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	++	-
134	«S»	++	++	+	++	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	-	-
435	«K»	++	+	+	++	++	-	++	++	+	++	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+

фект и сохранившие жизнеспособность молочнокислые бактерии беспрепятственно размножаются, индуцируя яблочно-молочное брожение.

Показано также, что ингибирующий эффект дрожжей расы 47-К по отношению к молочнокислым бактериям не обнаруживается в присутствии посторонней дрожжевой флоры.

Так, в производственных условиях совхоза-завода «Виноградный» в сезон виноделия 1992 г. все шампанские и столовые виноматериалы на заводе получены с использованием расы 47-К. Практически во всех виноматериалах, отобранных на стадии дображивания, осветления и снятых с осадка, были обнаружены молочнокислые бактерии в большем или меньшем количестве. Отмечалось также сильное обсеменение обследованных виноматериалов пленчатыми дрожжами. Наблюдения за прохождением яблочно-молочного брожения не выявили наличия ингибирующего эффекта. Очевидно основной причиной этого явилось наличие посторонней дрожжевой флоры.

Аналогичные результаты были получены нами при закладке опытного тиража бутылочного игристого вина на базе цеха искристых вин винсовхоза «Ливадия». Использовали 9 рас шампанских дрожжей и консорциум молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc*, состоящий из 4 штаммов. Тиражную смесь готовили на необработанном виноматериале, сильно инфицированном пленчатыми дрожжами. Проведенные в течение 6 месяцев наблюдения не позволили выявить каких-

Продолжение таблицы 4.2

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
+	+	-	+	++	+	+	+	-	-	-	-	+	+	++	+	+	+	-	-
-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	++	+	+	+	-	-
-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
-	-	-	++	+	++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
-	+	+	++	++	+	+	++	-	-	+	-	-	++	++	+	+	+	+	-
++	++	++	++	++	+	+	++	-	-	+	-	-	-	+	++	+	+	+	+
-	++	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
++	-	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+	+	-	+
++	++	-	++	++	++	+	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+	+	-	-
++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	+	-	-	-	++	+	+	+	-	+

Условные обозначения:

- «++» - яблочная кислота отсутствует или в следовых количествах, при микроскопировании очень много бактерий в поле зрения (завершение процесса ЯМБ);
- «+» - яблочная кислота на уровне контроля или чуть ниже, бактерий до 10 кл. в поле зрения (начало процесса ЯМБ);
- «-» - яблочная кислота на уровне контроля, бактерии единичные не в каждом поле зрения;
- «S» - фенотип «чувствительный»;
- «K» - фенотип «киллер»;
- «N» - фенотип «нейтральный».

либо взаимоотношений молочнокислых бактерий с дрожжами вторичного брожения. Обильная посторонняя микрофлора, очевидно, препятствовала проявлению этого эффекта.

Литературные данные по изучению антагонистических отношений среди дрожжеподобных грибов свидетельствуют о наличии фенотипа «киллер» среди представителей различных родов: *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Debariomyces*, *Candida*, *Torulopsis* и др. [44, 172, 194] При этом обычно киллер-фактор проявляется на уровне межвидовых взаимоотношений внутри рода. Имеется достаточно сведений о способности дрожжей фенотипа «киллер» одного рода подавлять развитие дрожжей, относящихся к другим родам. Так, некоторые виды рода *Saccharomyces* подавляли

развитие дрожжей родов *Candida* и *Cryptococcus*, а рода *Candida* - представителей родов *Torulopsis* и *Candida*. Эти сведения не единичны. Однако в литературе не отмечено факта обнаружения действия дрожжевого киллер-токсина на бактерии.

Полученные нами данные о взаимоотношении дрожжей и молочнокислых бактерий вполне согласуются с имеющимися сведениями о природе киллер-фактора. Подавление дрожжами развития молочнокислых бактерий при совместном культивировании имеет расовую специфичность и не связано с киллер-фактором.

Таким образом, обобщение многолетних исследований взаимоотношений молочнокислых бактерий с дрожжами приводит к следующим выводам. При совместном культивировании дрожжей и молочнокислых бактерий выявлены расы, способствующие и препятствующие развитию бактерий. Характер взаимоотношений дрожжей и молочнокислых бактерий зависит от обоих партнёров. Ингибирующее действие на молочнокислые бактерии проявляется только при совместном культивировании и при наличии активной дрожжевой популяции и не связано с "киллер-фактором". Присутствие большого количества посторонних дрожжей препятствует проявлению ингибирующего эффекта. Использование рас дрожжей с ингибирующей по отношению к молочнокислым бактериям активностью целесообразно прежде всего в производстве вин акратофорным способом. Расы дрожжей, стимулирующие развитие молочнокислых бактерий, рекомендуются при сбраживании высококислотных сусел для скорейшего прохождения процесса биологического кислотопонижения. Для индуцирования яблочно-молочного брожения следует использовать консорциум молочнокислых бактерий с учётом их взаимоотношений с дрожжами.

Исследования, проведенные в производственных условиях Артёмовского завода шампанских вин, подтвердили многие из этих положений [19].

Анализ микрофлоры кюве через 6 месяцев после закладки тиража (табл. 4.4) выявил существенные различия. При проведении вторичного брожения с использованием таких рас, как 520, 585, 588, 587, наблюдалось обильное развитие молочнокислых бактерий, при этом во всех образцах прошёл процесс яблочно-молочного брожения. Напротив, в вариантах с использованием рас 584, 524, 118, 306 были обнаружены единичные молочнокислые бактерии не в каждом поле зрения и отсутствие процесса яблочно-молочного бро-

Таблица 4.3

**Влияние рас дрожжей на рост
молочнокислых бактерий**

Раса дрож- жей	Стимуляция роста МКБ		Ингибирование роста МКБ		Отсутствие влияния на рост МКБ	
	коли- чество штам- мов	% от обсле- дован- ного кол-ва	коли- чество штам- мов	% от обсле- дован- ного кол-ва	коли- чество штам- мов	% от обсле- дован- ного кол-ва
244 «S»	5	12,5	15	37,5	18	45
432 «K»	6	15	15	37,5	20	50
118 «S»	2	5	21	52,5	17	42,5
107 «N»	7	17,5	13	47,5	14	35
467 «N»	10	25	8	20	21	52,5
125 «K»	23	57,5	6	15	11	27,5
109 «N»	6	15	14	35	20	50
279 «K»	6	15	11	27,5	23	57,5
134 «S»	11	27,5	13	32,5	16	40
435 «K»	18	47,5	10	25	12	30

жения, что можно объяснить неблагоприятными взаимоотношениями, сложившимися между молочнокислыми бактериями и данными расами дрожжей.

В исходном купаже, отобранном в качестве контроля, за 6 мес. выдержки выявлено массовое развитие молочнокислых бактерий и отсутствие яблочной кислоты в результате завершившегося яблочно-молочного брожения.

При микробиологическом обследовании образцов опытного тиража через 3 года выдержки (табл. 4.4) выявлено наличие молочнокислых бактерий практически во всех образцах, в большем или меньшем количестве. Хроматографическое определение органических кислот показало отсутствие яблочной и присутствие значительных количеств молочной кислоты, что свидетельствует о прошедшем яблочно-молочном брожении во всех вариантах независимо от расы дрожжей и схемы оклейки. Определение жизнеспособности молочнокислых бактерий путём посева на селективную питательную среду живых бактерий не выявил. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ингибирующий эффект дрожжей в отношении молочнокислых бактерий проявляется

Таблица 4.4

**Влияние микрофлоры на качество
кюве 3 лет выдержки**

Вариант	Наличие ЯМБ через 6 мес. вы- держки	Характер микрофло- ры через 3 года вы- держки	Дегустацион- ная характерис- тика	Дегус- таци- онная оценка
1	2	3	4	5
Раса 588, бенито- нит	ЯМБ прошло. Крупные овальные од- нородные клетки основ- ной культуры, МКБ, типа Leuconostoc	клетки дрожжей основной культуры, посторон- ние мелкие клетки дрожжей	легкая окисленность слабая задуш- ка, вкус про- стой, мягкий, легкая горчинка	9,1
Раса 588, аль- гинат натрия	ЯМБ прошло. МКБ типа Leuconostoc		букет чище, более свежее, полнее, мягче, насыщенность СО ₂ , горчинка	9,2
Раса 306, бенито- нит	единичные МКБ, ЯМБ	ЯМБ про- шло, МКБ много	уходящий посторонний тон, неболь- шая окислен- ность вкус простой, неприятный	9,0
Раса 306, альги- нат натрия	единичные МКБ, ЯМБ не прошло	ЯМБ про- шло, МКБ много	посторонний тон в букете, неприятное послевкусие, грубость	9,0
Раса 587, бенито- нит	МКБ типа Leuconostoc, ЯМБ прошло		букет свежий, легкий посто- ронний тон, вкус мягкий, полный	9,1

Продолжение таблицы 4.4

1	2	3	4	5
Раса 587, альги- нат натрия	ЯМБ прошло, МКБ типа Leuconostoc много		посторонний тон, задушка, вкус неполный, грубый, неопре- деленный	8,97
Раса 118, бенито- нит	ЯМБ не прошло единичные МКБ	ЯМБ прошло, МКБ много	свежее, букет чистый, вкус мягкий, гармо- ничный, в послевкусии молочная корочка	9,17
Раса 118, альги- нат натрия	ЯМБ прошло, МКБ типа Leuconostoc		букет чистый, вкус мягкий, гармоничный, уступает пре- дыдущему, несколько разлажен	9,14
Раса 524; альги- нат натрия	ЯМБ не прошло, единичные МКБ	ЯМБ прошло, много МКБ типа Leuconostoc	букет чистый, медовый, вкус простоват	9,12
Раса 585, бенито- нит	ЯМБ прошло, МКБ типа Leuconostoc много		букет непри- ятный, вкус разлажен, слабая задушка	9,0
Раса 520, альги- нат натрия	ЯМБ прошло, много МКБ типа Leuconostoc		посторонний тон, слабая задушка, вкус разлажен	9,04

ся в условиях совместного культивирования и только в при-
сутствии живых дрожжей.

Одной из отличительных особенностей дрожжей для шампанского производства является их быстрое отмирание непосредственно после проведения вторичного брожения. Параллельный анализ дрожжевой микрофлоры через 6 мес. выявил некоторое количество живых клеток; полное отмирание их происходит обычно к 8-9 мес. выдержки.

Утрата жизнеспособности дрожжевой популяции привела к беспрепятственному размножению присутствующих в виноматериале и сохранивших свою жизнеспособность молочнокислых бактерий. Очевидно, природа ингибирующего эффекта не связана с определённым веществом, выделяемым в среду дрожжами, а может заключаться в конкуренции за какой-либо источник питания, жизненно необходимый как дрожжам, так и молочнокислым бактериям. В этом отношении и дрожжи, и молочнокислые бактерии обладают расовыми и штаммовыми отличиями. В табл. 4.5 представлены данные, характеризующие химический состав кюве после 3 лет выдержки.

Анализируя полученные данные, следует отметить образец П-520, отличающийся самым низким содержанием этанола, органических кислот, экстракта и при этом самым высоким содержанием летучих кислот. Это один из образцов, в которых наблюдалось массовое развитие молочнокислых бактерий во время вторичного брожения.

Что касается органолептической оценки, то для большинства образцов не удалось отметить корреляции между периодом развития молочнокислых бактерий и яблочно-молочного брожения и дегустационной характеристикой кюве 3 лет выдержки. Так, высокую дегустационную оценку получил образец П-588, выброженный на производственной расе Артёмовского завода с использованием в качестве оклеивающего вещества альгината натрия. В этом образце массовое развитие молочнокислых бактерий и прохождение яблочно-молочного брожения наблюдалось в начальные сроки выдержки. Несколько уступают ему образцы, полученные с использованием расы 118, в которых развитие молочнокислых бактерий наблюдалось в более поздние сроки после полного отмирания дрожжей основной культуры. В целом на качество готового продукта основное влияние оказывает раса дрожжей, используемая для шампанзации.

Таким образом, использование при бутылочной шампанзации рас дрожжей с антагонистическими по отношению к молочнокислым бактериям свойствами не может гарантировать от развития последних в процессе трёхлетней выдер-

Таблица 4.5
Содержание основных химических компонентов
в кюве 3 лет выдержки

Образец	Объем- ная доля этанол- а, % об	Массовая концентрация				
		титру- емых кислот, г/дм ³	винной кисло- ты, г/дм ³	летучих кислот, г/дм ³	амин- ного азота, мг/дм ³	экст- ракта, г/дм ³
П-588 Альгинат натрия, раса Артёмовская	11,30	5,93	3,4	0,396	448	6,4
П-588 Бентонит, раса Артёмовская	11,20	5,70	3,15	0,495	434	8,4
П-587 Альгинат натрия, раса Шампанская- 30	11,35	5,85	3,25	0,462	420	13,8
П-524 Альгинат натрия, раса Шам- панская-81	11,25	6,00	3,40	0,363	448	6,4
П-585 Альгинат натрия, раса Шам- панская-83	11,25	5,85	3,15	0,462	434	13,8
П-118 Аль- гинат нат- рия, раса Ркацители-6	11,20	5,85	3,3	0,396	434	8,7
П-118 Бентонит, раса Ркацители-6	11,55	4,23	3,3	0,492	452	7,3
П-520 Альгинат натрия, раса Шам- панская -7-10	10,75	4,23	3,25	0,528	420	4,9

жки. Шампанские дрожжи отмирают через 8-9 мес. с момента закладки тиража, тем самым снимается "тормозящий" развитие молочнокислых бактерий фактор. Показано, что ингибирующий эффект осуществляется только при наличии живой активной дрожжевой популяции и связан, очевидно, с конкуренцией за жизненно важный источник питания

Что касается получения игристых вин резервуарным способом, то в связи с короткими сроками брожения и отсутствием длительной после тиража выдержки в присутствии дрожжей использование таких рас дрожжей для вторичного брожения надёжно защитит шампанизируемый виноматериал от развития в акратофорах молочнокислых бактерий.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при подборе рас дрожжей для шампанизации необходимо учитывать и такое свойство, как характер их взаимоотношений с молочнокислыми бактериями.

5. Явление бактериофагии у молочнокислых бактерий вина

Несмотря на многочисленные исследования биологического кислотопонижения с помощью молочнокислых бактерий процесс индуцированного яблочно-молочного брожения не всегда оказывается успешным. Одной из причин неудач яблочно-молочного брожения является присутствие бактериофагов.

В настоящее время бактериофагия фактически превратилась в самостоятельную область биологии, теоретическое и практическое значение которой выходит далеко за пределы микробиологии. Фаги представляют собой особую группу микроорганизмов: это ультрамикроскопические паразиты бактерий, которые по своим биологическим свойствам приближаются к вирусам животных и растений. Явление бактериофагии широко распространено в природе. Последние научные данные свидетельствуют о том, что везде, где есть микроорганизмы, есть и бактериофаги.

Проблема бактериофагии оказалась весьма актуальной для ряда производств, основанных на использовании жизнедеятельности микроорганизмов, на которых в результате фаголизиса стали наблюдаться серьёзные нарушения технологического процесса.

Выявление наличия фагов к большинству известных групп микроорганизмов вызывает необходимость считаться с явлениями фагии при работе с микроорганизмами.

Что касается виноделия и, в частности, молочнокислых бактерий вина, то вопрос этот имеет не только теоретическое значение как для проблемы фагии, так и для биологии молочнокислых бактерий, но и практический интерес в связи с той ролью, какую играют молочнокислые бактерии в технологическом процессе.

Первое сообщение об обнаружении фагов в вине сделано Соцци Т. и Марэ Р. [191]. В винах на стадии яблочно-молочного брожения обнаружено 3 морфологических типа фагов. Подчёркивается, что все фаги выявлены в материалах, рН которых был ниже 3,5.

Дальнейшие исследования этого вопроса [190, 103, 125] привели авторов к убеждению, что трудности яблочно-молочного брожения вина связаны с атакой молочнокислых бактерий бактериофагами. При этом выделены два вида бактериофагов с различной литической способностью *Leuconostoc oenos* [190].

Минарик Э. [158] при обследовании молодых вин Швейцарии показал, что присутствие бактериофагов тормозит не только индуцированный внесением чистой культуры молочнокислых бактерий процесс яблочно-молочного брожения, но и кислотопонижение, развивающееся за счёт спонтанной микрофлоры.

Гнаеджи Ф. и соавт. [126], Соцци Т. и Гнаеджи Ф. [189] при широком исследовании роли бактериофагов в процессах виноделия предложен поиск молочнокислых бактерий, резистентных к фагу, и приготовление на их основе стартовых культур для проведения яблочно-молочного брожения.

5.1. Оптимизация условий выявления фаголизиса у молочнокислых бактерий вина

Поскольку при работе с фагом первостепенное значение имеет получение хорошего газона культуры на поверхности агаровой пластины и в связи с исключительно слабым ростом молочнокислых бактерий вина на плотных средах, была проведена работа по подбору оптимального состава питательной среды.

Испытанные в качестве стимуляторов 8-оксихинолин (0,0012-0,0020%), ионы натрия (0,025-0,25 М), аммиак (0,0001 М), стрептомицин (0,1-1,5 г/см³) не оказывали влияния на формирование негативных колоний фага. Считается, что эти вещества благоприятствуют адсорбции фага на бактериальной клетке и его внутриклеточному размноже-

нию. Стрептомицин, избирательно действуя на клеточные мембраны, способствует проникновению фага в клетку.

Положительные результаты получены при использовании ионов кальция, которые добавляли в среду в виде хлористого кальция в дозе 0,1 М. Исследование ряда питательных сред для получения газона и выявления фаголизиса на нём привело к выбору мясо-пептонного агара (МПА), который готовился с добавлением хлористого кальция (0,1 М) и дрожжевого экстракта (0,5 %).

Отработка метода освобождения культуральной жидкости от бактерий включала анализ таких приёмов, как центрифугирование, фильтрование через фильтр Зейтца, обработка хлороформом.

В большинстве методик по изучению фаголизиса предлагается центрифугирование при 4000 мин⁻¹ в течение 20-40 мин. Полученные нами данные о стерильности центрифугатов молочнокислых бактерий, полученных при разных условиях, показали неприменимость данного метода. При высеве на агаровые пластинки все центрифугаты давали массу мелких стекловидных колоний. Очевидно это связано с особенностями развития гомоферментативных палочек. Наблюдения молодой культуры отмечали выраженный полиморфизм: культура была представлена длинными тонкими нитями, сильно перевитыми и содержащими массу кокковидных телец на концах нитей и в свободном состоянии. Позже количество кокковых форм заметно снижается. Очевидно, присутствие таких мелких форм мешает полному осаждению молодой культуры молочнокислых бактерий при центрифугировании.

Из исследований фагов молочнокислых бактерий в молочной промышленности освобождение от бактерий достигается путём фильтрования через фильтр Зейтца. Однако, по многим литературным данным, метод этот не рекомендуется ввиду значительной адсорбции фага фильтром, причём чем ниже концентрация вируса, тем больше его адсорбция, вплоть до полной потери фага.

Выход из положения был найден путём предварительной обработки фильтра мясным бульоном или раствором желатины для насыщения адсорбционной ёмкости фильтра белками [55].

Удобным и быстрым методом освобождения от бактерий является обработка исследуемого субстрата хлороформом [18], но он применим только при работе с фагами, не чувствительными к хлороформу. В связи с отсутствием сведений о чувствительности фагов молочнокислых бактерий к

хлороформу, проверить этот метод можно было, лишь получив достаточно активный фаг.

Исследования по влиянию хлороформа на молочнокислые бактерии и их фаги с позиций эффективного освобождения исследуемого субстрата от бактерий показали, что 10-20-минутная обработка хлороформом полностью убивает бактерии и не действует на фаги. 30-минутная обработка несколько снижает активность фагофильтра.

Полученные результаты позволили в дальнейшем использовать фильтрование через фильтр Зейтца только при получении фаголизатов с высоким титром. Для освобождения от бактерий исследуемой на присутствие фага жидкости пользовались более простым методом обработки хлороформом.

Работа с фагом предусматривает использование культуры в экспоненциальной фазе роста, для обнаружения которой были построены графики роста двух штаммов гомоферментативных палочек *Lact. plantarum* (К-8-4 и К-12-11). Изученные штаммы отличались по кинетике роста. Логарифмическая фаза наступала через 14-15 часов с момента посева и продолжалась в течение 8 часов у штамма К-8-4 и в течении 4 часов у штамма К-12-11.

Изучение кинетики роста молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc* показало, что экспоненциальная фаза начиналась через 22-24 часа с момента посева и продолжалась до 58-60 часов.

На основании полученных данных в дальнейшей работе использовали культуру рода *Lactobacillus* в возрасте 18-20 часов, рода *Leuconostoc* - в возрасте 26-28 часов.

Изучение чувствительности молочнокислых бактерий к УФ-облучению проводили с целью определения оптимальной дозы облучения для выявления индуцированной фагопродукции. УФ-лучи дозировали путём изменения времени экспозиции от 10 с до 1 мин. В литературе оптимальной для индукции фага является доза, при которой погибает половина популяции бактерий. Путём мерного высева взвесей бактерий до и после облучения удалось установить, что оптимальной дозой для исследуемых бактерий можно считать 30 сек.

Опытным путём показано и оптимальное время инкубации облученной взвеси. Оно составило 6-7 часов при температуре 28°C при условии высева на солодовое сусло в отношении 1:100.

5.2. Лизогения молочнокислых бактерий вина

Лизогения представляет собой одно из самых замечательных явлений в биологии микроорганизмов и в бактериофагии и является своеобразным генетическим симбиозом, при котором генетический материал фага переходит в латентное состояние, внедряется в генетический аппарат бактерии хозяина и таким образом превращается в часть хромосомы и ведёт себя как бактериальный ген, хотя физически представляет структуру, включающую большое количество генов. В результате лизогенизации клетка приобретает наследственную способность продуцировать фаг без предварительного инфицирования её данным фагом.

В последние годы лизогения выявлена почти у всех групп микроорганизмов. Такое широкое её распространение даёт основание считать это явление нормальным состоянием микробной клетки на данном этапе её эволюции [73].

Изучение явления бактериофагии в технологических процессах показало, что источником бактериофагов на производстве обычно являются лизогенные культуры. Сведений о лизогении молочнокислых бактерий относительно мало, и касаются они, в основном, молочной промышленности. Первое сообщение о лизогении *Str. cremoris* находим у Яковлева Д.А. [93], выделившего фаг из чистой музейной культуры.

По данным Палладиной О.К. с соавт. [63], лизогенные культуры молочнокислых стрептококков встречаются крайне редко.

Райтер П. [71] показал, что источником фага в молочнокислой закваске явились лизогенные культуры.

Анализ литературы показывает, что сведения о лизогении молочнокислых бактерий весьма противоречивы. Наряду с сообщениями о выявлении лизогенных культур среди различных видов молочнокислых бактерий [33, 106, 137, 183 и др.] есть данные и о неудачных попытках обнаружения этого явления [53, 118 и др.]. Многие исследователи отмечают, что обнаружить лизогенные штаммы в роде *Lactobacillus* очень трудно [182]. Обращает на себя внимание и тот факт, что большинство из описанных в последнее время умеренных фагов лактобактерий оказались дефектными, то есть неспособными давать негативные колонии или зоны лизиса.

Так, Киог Б. и Шиммин П. [137] выявили фагоподобные частицы с бактериоциноподобной активностью при УФ-облучении *Str. cremoris*.

Клерк Х. и Гюго Н. [140] при индукции митомицином

Lactobacillus обнаружили ингибирующую активность, связанную с дефектными фагами.

Сакурай Тошизо и соавт. [181] при исследовании 110 штаммов *Lactobacillus* выявили 3 лизогенных штамма *L. salivarius* и 1 штамм *L. casei*. Однако ни ингибирующей активностью, ни способностью формировать негативные колонии выявленные фаги не обладали.

Токияма Киюши и соавт. [195] из 30 изученных на лизогению штаммов *L. salivarius* обнаружили лизис 23 штаммов после индукции митомицином С. Во всех лизатах были обнаружены фагоподобные частицы, однако только 2 были способны образовывать точечные негативные колонии, 6 фагов давали лишь зоны угнетения без репродукции пятнообразующих частиц. Лизаты 15 штаммов не имели ни способности угнетать рост бактерий, ни формировать негативные колонии. О выделении умеренных фагов после индукции молочнокислых бактерий сообщают Козак В. с соавт. [141], Мак Кэй и Болдуин К. [155], Лаури Р. [149], Тараканов Б. [81], Мытник А. и соавт. [57].

Для получения более чётких данных о лизогении у молочнокислых бактерий необходимо тщательное изучение этого явления у разных видов данной группы микроорганизмов с применением современных методов исследования, включая электронную микроскопию. Изучение лизогенного состояния у молочнокислых бактерий, обитающих в вине, расширяет представления о биологии молочнокислых бактерий и роли этого явления в процессах виноделия. Единственное сообщение о лизогении бактерий *Leuconostoc oenos*, используемых при яблочно-молочном брожении, сделано Кавин Ж. и соавт. [102]. Лизогения выявлена при индукции митомицином С.

Нами при изучении на лизогению 48 штаммов гомоферментативных молочнокислых бактерий вида *Lact. plantarum* спонтанная фагопродукция выявлена у 2 штаммов. Фильтрат культуральной жидкости штамма К-12-13 обнаружил активность против 13 культур из 19 испытанных в виде просветления чувствительной культуры или её агглютинации. Пассирование фильтрата на чувствительной культуре приводило к накоплению фага и после 5-6 пассажей наблюдался полный лизис. И только в таком активном фильтрате фаг удавалось обнаружить методом агаровых слоёв.

Эти наблюдения согласуются с данными литературы [93, 78, 9, 58] о способности фагов молочнокислых бактерий, помимо лизиса вызывать явление агглютинации. При высокой концентрации фага агглютинация предшествует лизису

культуры, при низких концентрациях действие фага на культуру ограничивается её агглютинацией.

Спонтанная продукция фага по выявлению негативных колоний на газоне культуры-хозяина обнаружена у штамма К-210-5. Многократное пассирование культуры приводило к увеличению количества спонтанного фага. Максимальная фагопродукция наблюдалась через 17-20 часов с момента посева, то есть в начале логарифмической фазы роста, затем количество фага уменьшалось и через 40-45 часов фаг не обнаруживался.

Индукцированная фагопродукция изучена у 47 штаммов *Lact. plantarum*. Методом перекрёстного испытания культур лизогенное состояние выявлено у 43 культур (табл. 5.1). Нами на лизогению исследовано 85 культур рода *Lactobacillus*, из них

гомоферментативных: *Lact. plantarum* - 48 штаммов;

гетероферментативных: *Lact. brevis* - 25 штаммов, *Lact. buchneri* - 12 штаммов;

гетероферментативных кокков рода *Leuconostoc* - 15 штаммов.

В качестве индикаторных культур для гомоферментативных молочнокислых бактерий использовали 48 штаммов, для гетероферментативных - 50 штаммов, из них:

Lact. brevis - 37 штаммов;

Lact. buchneri - 11 штаммов;

Lact. fermenti - 2 штамма.

Использованные в работе культуры получены из коллекции института "Магарах". Анализ спонтанной фагопродукции осуществляли по принципу Гильдемейстера и Херцберга [124] методом перекрёстного испытания культур на жидкой и плотной питательных средах [72].

Анализ индуцированной фагопродукции проводили по принципу Хейгла и Дельбрюка [12]. В качестве индуцирующего агента использовали УФ-лучи (30 с на расстоянии 40 см, лампа БУФ-30). Культуру в экспоненциальной фазе роста разводили стерильным физраствором в отношении 1:100. Облучали 2 см³ взвеси бактерий в чашке Петри. Лизогенное состояние культур на плотной среде определяли внутриагаровым методом и методом агаровых слоёв по Грациа [12]. Чашки инкубировали при 28°C в течение суток, затем выдерживали при комнатной температуре в течение 5-6 суток. При анализе исследуемых фильтратов на жидкой среде использовали феномен Д'Эрреля: просветление культуральной жидкости под действием фага. Выделение "чистой" линии

Таблица 5.1

**Результаты изучения лизогении
у молочнокислых бактерий *Lact. plantarum***

Штамм- продуцент	Индикаторный штамм	Штамм- продуцент	Индикаторный штамм
К-8-8	К-48-14	К-204-13	К-210-5
К-71-4	К-5-3	К-97-7	К-204-3
К-8-6	К-181-4	К-14-1	К-8-6
О-4-4	39-3	К-6-9	К-8-1
К-12-11	К-71-17	К-9-9	О-21-5
К-46-11	О-4-4	К-5-3	К-41-14
К-54-13	К-181-4	К-2-3	К-97-9
О-21-5	К-204-3	К-7-8	О-18-4
К-97-9	К-210-5	К-3-6	К-46-11
К-12-13	О-21-6	К-2-5	К-248-13
11-1	К-181-4	К-210-5	не обнаружен
11-2	К-181-4	39-1	39-2
17-1	К-210-5	39-3	К-210-5
18-1	К-181-5	К-12-12	39-2
18-2	К-210-5		

фага проводили по методике Рапопорта [12].

Следует отметить, что многие из выявленных лизогенных культур не давали устойчивых результатов по индукции фага. Низкая воспроизводимость обнаружена и при работе с полученными лизатами, что может быть связано со слабой вирулентностью фагов.

Таким образом, изучение лизогении молочнокислых бактерий у *Lact. plantarum* показало, что большинство испытанных культур оказались лизогенными. Это даёт основание полагать, что лизогенное состояние имеет весьма широкое распространение в этой группе микроорганизмов и может служить источником соответствующего фага в природе и в производстве [26].

В результате исследования получены чистые линии 3 фагов, выделенных из гомоферментативных молочнокислых бактерий вида *Lact. plantarum*. Полученные фаги обозначили символом *Lp* с номером в виде дроби, числитель которой соответствует номеру культуры, из которой выделен фаг, а знаменатель - номеру индикаторной культуры, на которой фаг получен. Таким образом, фаги представлены в следую-

щем виде: Lp 20/5; Lp 7/6; Lp 16/28.

Анализ индуцированной фагопродукции 37 штаммов гетероферментативных молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* позволил выявить фаг у 3 штаммов *Lact. brevis*: А-54-7; К-54-4; К-134-3. Фаги давали мелкие нечёткие негативные колонии с мутным дном от 1 до 2 мм в диаметре.

Многочисленные попытки выявления лизогенного состояния по образованию негативных колоний в этой группе МКБ не дали положительных результатов. На жидкой среде обнаруживались явные признаки угнетения культуры исследуемым фильтратом. Действие угнетающего фактора заметно снижалось от разведения к разведению. Аналогичные результаты были получены при изучении индуцированной фагопродукции 17 штаммов рода *Leuconostoc*. Только 4 лизата дали негативные колонии при использовании метода агаровых слоёв. Колонии были однотипны по морфологии: мелкие до точечных, мутные. Характерной особенностью изучаемых фагов был длительный период формирования негативных колоний, которые обнаруживались только через 10-13 суток.

На жидкой среде практически все исследуемые лизаты вызывали чёткую реакцию просветления культуральной жидкости. После продолжительных и тщетных попыток выделить и стабилизировать фаги из гетероферментативных молочнокислых бактерий было высказано предположение о возможной дефектной лизогении этих культур. Дефектно-лизогенные культуры обычно трудно-индуцируемы и освобождают небольшое количество неполноценных, слабо вирулентных частиц, отличающихся способностью вызывать лизис, но неспособных к размножению, а следовательно и к накоплению. Широкое распространение дефектно-лизогенных культур в различных группах микроорганизмов, а также то обстоятельство, что большинство из описанных в последнее время умеренных фагов лактобацилл оказались дефектными, приводит к выводу, что метод выявления наличия фага по способности формировать негативные колонии оказывается недостаточным. Для получения более чётких сведений о природе ингибирующего фактора необходима электронная микроскопия исследуемых лизатов.

Таким образом, изучение лизогении у гетероферментативных молочнокислых бактерий (палочек и кокков) даёт основание предполагать широкое распространение лизогенного состояния в этой группе микроорганизмов. Основная масса исследованных культур, очевидно, является носителем дефектного фага.

5.3. Основные биологические свойства фагов *Lact. plantarum*.

Изучение биологических свойств фагов молочнокислых бактерий было связано, прежде всего, с необходимостью разработки мер борьбы с фагом на предприятиях молочной промышленности.

В этом плане исследователей интересовали активность выделенных фагов, спектр антибактериального действия, термостабильность и выяснение оптимальных условий для выживания фагов и течения бактериофагического процесса. Со временем изучение биологии фагов расширялось и дополнялось сведениями о морфологии фагов, антигенных свойствах, основных фазах внутриклеточного развития.

Биология фагов молочнокислых бактерий изучена относительно слабо, причём подавляющая часть информации относится к описанию фагов молочнокислых стрептококков. Сведения о фагах к палочковидным молочнокислым бактериям скудны и эпизодичны. Отсутствует и биологическая характеристика фагов, обнаруженных в вине. Полученные нами данные, представленные ниже, несколько восполняют этот пробел [15,17].

5.3.1. Активность и спектр антибактериального действия

Уайтхэду Х. и Коксу Г. [197] принадлежит не только приоритет в открытии явления фагии у молочнокислых бактерий, но и первые сведения о свойствах фагов молочнокислых бактерий. Выделенные ими фаги отличались низкой активностью и были высокоспецифичны, лизируя только культуры, на которых они были выделены.

Высокую специфичность отмечают Яковлев Д.А. [93] при изучении фага *Str. cremoris*, Сербинова Н.И. и Сокольская Е.В. [80] при характеристике фага к *Lact. plantarum* инфицирующих спиртовое производство, Сандайн В. и соавт. [184] фагов к *Str. diacetylactis*, Клерк Х. и соавт. [138], Хеннинг Д. и соавт. [133], Сато Ясуси и Син Чхильнан [185], выделившие фаги из почвы, активные в отношении *Str. faecalis*. Практически видоспецифичным оказался вирулентный фаг, вызывающий лизис *Lact. casei* [153].

О поливалентных фагах сообщают Рунов Е.В. и соавт. [78], Медвинская Л.Ю. [54], Медвинская Л.Ю., Новикова С.И. [52], Гибшман М.Р. и Белоусова Н.Н. [9], Никольс К. и соавт. [160].

Непомнящая М.Л. и соавт. [59] на основании многолетних наблюдений пришли к выводу, что спектр действия фагов подвержен большой изменчивости, однако не выходит за пределы вида.

Об истинно поливалентных фагах, специфичность которых выходит за пределы вида, сообщают Козак В. и соавт. [141].

При описании фагов, выделенных из вина, указывается узкий спектр литического действия по отношению к бактериям рода *Leuconostoc* [127, 126, 190, 158].

Диапазон антибактериального действия является характерной особенностью штаммов фага и его обычно используют при их классификации, несмотря на то, что этот признак не является неизменным и может изменяться в результате мутации или фенотипической модификации фага [2].

Изучение нами спектра литического действия фагов *Lact. plantarum* (табл. 5.2) показало, что все три фага оказались видоспецифическими, не действовали на штаммы других видов и различались между собой. Выявлены наиболее чувствительные культуры, реагирующие на все три фага [2, 5, 6, 7, 18, 27, 28, 29].

При взаимодействии фагов с большей частью чувствительных культур выраженный лизис наблюдался уже через 12 часов инкубирования. Лишь в исключительных случаях (Lp 20/5-6; Lp 20/5-18; Lp 7/4-4) лизис не сопровождался вторичным ростом, обычно на дорожке наблюдался вторичный рост, быстро усиливающийся. Часто через 24-48 часов на газоне вторичного роста возникали негативные колонии, мутные или прозрачные. При взаимодействии фага Lp 20/5 с культурами 7 и 8 выраженного лизиса в виде дорожки не наблюдалось, через 24 часа на месте дорожки возникали отдельные прозрачные негативные колонии.

Таблица 5.2
Спектр действия фагов *Lact. plantarum*

Фаги	Виды лактобактерий			
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. fermenti</i>	<i>L. buchneri</i>
Lp 7/6	16/44	0/22	0/1	0/10
Lp 20/5	13/44	0/33	0/1	0/10
Lp 16/28	12/44	0/22	0/1	0/10

5.3.2. Морфология фагов

Фаги характеризуются большим разнообразием размеров и форм, поэтому при изучении фагов эти признаки имеют более важное значение, чем при классификации бактерий.

Анализ литературы по морфологии фагов молочнокислых стрептококков [163, 105, 58, 199, 111, 184] показывает, что они достаточно однородны. Чаще всего это сперматозоидоподобные частицы со сферической головкой диаметром 60-70 нм и отростком длиной 150-160 нм и шириной 20-30 нм.

Резко отличался по форме и размерам фаг *Str. cremoris*, описанный Вильямсоном К. и Берто В. [199]. Его сферическая головка диаметром 70-80 нм соединялась с длинным бичеподобным отростком толщиной 15 нм и длиной 560-610 нм.

Медвинской Л.Ю. [51] показаны различия двух типов фагов *Str. lactis*, отличающихся по всем своим свойствам. Диаметр головки фагов I типа был 60 нм и длина отростка 200 нм, фаг II типа имел размеры 110 нм и 220 нм соответственно.

Мытник Л.Г. и соавт. [57] при изучении умеренных и вирулентных фагов молочнокислых стрептококков отмечает идентичность их морфологии. Фаги имели головку в виде удлиненного многогранника размером 46x38 нм, отросток 8x80, заканчивающийся базальной пластиной. Коллинз Е. [107] указывает, что по форме и размерам фаги молочнокислых стрептококков сходны с хорошо известными фагами *E. coli*.

Значительно большим разнообразием отличались фаги к молочнокислым палочкам, особенно умеренные фаги (табл. 5.3).

Таким образом, по имеющимся литературным сведениям, фаги молочнокислых бактерий по своей морфологии весьма разнообразны. Фаги к молочнокислым стрептококкам отличались меньшим разнообразием, чем фаги, специфичные для *Lactobacillus*.

Что касается фагов, выделенных из вин, то Соцци Т. и соавт. [191] в своём первом сообщении указывают на 3 морфологических типа фага: 1) фаг с длинным несокращающимся отростком; мелкие фаги с несокращающимся отростком средней длины; 2) мелкие фаги, окружённые мукополисахаридным слоем с неразличимыми капсомерами; 3) мелкий фаг с удлиненной головкой и несокращающимся отростком.

Электронномикроскопические снимки изученных нами фагов выполнялись в противочумном институте "Чумин" (г.

Таблица 5.3

Морфология фагов молочнокислых бактерий

Автор сообщения	Наименование фага	Форма и размеры головки, нм	Размеры отростка	Другие признаки
Клерк и соавт., 1963 [138]	<i>L. casei</i> <i>L. fermenti</i>	87 x 105 64 x 83	21x194 18x210	
Клерк и соавт., 1965, 1970 [139, 140]	<i>L. fermenti</i>	икосаэдрическая 69 x 72	138x148	базальная пластинка, сокращающийся чехол отростка
	<i>L. casei</i>	октаэдрическая или икосаэдрическая 82	127	воротничок, сокращающийся чехол
Сато Ясуси, Син Чхильнан, 1970 [185]	<i>Sf.</i>	73 x 74	297	
Матанабе и соавт., 1970	<i>L. casei</i>	икосаэдрическая 63	12,5x275	на конце отростка около 55 нитей
Токияма Киюши и соавт., 1972 [135]	<i>L. salivarius</i> умеренный	гексагональная, 53-60	короткая отросткоподобная структура или её отсутствие	
	умеренный	52-60	5-10 x 152-234	
	умеренный	51x108-53x110	68 x 173-199	
Мак Кей и Болдуин, 1973 [155]	<i>Str. lactis</i> умеренный	гексагональная 40	6 x 180	воротничково-подобная структура
Кюг и Шиммин, 1969 [137]	<i>Str. cremoris</i> дефектный	гексагональная 50	отсутствует	
Клерк и Гюго, 1970	<i>L. acidophilus</i>	сферическая	длинный	сокращающийся чехол, ба-

Ростов на Дону) С.А. Токаревым и В.К. Кардеевым, за что мы приносим им глубокую благодарность.

Результаты исследования тонкой структуры фаговых частиц (фото 1,2,3) показывают, что изученные нами фаги имеют головку многогранной формы и длинный отросток без футляра, что позволяет отнести их к IV морфологической группе по классификации Тихоненко А.С. [83]. Октаэдрические головки имеют на плоскости более или менее правильную гексагональную форму. Отростки гибкие, длина их в 5-6 раз превышает диаметр головки (табл. 5.4).

У фагов *Lp 20/5* и *Lp 16/28* удаётся различить широкую базальную пластинку, снабженную зубцами неправильной формы. У фага *Lp 7/6* имеется лишь некоторое расширение дистальной части отростка, конец его конусообразно заострён. В месте соединения отростка фага с головкой у всех фагов наблюдается клановообразное уплотнение. Отростки фагов имеют чёткую поперечную исчерченность. При сравнении изученных нами фагов с описанными в литературе фагами молочнокислых

Фото 1.

Морфология фага *Lp 20/5*.

Увеличено в 36 400 раз.



Таблица 5.4

Размеры фаговых частиц *Lact. plantarum*

Фаги	Размеры головки, нм	Длина отростка, нм	Ширина отростка, нм	Общая длина, нм
<i>Lp 20/5</i>	57,51±0,36x 58,38±0,22	302,56±1,50	10,98±0,60	360,07±0,88
<i>Lp 7/6</i>	55,67±0,37x 56,70±0,75	297,43±2,25	10,40±0,44	353,10±2,62
<i>Lp 16/28</i>	58,75±0,15x 58,17±0,15	306,95±0,75	10,915±0,22	365,70±0,90



Фото 2.
Морфология фага Lp 16/28
Увеличено в 36400 раз.

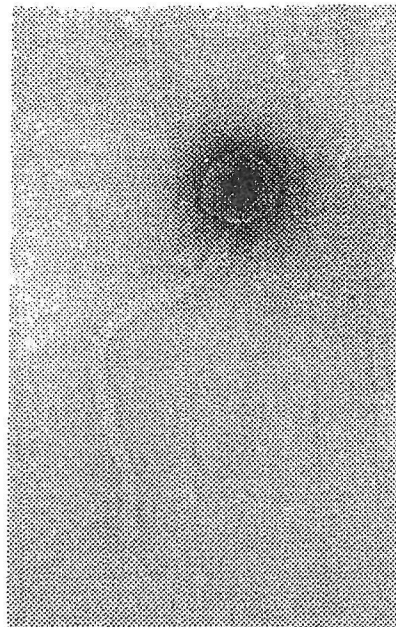


Фото 3.
Морфология фага Lp 7/6
Увеличено в 36400 раз.

бактерий отмечается относительно большая длина отростка по сравнению с диаметром головки и общая длина частиц, по которой они уступают только фагу *Str. cremoris*, описанному Вильямсоном К. и соавт. [199] и имеющему длину частиц около 700 нм.

5.3.3. Морфология негативных колоний

Размер и морфология стерильных пятен при стандартных условиях вполне определены для каждой системы фаг-бактерия и используются при характеристике фагов.

Изученные нами фаги различались по внешнему виду негативных колоний. При благоприятных условиях наиболее крупные колонии формирует фаг Lp 20/5 (табл. 5.5). Наиболее мелкие колонии имеет фаг Lp 16/28. Эти два фага имели типичную для умеренных фагов морфологию колоний с нечётко очерченными краями и мутным дном за счёт вторичного роста.

Фаг Lp 7/6 имел колонии с чётко очерченным краем и

прозрачным дном, что характерно для С- и V-мутантов умеренных фагов. Нередко наблюдалась обратная мутация к дикому типу, когда фаг Lp 7/6 формировал типичные для умеренных фагов мутные негативные колонии. По немногочисленным литературным данным, морфология негативных колоний фагов молочнокислых бактерий не отличается разнообразием. Обычно они круглые, небольших размеров. Только Медвинской А.Ю. [53] описаны негативные колонии звёздчатой формы для фагов молочнокислых стрептококков.

Морфология негативных колоний изученных нами фагов *Lact. plantarum* не отличалась какими-либо особенностями.

5.3.4. Адсорбция и основные фазы внутриклеточного развития фагов *Lact.* *plantarum*

При биологической характеристике фагов существенное внимание уделяется свойствам фага, непосредственно отражающим процесс его взаимодействия с чувствительной клеткой. Такими свойствами являются скорость адсорбции фага на клетке, величина латентного периода, то есть времени с момента внедрения фага в клетку до его выхода при лизисе клетки, и урожайность фага, под которой понимают количество фаговых частиц, образуемых при лизисе одной клетки. Эти свойства подвержены значительным изменениям и зависят от условий культивирования, среды, влияния различных факторов. При этом каждая система фаг-бактерия требует специфических условий.

Многими исследователями показано, что для адсорбции фагов молочнокислых стрептококков необходимы кофакторы. Так, Черри В. и Уотсон Д. [105] указывают на триптофан, соли кальция. Для стимуляции фаголизиса использовали ионы кальция [9,59], сульфид натрия, триптофан или оксихинолин [50], дрожжевой экстракт, пептон, кукурузный экстракт [159], лактозу [59].

При стандартных условиях величины, отражающие про-

Таблица 5.5
**Размеры негативных
колоний фагов**

Фаги	Диаметр негативных, мм
Lp 20/5	1,43±0,06
Lp 7/6	1,08±0,10
Lp 16/28	0,68±0,07

цесс взаимодействия фага с клеткой, вполне определенны и служат для характеристики фагов и отличия их друг от друга. Латентный период и выход фага определяют скорость развития фага в культуре и эффективность инфекционного процесса.

Сведения, касающиеся основных фаз внутриклеточно-го развития фагов молочнокислых бактерий, весьма скудны [105, 200, 184, 59, 107, 138, 153]. Анализ литературы свидетельствует о большом разнообразии этих свойств. Это связано, очевидно, как с системой вирус-хозяин, так и с техникой и условиями определения. Величина латентного периода для фагов молочнокислых стрептококков колебалась от 20 мин. до 90 мин. Очень большой латентный период определен для фагов *Lact. casei* - 100-220 мин. [138]. Сильно варьирует и урожайность фагов от 6 до 200 частиц на клетку.

Время адсорбции фага на бактериях изучали по Адамсу [2]. Результаты выражали в виде константы скорости адсорбции (K), вычисляемой по формуле:

$$K = \frac{2.3 \cdot \lg \frac{P_0}{P}}{B \cdot t},$$

где P_0 - исходное количество фага;

P - количество неадсорбированного фага;

t - время адсорбции;

B - концентрация бактерий, выраженная числом клеток в 1 см³.

Исследование одиночного цикла развития фага проводили по методу Эллиса и Дельбрюка [2]. Анализ динамики термоинактивации осуществлялся по методике Фридман и Коулз [117] на физрастворе. Результаты выражали в виде времени инактивации и константы скорости инактивации [14]

$$K = \frac{2.3}{t} \cdot \lg \frac{P_0}{P},$$

где t - время воздействия;

P_0 - исходная концентрация фага;

P - концентрация фага при времени t .

Установлено, что изученные нами фаги *Lact. plantarum* мало различались по скорости адсорбции (табл. 5.6).

Время максимальной адсорбции для всех фагов было в пределах 40 мин. при температуре 28°C. Самая низкая скорость адсорбции наблюдалась у фага Lp 20/5. Промежуточное положение по показателям адсорбции занимал фаг Lp7/6.

Таблица 5.6

Характеристика адсорбции фагов *L. plantarum*

Фаги	Максимальная адсорбция, %	Константа скорости адсорбции, мин ⁻¹
Lp 16/28	77	1,61·10 ⁻⁹
Lp 7/6	83	2,45·10 ⁻⁹
Lp 20/5	87	3,17·10 ⁻⁹

Значительно большие различия обнаружили фаги в продолжительности латентного периода и величинах урожайности. По этим свойствам выделяется фаг Lp 20/5: у него самый короткий латентный период (260 мин.) и максимальная по сравнению с двумя другими фагами урожайность (90 частиц на клетку). Наименьшей продуктивностью обладал фаг Lp 7/6, длительность его латентного периода равнялась 360 мин, выход составлял 10 частиц на клетку [23].

Сопоставляя полученные данные с известными сведениями о фазах развития фагов молочнокислых бактерий, нужно отметить очень большую продолжительность латентного периода изученных фагов, по которой среди описанных в литературе им нет равных. Так если для фагов молочнокислых стрептококков она колебалась от 20 мин. [59] до 90 мин. [200], для фагов *L. casei* 100-220 мин. [138], то для наших фагов величина латентного периода составляла 260-360 мин. Очевидно, это связано с особенностями молочнокислых бактерий вина, являющихся их хозяевами. Что касается урожайности, то она могла быть заниженной за счёт лизогенизации части инфицированных клеток.

5.3.5. Антигенные свойства фагов *L. plantarum*

Подобно другим микроорганизмам, фаги обладают антигенными свойствами, обусловленными, главным образом, белковыми компонентами фаговой частицы. Антигенные свойства являются важным тестом, характеризующим биологию фагов и степень их генетического родства.

Сведения об антигенных свойствах фагов молочнокислых бактерий весьма немногочисленны. Медвинская Л.Ю. [51], используя серологический метод для определения чистоты двух типов фага, показала, что фаги, различающиеся по основным свойствам, были различны и серологически. Вильковский Х. и соавт. [198] при попытке дать серологическую классификацию фагов молочнокислых стрепто-

кокков выделили 7 серологических групп. Изучение антигенных свойств фагов, выделенных из различных источников, даёт возможность установить родство между ними и судить об их происхождении [160, 181, 182, 153, 87, 57]. У дефектных фагов серологические характеристики особенно необходимы для выяснения происхождения [185].

В наших исследованиях при изучении антигенных свойств фагов иммунные антифаговые сыворотки получали по схеме Шегловой [91], предложившей двукратное внутрибрюшинное введение депонированного антигена в объёме 30 см³. Депо антигена создавали путём адсорбции фага на смеси AlCl₃, Na₂PO₄. Для иммунизации использовали кроликов массой 2,5-3,0 кг. Интервал между первичной иммунизацией и реиммунизацией составлял 2 мес., что соответствует наибольшей иммунологической перестройке организма [36]. Антифаговые сыворотки использовались для изучения антигенных свойств фагов в реакции нейтрализации, которую ставили по методике Адамса [2]. Результаты выражали в виде константы скорости нейтрализации

$$K = \frac{2.3 \cdot D}{t} \cdot \lg \frac{P_0}{P} \cdot \text{мин}^{-1},$$

где D - разведение сыворотки;

t - время в минутах;

P₀ - количество фага в исходный момент времени;

P - количество фага в момент времени [2].

Антигенные свойства трёх фагов *Lact. plantarum* изученные нами в реакции нейтрализации с гомо- и гетерологичными сыворотками, дали возможность установить степень их генетического родства. Полученные антифаговые сыворотки обладали высокой фагонейтрализующей способностью, вызывая 100%-ную нейтрализацию гомологических фагов в разведении 1:100 в течение 15 мин.

Результаты перекрёстной нейтрализации фагов антифаговыми сыворотками представлены в табл. 5.7.

Константа скорости нейтрализации фагов гомологичными сыворотками колебалась от 90,4 + 5,8 мин.⁻¹ для фага Lp 7/6 до 155,97 + 2,44 мин.⁻¹ и 163,06 + 3,22 мин.⁻¹ для фагов Lp 16/28 и Lp 20/5 соответственно. Нейтрализация гетерологичными сыворотками заметно различалась у трёх штаммов фага. При этом наиболее ярко выделяется фаг Lp 7/6, у которого константа скорости нейтрализации гетерологичными сыворотками колебалась от 24,23 + 2,9 до 2,68 + 1,08 мин.⁻¹. Близкими по антигенному составу оказались фаги Lp

Таблица 5.7

Антигенные свойства фагов *Lact. plantarum*

Фаги	АФС Lp 20/5	АФС Lp 7/6	АФС Lp 16/28
	Константы скорости нейтрализации фагов, мин ⁻¹		
Lp 20/5	163,03±3,22	14,41±2,97	152,36±8,5
Lp 7/6	2,68±1,08	90,43±5,83	24,23±2,9
Lp 16/28	142,91±8,48	27,1±6,92	155,97±2,44

20/5 и Lp 16/28, константы скорости нейтрализации каждого из них гетеросыворотками отличались мало.

Таким образом, установлено наличие двух серологических типов фагов *Lact. plantarum*. К первому серотипу относятся фаги Lp 20/5 и Lp 16/28, ко второму серотипу - фаг Lp 7/6. Сакурай Тошизо и соавт. (182) при изучении антигенных свойств фагов *L. casei* и *L. plantarum* показали, что все 4 исследованных штамма *L. plantarum* составляли отдельный серологический тип.

5.3.6. Изучение оптимальной множественности инфекции фагов *L. plantarum*

Для осуществления фаголитического процесса чрезвычайно большое значение имеет оптимальная множественность инфекции, то есть соотношение фаговых частиц и бактериальных клеток. Для определения оптимальных условий фаголизиса молочнокислых бактерий вина нас интересовал некоторый диапазон значений pH, прежде всего величин pH, характерных для вина. Данных о возможной зависимости оптимальной множественности инфекции от pH среды в доступной нам литературе не обнаружено. Между тем вопрос этот имеет не только теоретический, но и практический интерес при подборе условий для получения эффективного лизиса в определенной системе фаг-бактерия.

Результаты определения оптимальной множественности инфекции для фагов *L. plantarum* (табл. 5.8) указывают на выраженную зависимость этого показателя от величины pH среды. Высокие и относительно постоянные величины оптимальной множественности инфекции наблюдались при низких значениях pH (3,0-3,2). С увеличением pH от 3,2 до 4,6 для фага Lp 20/5 и от 3,2 до 4,0 для фага Lp 7/6 оптимальная множественность падает до минимальных значений.

Дальнейшее понижение кислотности среды приводит к новому подъёму показателей оптимальной множественности, достигающем максимума при рН 5,6-6,0 и остающегося на одном уровне при дальнейшем повышении величины рН.

Таким образом, максимальная активность изученных фагов находится в диапазоне рН от 4,0 до 5,6, превышающем значения рН, характерные для вина [28].

5.3.7. Влияние инактивирующих агентов

При биологической характеристике вновь изучаемой группы фагов непременным условием является определение чувствительности к ряду физических и химических факторов (повышенная температура, УФ-облучение, концентрированный раствор мочевины, цитрат натрия и др.). Изучение этих свойств необходимо как в целях таксономии фагов, так и в целях разделения их с соответствующими бактериями, что может оказаться необходимым как в лабораторной практике, так и в производстве.

Термостабильность фагов. Сведения о термоустойчивости фагов молочнокислых бактерий чрезвычайно противоречивы. Некоторые авторы отмечают высокую чувствительность фагов к нагреванию [105, 111, 153]: заметная и полная инаktivация наступала при 55-65°C. Однако есть сведения о высокой термоустойчивости фагов [9, 59, 132, 185], выдерживающих нагревание при 95-100°C в течение 5-10 мин. Такое разнообразие сведений связано, очевидно, с разнообразием методик и сред, применяемых при исследовании термоустойчивости, хотя большую роль играет и природа фага.

Процесс термоинаktivации затрагивает, в основном, белковый компонент фаговой частицы и является результатом денатурации белка. Инаktivация фагов сопровождается

Таблица 5.8

Оптимальная множественность инфекции фагов *Lact. plantarum* при различных рН

рН	Lp 20/5	Lp 7/6
2,98	$2,7 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$
3,2	$2,7 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$
3,7	$2,7 \times 10^3$	$7,5 \times 10^1$
4,0	$2,7 \times 10^2$	$7,5 \times 10^{-5}$
4,6	$2,7 \times 10^1$	$7,5 \times 10^{-4}$
5,2	$2,7 \times 10^2$	$7,5 \times 10^{-2}$
5,6	$2,7 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$
6,0	$2,7 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$
6,5	$2,7 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$

выделением в раствор нуклеиновой кислоты [2].

Электронномикроскопический контроль тепловой инаktivации фагов доказывает, что она связана с дезинтеграцией фаговых частиц, утратой их нормальной морфологии [73a].

При изучении влияния температурного фактора на фаги *Lact. plantarum* нами использовались следующие температурные режимы: 45-46°C; 56-58; 65-70°C; 80°C. Константа скорости инаktivации при 46°C составила для фагов Lp 20/5, Lp 7/6 и Lp 16/28 величины 0,133; 0,093; 0,162 мин.⁻¹ соответственно, что указывает на низкую термостабильность этих фагов.

При 56-58°C фаги Lp 20/5 и Lp 16/28 инаktivировались полностью за 10-15 мин. (табл.5.9). Более стабильным при этой температуре оказался фаг Lp 7/6, который ещё через 40-60 мин. сохранял небольшое количество активных частиц. Константа скорости инаktivации его составила 0,385-0,655 мин.⁻¹, для фага Lp 20/5 она была равна 1,77 мин.⁻¹.

При температуре 65-70°C инаktivация всех трёх фагов наступала в течение 3-5 мин., при 80°C уже через 1 мин. фаговые корпускулы не обнаруживались.

Таким образом, изученные нами фаги весьма чувствительны к действию температур. Наиболее термостабильным оказался фаг Lp 7/6. Высокая чувствительность к нагреванию связана, очевидно, с происхождением фагов. Фаги, выделенные из природных источников и в условиях производства, оказываются значительно более устойчивыми [34, 93, 63 и др.].

Влияние цитрата натрия. Изучению отношения фагов к присутствию в среде цитрата натрия отводится существенное место в связи с тем, что данное вещество обладает фагостатическим действием, нарушая определённый этап вза-

Таблица 5.9

Термостабильность фагов лактобактерий

Режимы, °C	Время инаktivации фагов, мин.		
	Lp 20/5	Lp 7/6	Lp 16/28
45-46	более 120	более 120	более 120
56-58	15	более 60	10
65-70	3-5	5	5
80	1	1	1

имодействия фага с бактериальной клеткой, не вызывая ина-

тивации свободного фага. Это влияние связывают со способностью цитрата инактивировать ионы кальция, необходимые для взаимодействия фага с клеткой [186]. Единственное сообщение о чувствительности фага МКБ к цитрату натрия имеется у Черри и Уотсона [105]. Бертран в 1933 г. первый высказал предположение, что чувствительность к цитрату может быть ценным таксономическим признаком [2].

Результаты изучения отношения фагов *L. plantarum* к присутствию в среде цитрата натрия представлены в таблице 5.10.

Все три фага мало отличались друг от друга по чувствительности к присутствию в среде данного агента и при содержании 2,5% цитрата натрия полностью утрачивали способность к формированию негативных колоний.

Высокая чувствительность к цитрату вполне согласуется с выраженной потребностью фагов *L. plantarum* в ионах кальция.

Влияние мочевины. Инактивирующее действие мочевины связывают с повреждением дистального конца отростка, приводящим к потере вирионом адсорбционной способности [13].

При изучения действия мочевины на фаги *L. plantarum* показана различная чувствительность их к данному агенту. Так, полная инаktivация фага Lp 16/28 наступала в течение 3 минут (табл. 5.11), фагов Lp 20/5 и Lp 7/6 - в течение 10 мин. После 5-минутной экспозиции с мочевиной фаг Lp 20/5 снижал титр до $3,0 \times 10^1$, у фага Lp 7/6 сохранялась $3,4 \times 10^3$ корпускул при одинаковом исходном титре порядка 10^9 . Константы скорости инаktivации для фагов Lp 20/5, Lp 7/6 и Lp 16/28 составляли соответственно величины 13, 71; 12,65; 17,04 мин⁻¹.

Полученные нами данные о влиянии концентрированных растворов мочевины являются первыми не только в от-

Таблица 5.11

Влияние мочевины на фаги *L. plantarum*

Фаги	Титр остаточного фага при экспозиции, мин				
	0	1	3	5	10
Lp 20/5	$2,85 \times 10^9$	$3,1 \times 10^3$	$7,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$	0
Lp 7/6	$2,4 \times 10^9$	$7,6 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	0
Lp 16/28	$2,3 \times 10^9$	$9,0 \times 10^1$	0		

ношении фагов *L. plantarum*, но и группы фагов молочнокислых бактерий в целом.

Ультрафиолетовая инаktivация. Изученные нами фаги *L. plantarum* практически не различались по своей чувствительности к УФ-лучам. После 1 мин. облучения небольшое количество фага ещё удавалось обнаружить. Двух-трёх минутное облучение приводило к полной инаktivации фаговых частиц.

Отмечена высокая чувствительность фагов молочнокислых стрептококков к УФ-облучению [9,153].

Выявлено влияние облучения на морфологию негативных колоний. Бляшки, образованные облученным фагом, сильно варьировали в размерах с преобладанием мелких колоний (фаг Lp 20/5) или были чрезвычайно мутными за счёт интенсивного вторичного роста (фаги Lp 16/28 и Lp 7/6). Резкое уменьшение размеров колоний можно объяснить задержкой размножения за счёт значительного увеличения латентного периода. Появление вторичного роста, очевидно связано со снижением способности облученных фагов к продуктивной инфекции.

Влияние осмотического шока. Инаktivация фагов при быстром падении осмотического давления среды, связанная с различной проницаемостью белковых оболочек фагов, широко используется при биологической характеристике фагов. Проверка чувствительности исследуемых фагов *Lact. plantarum* к осмотическому шоку путём действия трёхмолярным раствором хлористого натрия показала их устойчивость к резкому изменению осмотического давления.

Изучение фотореактивации. При изучении способности фагов восстанавливать утраченную после УФ-облучения активность с помощью видимого света фотореактивация не была выявлена ни у одного из трёх фагов.

Таким образом, изучение биологии 3 умеренных фагов

Таблица 5.10

Влияние цитрата натрия на фаги лактобактерий

Фаги	Бляшкообразующие единицы, % к контролю при концентрации натрия				
	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	2,5%
Lp 20/5	82,6±3,9	62,3±3,4	52,9±0,8	6,6±0,7	0
Lp 7/6	76,0±1,2	57,9±1,8	2,4±0,3	0,9±0,4	0
Lp 16/28	52,6±2,8	28,8±2,4	15,3±0,8	1,2±0,1	0

Lact. plantarum позволило выявить различия между ними по ряду свойств. Особенно чётко дифференцируется фаг Lp 7/6. Он отличается по деталям тонкого строения, по антигенным свойствам. Выявленные различия дают основания считать изученные нами фаги различными штаммами одного вида бактериальных вирусов.

5.4. Влияние основных химических компонентов вина на стабильность и литическую активность фагов

При изучении биологии фагов *Lact. plantarum*, выделенных из молочнокислых бактерий, помимо общепринятых тестов, особый интерес представлял вопрос о сохранении фагов в условиях производства вина, характеризующихся высокой кислотностью, наличием этилового спирта и диоксида серы, а также взаимоотношениями фагов с чувствительными культурами в этих условиях.

Изучение устойчивости фагов к различным значениям pH проводили на фосфатно-цитратном буфере и оценивали по изменению титра. Изучение влияния этанола и диоксида серы на стабильность фагов проводили в водных растворах этанола с объёмной концентрацией 10-25% и диоксида серы 20-60 мг/дм³. Результаты оценивали по изменению титра фагов. Влияние этих факторов на фаголизис молочнокислых бактерий изучали на солодовом сусле с массовой концентрацией сухих веществ 3%.

Изученные фаги оказались неустойчивыми при низких значениях pH. Уже через 2-4 часа фаги Lp 20/5 и Lp 16/28 полностью инактивируются при pH 2,8-3,2, а фаг Lp 16/28 и при pH 3,4. При pH 3,6 только фаг Lp 20/5 выявлялся через сутки. Более стойким к низким значениям pH оказался фаг Lp 7/6, который при pH 2,8-3,2 обнаруживался ещё и через 8 часов пребывания в буферном растворе. Только при pH 6,0-8,0 титр фагов изменялся незначительно. Все фаги в наименьшей степени инактивировались в слабощелочной среде, которая, таким образом, является оптимальной для хранения фагов.

По отношению к этанолу изученные фаги оказались довольно устойчивыми: фаги Lp 20/5 и Lp 7/6 выявлялись даже через 14 суток выдержки в присутствии 25% этанола. Более чувствительным был фаг Lp 16/28, в значительной

степени инактивируясь при 20 % этанола уже через сутки.

Установлено выраженное инактивирующее действие диоксида серы в дозах 40 и 60 мг/дм³ в пересчёте на свободный. В присутствии 20 мг/дм³ диоксида серы небольшое количество жизнеспособных фаговых частиц обнаруживалось ещё через 7 суток и даже 14 суток (фаг Lp 16/28).

Таким образом, из химических факторов вина наибольшим инактивирующим действием на фаги *Lact. plantarum* обладает высокая кислотность.

Тем не менее, изучение специфических факторов вина на размножение фагов показало, что компоненты питательной среды оказывают, очевидно, защитное действие на фаг, обеспечивая процесс его взаимодействия с клеткой. Активный фаголизис молочнокислых бактерий в условиях высокой кислотности в присутствии этанола и диоксида серы возможен, особенно при создании оптимальной множественности инфекции. Однако, эффективность такого лизиса значительно снижается за счёт задержки наступления момента лизиса, быстрого появления вторичного роста. Кроме того, при низких значениях pH оптимальная множественность инфекции очень высока, что требует большого количества активного фага [28].

5.5. Изменчивость фага под влиянием хозяина

При размножении фага на разных культурах меняется его спектр литического действия, морфология негативных колоний; вирулентность. С целью получения вариантов фага с изменённым спектром литического действия исследованы 16 вариантов фага Lp 20/5, полученных на разных культурах.

Выявлено большое разнообразие изученных вариантов фага по морфологии негативных колоний, однако, спектры действия полученных вариантов различались незначительно. Лишь один из вариантов лизировал на 5 культур больше. Кроме того, при взаимодействии всех вариантов фага с большей частью культур быстро возникал интенсивный вторичный рост, прозрачные бляшки формировались лишь на единичных культурах. Исследование вторичного роста показало, что он возникает как за счёт первично устойчивых клонов, так и за счёт лизогенизации бактерий.

Таким образом, получение таким путём вариантов фага с широким спектром действия и высокой вирулентностью малонадёжно.

5.6. Изменчивость молочнокислых бактерий под влиянием специфических фагов

Известно, что воздействие фага на бактериальную клетку и особенно установление лизогенного состояния может сопровождаться изменением как морфологии микроорганизмов [11], так и ряда биологических свойств, таких как ферментативная активность [60], структура антигенного аппарата [64]. Фаговая конверсия известна для целого ряда систем фаг-бактерия.

Для изучения изменчивости молочнокислых бактерий под влиянием фага использовали обработку тест-культур четырёх фагочувствительных штаммов (5,18,27,28) тремя специфическими фагами, выделенными из лизогенных культур. Для дальнейшей работы было отобрано по 2 субкультуры для каждого фага, стойко сохраняющие фагоустойчивость и по 2 чувствительных варианта.

Изучение биохимической активности проводили по следующим показателям: 1) потребление субстрата (углеводов и органических кислот); 2) определение титруемых кислот методом прямого титрования; 3) определение летучих кислот; 4) определение диацетила и ацетона по методу Вестерфельд [32]; 5) измерение величины pH; 6) определение сахара. Проведенные нами исследования с целью выявления возможности изменений под влиянием специфических фагов некоторых метаболических процессов у молочнокислых бактерий *Lact. plantarum* дали весьма пёстрые результаты. Наиболее постоянным отличием полученных фагорезистентных субкультур от исходных чувствительных оказалось изменение активности ферментных систем, принимающих участие в превращениях гексоз, что сопровождалось различным изменением титруемых кислот, накоплением диацетила и ацетона [25].

Каких-либо закономерностей, указывающих на определяющее влияние штамма фага на характер биохимических изменений бактерий, подметить не удалось. Наиболее однотипным оказалось влияние фага Lp 20/5: обе резистентные к нему культуры снизили свою биохимическую активность по сравнению с исходным чувствительным штаммом.

Выявлены значительные морфологические изменения культуры под влиянием фага. Фагоустойчивые варианты были представлены резко укороченными палочками, собранными в длинные перевитые цепочки, содержали хлопьевидные скопления из кокковых форм. Контрольные чувствительные куль-

туры выглядели однородно и состояли из длинных тонких палочек. Особенно резкие морфологические изменения отмечены при воздействии фага Lp 20/5. Очевидно, присутствие профага приводит к нарушению процесса деления клетки, ускоряя его.

Таким образом, при воздействии специфических фагов на молочнокислые бактерии *Lact. plantarum* получены фагорезистентные варианты, по всей видимости, лизогенные, обладающие изменёнными морфологическими и биохимическими свойствами. Полученные изменения, очевидно, можно считать проявлением фаговой конверсии.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молочнокислые бактерии играют заметную роль в процессах виноделия. Условия обитания микроорганизмов определяют характер приспособлений к ним. Рекомендации производству по регулированию жизнедеятельности микроорганизмов должны носить конкретный характер и основываться на изучении свойств микроорганизмов определённого региона. Вот почему интерес к молочнокислым бактериям, обитающим в вине, не теряет своей остроты, несмотря на то, что активные исследования этой группы микроорганизмов проводятся не одно десятилетие в разных странах мира.

В настоящей монографии мы попытались обобщить материалы многолетних исследований молочнокислых бактерий, обитающих в винах различных регионов стран СНГ, в аспекте решения проблемы регулирования кислотности биологическим способом.

Интересные данные получены по количественному соотношению органических кислот в винах различных климатических зон и определения потенциальных возможностей для проведения яблочно-молочного брожения. Изучение некоторых закономерностей развития молочнокислых бактерий в виноградном сусле позволило теоретически обосновать и осуществить практически проведение яблочно-молочного брожения в сусле при приготовлении столовых и шампанских виноматериалов непосредственно на заводах первичного виноделия. Подчеркивается, что ЯМБ является не только процессом снижения кислотности, но и важнейшим фактором биологической стабильности и повышения качества готового продукта.

Подобраны, апробированы в производственных условиях и рекомендованы к внедрению культуры молочнокислых бактерий для проведения индуцированного яблочно-молочного брожения, которые по заявкам предприятий рассылаются на заводы.

Полученные при изучении взаимоотношений дрожжей и молочнокислых бактерий результаты дают реальные возможности подбора рас дрожжей в зависимости от потребности в яблочно-молочном брожении.

Уникальным в своём роде является материал по исследованию явления бактериофагии молочнокислых бактерий, обитающих в вине. Нами получены первые данные о распространении лизогенного состояния в этой группе микроорга-

низмов и потенциальной возможности присутствия фагов в вине. Позже эти выводы подтверждены зарубежными исследователями, обнаружившими бактериофаги в вине с нарушением яблочно-молочного брожения. Высказано предположение, что прекращение яблочно-молочного брожения вызвано действием бактериофага на молочнокислые бактерии.

Выделение фагов из лизогенных культур *Lact. plantarum* и их полная биологическая характеристика по тестам, используемым в таксономии вирусов являются на сегодняшний день единственным подобного рода материалом для молочнокислых бактерий, обитающих в вине. Отмечено изменение свойств молочнокислых бактерий под влиянием специфических фагов, что открывает перспективы получения культур с заранее заданными свойствами.

В целом, не претендуя на завершённость в освещении некоторых вопросов биологии молочнокислых бактерий вина, мы надеемся, что представленный материал поможет в дальнейших исследованиях этой интересной группы микроорганизмов.

Список использованной литературы

1. Авакян Б.П. О распространении молочнокислых бактерий в различных типах вин Армении // Биологический журнал Армении. - 1969. - N22. - С.44-51.
2. Адамс М. Бактериофаги // Из-во иностр. лит-ры. - 1961. - 527 с.
3. А.с. 379621 СССР. МКИ С12 1/02; С12 и 1/22. Способ биологического регулирования окислительно-восстановительных процессов в виноматериалах (Орешкина А.Е., Саришвили Н.Г., Трофимченко А.В. (СССР). - 1 с.
4. Бамбалов Г., Гарабедян М., Сакова М. Приложение на иммобилизованные бактерии и дрожжи // Лозарство и винарство. - 1987. - 36, - N6. - С.18-22.
5. Бурьян Н.И. Микробиология виноделия. - Ялта. - 1997. - 432 с.
6. Бурьян Н.И. Тюрина Л.В. Микробиология виноделия. - // М.: пищ.пром-ть. - 1979. - 271 с.
7. Валуйко Г.Г., Бурьян Н.И., Качура В.И. Опыт по использованию в виноделии препаратов сухих молочнокислых бактерий // Виноделие и виноградарство СССР. - 1983. - N3. - С.13-14.
8. Габрилович И.М. Основы бактериофагии. Минск: Высшая школа. - 1973. - 221 с.
9. Гишман М.Р., Белоусова Н.Н. Распространённость бактериофагов молочнокислых стрептококков на сыродельных предприятиях // Микробиология. - 1956. - XXV. - С.706-713.
10. Гогоберидзе Р.Г. Молочнокислые бактерии, распространённые в винодельческих районах Грузии // Труды Груз. НИИ пищ. пром-ти. - 1966, - N2, - С.21-26.
11. Голуб Е.И., Равин В.П. Шульга М.Г. Изучение фаговой конверсии у *E. coli* // Генетика. - 1976. - 11. - С.94-99.
12. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. - М. - 1961. - 298 с.
13. Гольдфарб Д.М. Авдеева А.В. Заражение лизогенных сферопластов интактным и разрушенным фагом T_2 , меченным C^{14} тиазином // Микробиология. - XXXV. - 6. - С.1019-1024.
14. Гольдфарб Д.М., Ильяшенко В.Н. Влияние температуры на дизентерийный фаг и на его взаимодействие с бактериальной клеткой // Изменчивость микроорганизмов и иммунитет. - 1959. - С.170-176.
15. Горина В.А. Явление фагии у молочнокислых бактерий, обитающих в вине // Виноделие и виноградарство СССР. - 1977. - N4. - С.61-62.

16. Горина В.А., Бурьян Н.И., Митюненко А.П. Влияние времени внесения молочнокислых бактерий на скорость яблочно-молочного брожения // Пищевая промышленность. Киев. - 1983. - N3. - С.35-37.

17. Горина В.А., Бурьян Н.И., Митюненко А.П. Гомоферментативные молочнокислые палочки как агенты биологического кислотопонижения вин // Виноделие и виноградарство СССР. - 1982. - N4. - С.56-58.

18. Горина В.А., Бурьян Н.И., Рындина О.В. Влияние пониженных температур на процесс индуцированного яблочно-молочного брожения // Труды ВНИИВПП "Магарах". - 1987.

19. Горина В.А., Ежов В.Н. Взаимоотношения дрожжей и молочнокислых бактерий в производстве игристых вин. // Виноградарство и виноделие. - 1995. N1. - С.68-72.

20. Горина В.А., Ежов В.Н., Федорченко А.В. Взаимоотношения дрожжей и молочнокислых бактерий в виноделии // Виноградарство и виноделие. - 1994. - N2. - С.108-115.

21. Горина В.А., Ермачкова Л.П. Изучение молочнокислых бактерий, выделенных из вин Киргизской ССР // Виноделие и виноградарство СССР. - 1980. - N2. - С.59-60.

22. Горина В.А., Клевченкова О.А. Регулирование кислотности вин в связи с особенностями качественного состава кислот // Мат. респ. конф. молодых учёных по актуальным проблемам пищевой пром-ти. - Тбилиси. - 1978.

23. Горина В.А., Маркина Л.Н. Взаимодействие фагов *Lactobacillus plantarum* с бактериальной клеткой // Вопросы биохимии и физиологии микроорганизмов. Межвузовский научный сборник. - Саратов. - 1979. - Вып.6 - С.76-79.

24. Горина В.А., Митюненко А.П. Подбор культур молочнокислых бактерий для проведения яблочно-молочного брожения в виноматериалах // Матер. респ. научн. конф. молодых учёных по вопросам пищевой пром-ти 11-й пятилетки, посв. 60-летию Советской Грузии. - Тбилиси. - 1981.

25. Горина В.А., Никитина Т.А. Изменчивость молочнокислых бактерий вина под влиянием фага // Вопросы биохимии и физиологии микроорганизмов. Межвузовский научный сборник. Саратов. - 1977. - Вып.5. - С.79-83.

26. Горина В.А., Щеглова М.К., Рабинович З.Д. Явление лизогении у молочнокислых бактерий // Вопросы биохимии и физиологии микроорганизмов. Межвузовский научный сборник. Саратов. - 1975. - вып.3. - С.129-132.

27. Горина В.А., Щеглова М.К., Рабинович З.Л. Некоторые биологические свойства фагов *Lact. plantarum*, выделенных из вина // Вопросы биохимии и физиологии микроорганизмов. Межвузовский научный сборник. Саратов. - 1977. Вып.5 - С.74-77.

28. Горина В.А., Щеглова М.К., Рабинович З.Л., Иванова Л.А. Влияние активной реакции среды на стабильность и показатель оптимальной множественности инфекции фага

Lactobillus plantarum // Вопросы биохимии и физиологии микроорганизмов. -Межвузовский научный сборник. Саратов.-1976. -Вып.4 -С.114-117.

29. Горина В.А., Бурьян Н.И., Савенко Л.М., Нестеренко А.Г. Регулирование кислотности вин в условиях Закарпатской области. Пищевая промышленность. -Киев. -1981. -N2 -С.31-32.

30. Горина В.А., Щеглова М.К., Рабинович З.Л., Иванова Л.А. Влияние этилового спирта и сернистого ангидрида на стабильность и литическую активность фага *L. plantarum* // Вопросы биохимии и физиологии микроорганизмов. Межвузовский научный сборник. Саратов. -1976. -Вып.4 -С.108-113.

31. Горина В.А. Дослідження явища бактеріофагії у молочнокислих бактерій вина // Мікробіологічний журнал; N4.-С.475-476.

32. Деншиков М.Т. Рылкин С.С., Жвирблянская Д.Ю. Образование диацетила и ацетила при сбраживании пивного сусла // Микробиология - 1962. -XXXXI. - 1. -С.140-145.

33. Дерябина Е.Н. Получение фагорезистентных штаммов молочнокислых стрептококков с ценными для производства свойствами // Микробиология. -1953, XXVII, -Вып.4 -С.452-456.

34. Дрель-Гитис Е.В. Бактериофаг молочнокислых бактерий, вредителей спиртового производства // Спиртоводочная промышленность, 1938. -N10. -С.14-16.

35. Журавлёва Л.И., Тимук О.В., Солуянова А.П. Экология молочнокислых бактерий винодельческих районов Туркмении. Известия АН Туркменской ССР, серия биологических наук. -1968. -N1. -С.25-28.

36. Здродовский П.Ф. Проблемы инфекции, иммунитета и аллергии. -М.: Медгиз; 1963. -467 с.

37. Зинченко В.И. Полисахариды винограда и вина. -М.: Пищевая промышленность, 1978. -151 с.

38. Иванова И.П., Баштанная И.И. Молочнокислые бактерии в производстве шампанского бутылочным методом // Виноделие и виноградарство СССР. -1973. -N4. -С.25-27.

39. Карелина Л.П. Уточнение технологических режимов стабилизации вин против коллоидных помутнений. Автореф. дис. канд. техн. наук. М.-1981. - 32 с.

40. Качура В.И. Разработка технологии биологического кислотопонижения столовых виноматериалов препаратами сухих культур молочнокислых бактерий // Автореф. дис. канд. техн. наук. Ялта. -1985.

41. Квасников Е.И. Биология молочнокислых бактерий. -Ташкент; изд-во АН Уз. ССР. -1960. 351 с.

42. Квасников Е.И., Кондо Е.Ф. Молочнокислые бактерии вина и основы регулирования их жизнедеятельности. М.: Пищевая промышленность, 1964. -46 с.

43. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бак-

терии и пути их использования. М.: Наука. -1975. -389 с.

44. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. -Киев: Наукова думка. -1991. -322с.

45. Козуб Г.И., Смирнова В.И., Трофимченко А.В., Орешкина А.Е. Биологическое кислотопонижение виноматериалов в непрерывном потоке // Виноделие и виноградарство СССР. -1976. N7 С.6-7.

46. Козуб Г.И., Чокрой П.К., Смирнов В.И., Трофимченко А.В., Орешкина А.Е. Установка для биологического кислотопонижения виноматериалов // Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. - 1977. N1. -28-30.

47. Кондо Г.Ф. Яблочно-молочное брожение в винах Молдавии // Тр. Молд. НИИ садоводства и виноградарства -1966. -т.12. -С.42.

48. Кондо Г.Ф. Яблочно-молочное брожение вин с помощью чистой культуры бактерий // Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. -1960. -N8. -С.41-43.

49. Кондо Г.Ф., Фаденко П.С. Яблочно-молочное брожение вин, хранившихся в крупных резервуарах // Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. -1963. -N2. С.12-15.

50. Марченко Н.К. Стимуляция фаголизиса *Str. Lactis* некоторыми веществами. // Вопросы вирусологии. -1959-5. -С.610-615.

51. Медвинська Л.Ю. Типи бактеріофага молочнокислих стрептококів // Мікробіологічний журнал АН УРСР. -1954. -XXVI,4.С.58-63.

52. Медвинська Л.Ю., Новикова С.І. Типи бактеріофага молочнокислих стрептококів // Мікробіологічний журнал АН УРСР. -1954. -Т.XVI. -N4.-С.53-57.

53. Медвинская Л.Ю. Бактериофаги молочнокислых стрептококков // Вопросы пищевой и бродильной микробиологии. -Киев. -1958. -С.95-100.

54. Медвинская Л.Ю. Роль бактериофага молочнокислых стрептококков в молочной промышленности // Вопросы биохимии в пищевой промышленности. -Киев: АН УССР. -1951.С.53-59.

55. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология, Из-во иностр. лит-ры 1967. - 347 с.

56. Милиенко Н.А., Давиденко Т.И., Размадзе Г.И., Матвийчук Л.А., Бондаренко Г.И. Кислотопонижение виноматериалов с помощью иммобилизованных в каррагинан клеток // Виноградарство и виноделие. -1994. -N2.-С.115-124.

57. Мытник Л.Г., Тихоненко А.С. Сравнительное изучение умеренных и вирулентных фагов молочнокислых стрептококков // Прикладная биохимия и микробиология. -1975. -XI, N6, -с.819-823.

58. Мовсесян М.А., Бирюзова А.М., Золковер В.Н. Изучение морфологии бактериофага *Str. lactis* с помощью электронного микроскопа // Журнал микробиологии, эпидемиологии и им-

мунологии. -1950. -N3. С.61-64.

59. Непомнящая М.А., Медвинская Л.Ю., Либерман Л.А. Бактериофаг молочнокислых стрептококков и борьба с ним в молочной промышленности.-Киев. АН УССР. -1961. -15 с.

60. Новосельцев Н.Н., Арутюнов Ю.И. Чумной умеренный фаг //Внехромосомные факторы наследственности у бактерий. М. -1969. -С.32-34.

61. Орешкина А.Е., Новикова В.Н., Полякова Г.И. Применение бактерий-кислотопонижателей в производстве шампанских виноматериалов // Виноделие и виноградарство СССР. -1983. -N6. -С.16-19.

62. Павлов Димо. На ясни позиции в въпрос за яблочно-молочнокислевата ферментация // Лозарство и винарство. -1974. -23. N8. -С.31-37.

63. Палладина О.К., Перетц Л.Г., Мазюкевич В.А. О борьбе с бактериофагом молочнокислого стрептококка //Микробиология. -1943. -XII,V.I. -С.44-51.

64. Петровская В.Г., Бондаренко В.М. Фаговый контроль синтеза группового специфического антигена 7.8//Внехромосомные факторы наследственности у бактерий. М. -1969.-С.41-43.

65.Петян Э.О. Видовой состав молочнокислых бактерий вин Октемберянского района //Микробиологический журнал Армении. - 1968. -21,-3.58-63.

66. Пехов А.П., Рыбаков Н.И., Мищенко Б.А. Методы изучения лизогенных бактерий//Лабораторное дело.-1963. -4. -С.3-7.

67. Рабинович З.Д. Бактерии-кислотопонижатели высококислотных вин //Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. -1975. -N2.-С.9-11.

68. Рабинович З.Д. Кислотовыносливость молочнокислых бактерий, выделенных из вин //Виноделие и виноградарство СССР. -1974. -N2.-С.15-23.

69. Рабинович З.Д. Роль молочнокислых бактерий в виноделии. -М.1972. -8 с.

70. Рабинович З.Д., Бурьян Н.И. Видовой состав молочнокислых бактерий азербайджанских вин //Виноделие и виноградарство СССР. -1970.-N8. -С.15-16.

71. Райтер П. Влияние питания и некоторых других факторов на рост в молоке важных для сыроделия бактерий //Материалы XII Международного конгресса работников молочного дела. -М.: -1951. -1. С.199-200.

72. Раутенштейн Я.И. Об истинной лизогении у актиноциетов//Микробиология. -1957. -XXV. -5. -С.573-579.

73. Раутенштейн Я.И. Лизогения и её биологическое значение //Успехи микробиологии. -1971. -N7. -С.223-240.

73 а. Раутенштейн Я.И., Жунаева В.В., Хохлова Ю.М., Нестерова Н.Г., Москаленко Л.Н. О факторах, вызывающих лизис культуры *Actinomyces rimosus* - продуцента антибиотика окси-

тетрациклина. //Микробиология.- 1975. -XLIV. - 5. -С.899-904.

74. Рибери-Гайон Ж., Пейно Э., Рибери-Гайон П., Сюдро П. Теория и практика виноделия. -М.: Пищевая промышленность. -1979. -Т.2.-352 с.

75. Родопуло А.К. Биохимия шампанского производства. -М.: Пищевая промышленность. -1975. -352 с.

76. Родопуло А.К. Превращение органических кислот при сбраживании сусла и шампанизации вина //Прикладная биохимия и микробиология //Труды ВНИИВиВ "Магарац", -1958. -Т.VI. в XI.

77. Родопуло А.К., Писарницкий А.Ф. Образование диацетила и его роль в виноделии //Прикладная биохимия и микробиология. 1969. -Т.5.-С.587-600.

78. Рунов Е.В., Коноплева Е.П., Сокольская А.П. Бактериофаг в сыроделии //Микробиология. -1950. -XIX. С.355-363.

79. Саруханян Ф.Г., Севоян А.Г., Взаимодействие дрожжей с молочнокислыми бактериями, вызывающими скисание вин //Известия АН Армянской ССР. -1965. -18. N12. С.44-50.

80. Сербинова Н.И., Сокольская Е.В. Бактериофагия у молочнокислых палочек типа *Lactobacillus plantarum* //Микробиология. 1954. -XXII. N4.С.424-421.

81. Тараканов Б.В. Биологические свойства бактериофагов *Str. bovis*, выделенных из лизогенных культур и рубца овец//Микробиология.-1976. XIV, 4. С.695-700.

82. Технологическая инструкция по проведению процесса биологического кислотопонижения при приготовлении столовых виноматериалов. ТИ N18-12-47-81г

83. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. -М.: Наука.-1968. -168 с.

84. Трофимченко А.В., Орешкина А.Е. Биологическое регулирование окислительно-восстановительных процессов в производстве столовых вин //Виноделие и виноградарство СССР. -1973. -N7. С.15-17.

85. Филиппов Б.А., Размадзе Г.И., Сафронов О.М., Матвийчук Л.А. Биологическое кислотопонижение - резерв улучшения качества столовых вин //Виноделие и виноградарство СССР. -2.С.12-15.

86. Цаков Д., Спиров Н. Влиянието на ябълчната киселина върху шампанските свойства и вкусовите качества на виноматериалите и естествено пенливото вино //Лозарство и винарство. 1971. - N7.С.28-31.

87. Цанева К., Распространението на бактериофагите на *Str. cremoris* в предприятие, проработеща мляко //Хранительна промышленность.-1973. -8-9. -С.27-29.

88. Цветанов О., Бамбалов Г. Влияние на ябълчено-молочнокиселата ферментация и шампанските винматериалы върху качеството на червените естествено пенливи вина. II част. //

Лозарство и винарство. -1993. -42,-N8. -С.7-8.

89. Цветанов О., Бамбалов Г. Влияние на ябълченомленокиселата ферментация в шампанските виноматериали върху качеството на черваните естествено пенливи вина. I част. // Лозарство и винарство. -1993. -42.-N7. -С.6-10.

90. Шандерль Г. Микробиология соков и вин. М.: Пищевая промышленность. -1967. -359 с.

91. Щеглова М.К. О методике получения активных антифаговых сывороток // Журнал микробиологии и иммунологии. -1966. -N8. -С.26-30.

92. Юстратова Л.С. Видовой состав молочнокислых бактерий вин Молдавии // Виноделие и виноградарство СССР. -1967. -N2. -С.21-25.

93. Яковлев Д.А. Бактериофаг молочнокислых стрептококков // Микробиология. -1939. -Т.VII. -Вып.7. -С.932-949.

94. Barretto De Menzes T.Y. Splittstoesser D.F., Stamer Y.B. Induced malo-lactic fermentation of New York State wine // New York Food and Life Science Quart. -1972. -5. -P.24-26.

95. Beelman R., Gallander J. The effect of grape skin treatments on induced malolactic fermentation in Ohio wines // Amer. J. Enol. and Viticult. 1970. -21 -P.193-200.

96. Beelman R., Gavin A., Keen R. A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malo-lactic fermentation in wines // Amer. Journal of Enol. and Viticult. -1977. -28, N3. -P.159-165.

97. Beelman R., Mc. Ardle F., Duke G. Comparison of *Leuconostoc oenos* strain ML-34 and SSU-1 to induce malo-lactic fermentation in Pennsylvania red table wines // Amer. J. Enol. and Viticult. 1980. -31.-N3. -P.269-276.

98. Boirdon A.M. Contribution à l'étude de l'antagonisme entre le levures et les bacteries du vin // Thèse 3e Cycle, Bordeaux. -1969.

99. Boidron A.M. Sur deux causes d'inhibition des levures par les bacteries lactiques, // C.r. Acad. Sci. -1969. -D269. -N9. -p.922-924.

100. Bousbouras G.E., Kunkee R.E. Effect of pH on malolactic fermentation in wine // Amer. J. Enol. and Viticult. -1971. -N3 -P.121-126.

101. Brechot P., Chauvet J., Croson M. Influence de la concentration initiale de l'acide malique des moûts sur le déclenchement et l'évolution de la fermentation malolactique // Rev. Franç OEnol. -1976 -15. -N62. p.39-44.

102. Cavin I.F., Dici F.Z., Prevost H., Divies C. *Leuconostoc oenos* by mitomycin induction // Amer J. Enol. and Viticult. -1991. -42.-N3. -P.163-166.

103. Cazells O., Gnaegi F. Enquete sur l'importance pratique du probleme des Bacteriophages dans le vin // Rev. Suisse Viticult. Agboricult. -1982. 14. -N5-P.267-270.

104. Chaifan J. Goldberg I., Mateles R. Isolation and characterization of malolactic bacteria from Israeli red wines // J. Food Sci. -1977. -42. Sci. -1977. -42. N4. -P.939-943.

105. Cherry W.E., Watson D.W. *Streptococcus Lactis* host-virus system // Journal of Bacteriology. -1949. -V.58-N5 -p.601-611.

106. Coetzee J.N., Klerk H.C. de. Lyzogeny in the genus *Lactobacillus* // Nature Engl. -1962. -194. -4827. -p.505-508.

107. Collins E.B. Behavior and use of lactic streptococci and their bacteriophages // Journal of Dairy Science. -1962. -V.45. -N4 -P.552-558.

108. Crapisi A. Improved stability of immobilized *Lactobacillus* sp. cells for the control malolactic fermentation // Amer. J. Enol. and Viticult. 1989. v.38. -N4. -P.310-312.

109. Crapisi A., Nuti M.P., Zamarani A., Spettole P. Improved stability of immobilized *Lactobacillus* cells for the control of malolactic fermentation in wine // Am. J. Enol. Vitic. -1988. -V.36. -N4. -P.310-312.

110. Cuenca Ph., Villetaz J.-C.I. Essais de fermentation malolactique de vins par bacteries lactiques immobilisees de genre *Leuconostoc* // Rev. Suisse Viticult. Arboricult Horticult. -1984. -16. -N3. -P.145-151.

111. Deen D.D., Nelson F.E. Multiple strain bacteriophage infection of commercial lactic starters. // Journal of Dairy Science. 1952. -V.35. -N8. -P.678-674.

112. Descont J. Une possibilite d'ensemencement massif pour induire la fermentation malolactique // Connaissance Vigne Vin. -1980. -14.-1. -P.73-77.

113. Dittrich H.H., Sponholz W.R., Wipfler. Zur veränderung des Weines durch den bakteriellen Saureabbau // Wein-Wiss. -1980. -35.-N6. -p.421-429.

114. Divies C., Cavin F. Apropos sur l'utilisation rationnelle de *Leuconostoc oenos* pour réaliser la fermentation malolactique des vins // Rev. Franç. Oenol. -1985. -25. -N99. -P.29-32.

115. Divies Ch. Les possibilites d'emploi des germes fikes en oenologie // Bull. /O.I.V. 1981. -V.54-608. -P.843-857.

116. Fornachon J. of the Science of Food and Agric. -1968. -19.-N7. -P.374-378.

117. Friedman M., Cowles P. The bacteriophages of *Bacillus megatherium*. Serological, physical and biological properties // Journal of Bacteriology. -1953. -65. -P.379-383.

118. Galesloot T.E., Hasaing F., Stadhouders J. Differences in phage sensitivity of starters propagated in practice and in a Dairy Research Laboratory. XVIII International Dairy Congress, Section D. -1961.-2. -P.491-498. Herausgeber, XVII Internationaler Milchwirtschaftskongress. -1966. -Munchen.

119. Gallander J.F. Effects of time of bacterial inoculation on the simulation of malo-lactic fermentation // Amer. J. Enol. and Viticult. -1979. -30. -2. -P.157-159.

120. Galzy P., Plan C. Déclenchement controle de la retrogradation malolactique dans les vins // Vignes et vins. 1967. -V.31. -N164.-P.31-34.

121. Galzy P., Plan C. Mericres G.R. D'ensemencements de bacteries malolactiques // Vignes et Vins. -1968. -172. -P.31-34.

122. Garvia E. Lactic dehydrogenases of the genus *Leuconostoc* // *J. Gen. Microb.* -1969. -N1. -p.85-94.
123. Garvie E. *Leuconostoc oenos* sp. Nov. // *Journal of General Microbioligu.* -1967. -48.431. -P.8.
124. Gildemeister E., Herzberg K. Zentralblatt fur Bacteriologie. / / Abteilung Orig. -1924. -93. -8. -P.402. Цит. по Пехов А.П., Рыбаков Н.И., Мищенко Б.А. Методы изучения лизогении бактерий // Лабораторное дело. -1963. -4. -С.3-7.
125. Gnaegi F. La desacidification des vins // *Revue Suisse de Vitic Arboric. Hortic.* -1982. -17. -N3 -P.147-154.
126. Gnaegi F., Cazelles O., Sozzi T., D'Amicon. Connaissances sur les bacteriophages de *Leuconostoc oenos* et progres dans la mai trise de la fermentation malolactique des vins. // *Rev. Suisse Viticult., Arboric. Hortic.* -1984. -16. -N2 -P.59-65.
127. Gnaegi F., Sozzi T. Les bacteriophages de *Leuconostoc oenos* et leur importance oenologique // 62 Assemblée General de l'O.I.V., Paris. -30 aout-4 september. -1982. -Commission // *Oenologie.* -P.1-9.
128. Grobmann Manfred/ *Biologisher Saureatbau* // *Deutsch. Weinbau.* -1993. -N19. -S.23.
129. Groves Sarah. Malolactic fermentation in table wines: an overview // *Biochemist.* -1996. -18, N5. -P.13-16.
130. Guerroni M., Elisaveta Gardini Fausto. Interazione tra liaviti e batteri latticci nella conversione dell'acido malico nei vini // *Ind. bev.* -1988. -17. N3. -P.239-245.
131. Gunge Norio, Tamaru Uko, Ozava Fumiko, Sakaguchi kenji. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *kluveromices* lactic and plasmid-associated killer character. // *Journal Bacteriology.* -1981. -145. -N1 -P.382-390.
132. Habaj B., Hnatkowska M., Rapesinski N. The influence of some properties of bacteriophages on the difficulties of controlling-fermentation troubles // *XVII International Dairy Congress.* Munchen. -1966. -P.483-490.
133. Henning D.R., Black C.H., Sandine W.E., Eliker P.R. Host-range studies of lactic streptococcal bacteriophages // *Journal of Dairy Science.* -1968. -V.51. -N1. -P.16-21.
134. Huberty J.P. L'acidité des vins // *Ann. Gembloux.* -1980. -V.86. -N2. -P.109-110.
135. Ingraham J.Z., Vaughn R.H., Goobe G.M. Studies on the malo-lactic organisms isolated from California wines // *Amer.J. Enol. and Viticult.* -1960. -11. -N1. -P.1-4.
136. Kampis A., Kerenyi Z., Hosenke A. Vorosborok iranyitottbalmasavbontasa. // *Borgazdasag.* -1988. -36. -N4 -c.147-151.
137. Keogh B.P., Shimmin P.D. An inducible antibacterial agent produced by a strain of *Streptococcus cremoris* // *Journal of Dairy Research.* -1960. -36. -P.87-92.
138. Klerk H.C. de, Coetzee J.N., Theron I.J. The characterisation of a series of *Lactobacillus* bacteriophage // *Journal of General Microbiology.* -1963. -32. -N1. -P.61-67.
139. Klerk H.C. de, Coetzee J.N. The fine structure of *Lactobacillus* Bacteriophages // *Journal of General Microb.* -1965. -V.38. -P.35-38.
140. Klerk H.C. de, Hugo N. Phage-like structure from *Lactobacillus acidophilus* // *Journal of General Virology.* -1970. -V.8. -N.3. -P.231-234.
141. Kosack W., Rajchert-Tapil Zaydal J. Dobranski W. Lysogeny in lactic *Streptococci* and not producing nisin // *Applied Microbiology.* -1973. -25. -2. P.305-308.
142. Kunkee R.E. Control of malo-factic fermentation induced by *Leuconostoc Citrovorum* // *Amer.J. Enol. and Viticult.* -1967. -18. -2. -P.71-77.
143. Kunkee R.E. Malo-lactic fermentation in winemaking. In: Webb A.D. (Ed.). *Chemistry of winemaking.* Washington. -1974. -P.151-170.
144. Kunkee R.E. Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making // *FEMS Microbiol Rev.* -1991. -88. -N1. -P.55-72.
145. Kunkee R.E., Ough C.S., Amerine M.A. Induction of malo-lactic fermentation of must and wine with bacteria // *Amer. J. Enol. and Viticult.* -1964. -15. -4. P.178-183.
146. Lafon-Lafourcade S., Domercq S., Peynaud E. Etude de l'ensemencement des vins par des bactéries de la fermentation malolactique // *Connaissance Vigne Vin.* -1968. -2. -P.85-95.
147. Lafon-Lafourcade S., Lusmarat V. Identification et classification de 46 souches de bactéries lactiques isolées de raisins de moûts et de vins // In: Institut d'Oenologie. *Rapport des Activités de Recherche.* -1977-78. -P.18.
148. Lonvaud-Furel A. Etude les interactions entre levures et bactéries lactiques dans le moût de raisin // *Connaissance Vigne Vin.* -1988. -22. -N1. -P.11-24.
149. Lowrie R.I. Lysogenis strain of group N lactic *Streptococci* // *Applied Microbiology.* -1974. -21. -1. -P.210-217.
150. Manca de Nadre Maria C., Stresser de Saad A. Effect of organic acids on the growth of *Leuconostoc* and *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from red wines // *J. Int. Sci. Vigne Vin.* -1991. -25. -N2. -P.99-108.
151. Marret R., Sozzi T. Flora malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais // *Ann. Technol. Agr.* 1979. -28. -N1. -P.31-40.
152. Maret R., Sozzi T., Schellenberg D. Flora malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais // *Ann. Technol. Agr.* -1979. -28. -N1. -P.41-55.
153. Matanabe K., Takesue S., Jin-Nai K., Joshikawa T. Bactériophage active against the lactic acid beverage producing bacterium *Lactobacillus casei*. // *Appl. Microb.* -1970. -V. 20. -V.20. -N3. -P.409-415.
154. Mc. Cord. G.D., Dewey D.Y. Development of malolactic fermentation progress using immobilized whole cells and enzymes // *Amer.*

- Journal of Enol. and Viticult. 1985. -V.36. -P.214-218.
155. Mc. Kay L.L., Baldwin K.A. Induction of prophage in *Streptococcus lactis* C2 by ultraviolet irradiation // *Applied Microbiology*. -1973. -25. -4. -P.682-684.
 156. Mennier J.M., Bott E.W. Das Verhalten verschiedener Aromastoffe in Burgenderweinen im Velfaur des biologischen Sauerabbaus // *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* -1979. -6. -N3. -S.92-96.
 157. Michel M. Etat actuel de nos connaissances sur la fermentation malolactique en Bourgogne // *Vignes et vins*. -1959. -N80. -P.18-19.
 158. Minarik E. Negativna uloha bakteriofagov pri bacterialnom odburavani kyselín vo vine // *Vinograd. -CSSR. -Praha*. -1983. -3. -P.66-67.
 159. Murota Akira, Mitsutake Takahisa. Growth inhibition of *Lactobacillus casei* phage II. by dehydroacetate // *Argic. and Biolog.* -1973. -37. -7. -P.1763-1764.
 160. Nichols K.D., Holloway. Bacteriophages from sewerage that attack lactic streptococci. // *Australian Journal of Dairy Technology* -1961. -16. -N4. -P.250-252.
 161. Orla-Jensen S., Jensen S. The lactic acid bacteria // *Copenhagen, Andr. Host. and. Son.* -1919.
 162. Pardo J. Zuniga M. Lactic acid bacteria in Spanish red, rose and white musts and wines under cellar condition // *Jornal Food Sci.* -1992. -57. -N2. -P.392-395, 405.
 163. Parmelee C.E., Carr P.H., Nekson F.E. Electron microscope studies of bacteriophages active against *Streptococcus Lactis* // *Journal of Bacteriology*. 1949. -57. -P.391-398.
 164. Pederson C.S. The gas-producing species of the genus *Lactobacillus* // *Journal of bacteriology*. 1938. -35. -2. -P.95.
 165. Peynaud E., Domercq S. Etude de quatre cents souches de cogues heterolactiques isolés de vins // *Ann. Inst. Pasteur Life*. -1968. -19. -p.150-169.
 166. Peynaud E., Domercq S. Etudes sur les bactéries lactiques des vins // *Ann. Inst. Nat. Rech. Agron.* -1961. -10. -N1. -P.40-60.
 167. Peynaud. E., Etudes recentes sur les bactéries lactiques du vin / 2-e Symposium international d'Oenologie. -Bordeaux-Cognace, -1967.
 168. Peynaud E., La fermentescibilité malolactique des vins // *Rev. Franç. Oenol.* 1971. -12. -N43. -P.25-27.
 169. Pierra G. Fermentation malo-lactique des vins de Champagne et vins. -1959. -80. -P.25-28.
 170. Pilone G.J., Kunkee R.E. Characterization and energetics of *Leuconostoc oenos* ML-34 // *Amer.J. Enol. and Viticult.* -1972. -23. -P.61-70.
 171. Radler F. Untersuchung des biologischen Saureabbaus im Wein Isolierung Charakterisierung von Apfelsäure. - Abbuch der bakterien // *Arch. f. Mikrob.* -1958. -30. -N1. -S.64-68.
 172. Radler F., Knoll C. Die Bildung von killertoxin und die Beeinflussung der Gärung durch Apiculatus // *Hefen. Vitis*. -1988. -27. -1988. -27. -N2. -S.111-132.
 173. Rankine B.C., Fornachon J.C.M., Annette Bridson, Celier K.M. Malo-lactic fermentation of Australian red table wines // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. -1970. -21. -N9. -P.471-476.
 174. Rauhut D., Bauer O., Krieger S.A., Dittrich H.H. Einfluss des biologischen Saureabbaus auf Farbinintensität und Gehalt an freien und kondensierten Anthocyanen // *Forschungsanstalt Geisenheim, Condimenta Stuttgart*. -1995. -S.165-173.
 175. Rice A.C. The malolactic fermentation in New York State wines // *Amer. J. Enol. and Viticult.* -1965. -16. -N2. -P.89-93.
 176. Rogosa M., Sharpe M.E. An approach to the classification of the lactobacilli // *Journal of Applied Microbiology*. -1959. N2. -P.329-340.
 177. Rogosa M., Wiseman F., Mitchel J., Disraeli M. Species differentiation of oral Lactobacilli from man, including description of *Lactobacillus salivarius* nov. spec and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec. // *Journal of Bact.* -1953. -65. -P.681-699.
 178. Rossi J., Costamagna L., Clementi F. La flora malolactica in alcuni vini dell'Italia centrale // *Ann. Fac. Agr. Univ. Studi Perugia*. -1977-78. -32. -N1. -P.187-196.
 179. Runjic-Peris Viera. Malolactic fermentation of wines // *Prehremb.-Tehnol. I Biotehnol. Rev.* 1993. -31. -N1. -P.51-56.
 180. Sakurai Toshiso, Kuho Sumiko, Onoue Sibo. Нихон Ночэй качаку кайси. подеи Кадаки Kaichi // *Journal Agric. Chem. Soc. Japanese*. -1975. -49.3. -P.169-177.
 181. Sakurai Tohisio, Takahashi Tokutaro, Arai Hiroshi. The temperate phages of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus casei* // *Japanese Journal of Microbiology*. -1970. -14(4). -P.333-336.
 182. Sakurai Tohisio, Takahashi Tokutaro, Kamijama Kunujeshi, Arai Hiroshi. Isolation of bacteriophages parasitizing on *L. casei* and *L. plantarum* and their several properties // *Bupycy, Virus*. -1969. -19. -6. -P.311-324.
 183. Sandine W.E., Elliker P.R., Allen L.K., Braun W.C. Symposium on lactic starter organisms // *Journal of Dairy Science*. -1962. -45. -P.1266-1271.
 184. Sandine W.E., Elliker P.R., Hays H.A. Bacteriophage-Lysis of *Streptococcus diacetilactis* and its effect on diacetyl production in mixed-strain cultures // *Journal of Dairy Science*. -1960. -43. -6. -P.755-761.
 185. Sato Jasuchi, Sin Chirulan. Isolation of bacteriophages for lactic acid bacteria and its characteristics on bacterial lysis. Нихон Тикусай чаккайхо // *Japanese Journal of Soothechnical Science*. -1970. -1970. -41. -N4. -P.190-196.
 186. Shafia F., Tompson T. Calcium requirement for proliferation of bacteriophage M4 // *Journal of Bacteriology*. -1964. -88. -P.293-295.
 187. Sharpe M.E. Identification of the lactic acid bacteria // *Identif. Meth. Microbiol.* - London e.a. -1979. -P.233-259.
 188. Sozzi T. Etude de la prevention d'une attaque de bacteriophages lors de la fermentation malolactique du vin // *Production et consommation du vin en harmonie avec l'environnement (XVIII Congress international de la vigne et du vin de l'O.I.V., Oenologie). Le Cap. Afrique du Sud*. 24-

28 October. -1983. -P.277-279.

189. Sozzi T., Gnaegi F. Ricenti aquisizioni sulla fermentazione malolattica: aspetti microbiologiche e tecnologici // *Vino: bevanda ed alimentazione*. 2 Symp. Intern. Pavia, 5-7 Quigno. -1984 -Pineroto. -1985. - P.164-167.

190. Sozzi T., Gnaegi F., D'amigo N., Hose H. Difficultes de fermentation malolactique du vin dues a des bacteriophages de *Leuconostoc oenos* // *Rev. Suisse Viticult. Arboricult. Horticult.* -1982. -14. -N17. -P.23.

191. Sozzi T., Maret R., Polin J.M. Mise en evidence de bacteriophages dans le vin // *Experimentia*. -1976. -32. -5. -P.568-569.

192. Spettoli P., Nutti M.P., Crapisi A., Zamarani A. Technological improvement of malolactic fermentation in wine by immobilized microbial cells in a continuous flow reactor // *Am. N.V. Acad. SCI.* -1987. -V.501. -P.386-389.

193. Spettoli P., Nutti M.P., Bottacin A., Zamarani A. Immobilisation of *Leuconostoc oenos* ML34 in calcium alginate gels and its application to wine technology // *Amer. J. Enol. Vitic.* -1982. -33. -N1. -P.1-5.

194. Sudzuki Jese, Nekkune Sajuke. Выделение солестойких киллерных дрожжей. // *Биосайенсу то индасутори = Biosei. and* - 1990. - 48, N5.- с.449-451. Цит. по РЖ 19Р. Химия и технология пищевых продуктов. -1991. 7Р1471.

195. Tokuyama Kioshi, Sakurai Toshio, Arai Hiroshi, Oda Akira. Studies on temperate Phages of *Lactobacillus salivarius* // *Japanese Journal of Microbiology.* - 1972. -16,5. -P.385-395.

196. Webb R.B., Ingraham J.Z. Induced malolactic fermentations // *Amer. J. Enol. Viticult.* -1960. -11. -N2. -P.59-63.

197. Whitehead H.H., Cox G.A. Bacteriophage phenomenas in cultures of lactic Streptococci // *Journal of Dairy Research.* -1936. -7.-P.55-62.

198. Wilkowski H.H., Nelson F.E., Parmelee. Heat inactivation of bacteriophage strains active against Lactic Streptococci. // *Appl. Microb.* - 1954. - 2. -P.520-253.

199. Williararason K.L., Bertaud W.S. A new bacteriophages active against a lactic streptococcus // *Journal of Bacteriology.* -1951. -61.-P.643-645.

200. Zehren V., Whitehead H. Growth characteristics of streptococcal phages in relation to cheese manufacture // *Journal of Dairy Science.* -1954. -37. -P.209-219.