

Оценка штаммов молочнокислых бактерий по способности усваивать L-яблочную кислоту

Татьяна Николаевна Танащук, канд. техн. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией микробиологии, magarach_microbiol.lab@mail.ru; тел.: +79892405952;

Максим Юрьевич Шаламитский, мл. науч. сотр. лаборатории микробиологии, mshalamitskiy@yahoo.com; тел.: +79780226148;

Дмитрий Юрьевич Погорелов, науч. сотрудник лаборатории химии и биохимии вина, pogdmi@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», Россия, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31, 298600

Из всех процессов, вызываемых молочнокислыми бактериями в винах, единственно полезным является яблочно-молочное брожение (ЯМБ), основной метаболической характеристикой которого является ферментное преобразование двухосновной L-яблочной кислоты в одноосновную L-молочную кислоту и углекислый газ, в результате чего кислотность вина понижается. В работе представлены результаты изучения способности 39 природных штаммов молочнокислых бактерий родов *Leuconostoc* и *Lactobacillus* к усвоению L-яблочной кислоты. При проведении работ использовали методы и подходы, общепринятые в микробиологии виноделия. Способность штаммов молочнокислых бактерий проводить процесс яблочно-молочного брожения тестировали по затратам L-яблочной кислоты на поддержание жизни клеток, не размножающихся делением. Расчет потребления L-яблочной кислоты осуществляли по данным изменения титруемой кислотности среды в процессе культивирования штаммов, предварительно проведя математическую обработку массива расчетных характеристик бинарных систем, построенных на основе варьирования различных соотношений яблочной и молочной кислот. Отбор перспективных штаммов молочнокислых бактерий для ЯМБ проводили по результатам двухступенчатого скрининга. На первом этапе штаммы оценивали по ростовой активности, на втором этапе – по активности усваивать L-яблочную кислоту. Отмечено, что штаммы молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc* характеризовались более продолжительным временем роста, чем штаммы рода *Lactobacillus*. Изучение динамики роста 88 природных штаммов молочнокислых бактерий позволило отобрать 39 штаммов с высокой ростовой активностью, у которых накопление клеточной биомассы через 24-48 ч культивирования, в зависимости от штамма, составило около 10^8 – 10^9 клеток/см³. При изучении потенциальной возможности 39 природных штаммов молочнокислых бактерий осуществлять процесс яблочно-молочного брожения установлено, что большинство штаммов обладали достаточно высокой активностью к потреблению L-яблочной кислоты. Данное свойство отмечено у 94% исследованных молочнокислых бактерий кокковой формы, что подтверждает их характеристику как типичных агентов яблочно-молочного брожения в практике виноделия. Среди молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* с такой характеристикой отмечены только 50% штаммов, однако перспектива их использования в качестве активных кислотопонижателей также высока.

Ключевые слова: L-яблочная кислота; L-молочная кислота; рацемат; энантиомеры кислот; яблочно-молочное брожение; малат декарбоксилаза; питательная среда; активность роста; титруемая кислотность.

Как цитировать эту статью:

Танащук Т.Н., Шаламитский М.Ю., Погорелов Д.Ю. Оценка штаммов молочнокислых бактерий по способности усваивать L-яблочную кислоту // «Магарач». Виноградарство и виноделие, 2019; 21(4). С.328-332. DOI 10.55547/IM.2019.21.4.010

How to cite this article:

Tanashchuk T.N., Shalamitskiy M.Yu., Pogorelov D.Yu. Evaluation of strains of lactic acid bacteria for capability to assimilate L-malic acid. Magarach. Viticulture and Winemaking, 2019; 21(4). pp. 328-332. DOI 10.55547/IM.2019.21.4.010 (in Russian)

УДК 663.252.4:579.862/.864:577.15

Поступила 30.10.2019

Принята к публикации 18.11.2019

© Авторы, 2019

ORIGINAL RESEARCH

Evaluation of strains of lactic acid bacteria for capability to assimilate L-malic acid

Tatiana Nikolaievna Tanashchuk, Maksim Yurievich Shalamitskiy, Dmitrii Yurievich Pogorelov

Federal State Budget Scientific Institution All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, 31 Kirova str., 298600 Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation

Malolactic fermentation (MLF) is the only useful process of all caused in wine by lactic acid bacteria. Enzymatic transformation of dibasic L-malic acid into monobasic L-lactic acid and carbon dioxide enters as the key metabolic characteristic of MLF, which leads to deacidification of wine. Capability of 39 native lactic acid strains of the genera *Leuconostoc* and *Lactobacillus* to assimilate L-malic acid was studied using conventional methods and approaches of microbiology of wine. The capability of the study strains to conduct MLF was tested by L-malic acid utilization for maintaining viability of non-fissiparous cells. L-malic acid utilization was calculated by changes in titratable acidity of medium during cultivation of the study strains. This was preceded by a mathematical treatment of a set of estimated characteristics of binary systems established based on the variation of malic to lactic acid ratios. Lactic acid strains promising for MLF were selected following a two-step screening during which the growth of the study strains and their activity with refer to L-malic acid assimilation were evaluated. The time-course of growth was longer in lactic acid strains of *Leuconostoc* than in those of *Lactobacillus*. The growth dynamics of a total of 88 native lactic acid strains was assessed, and 39 strains with a high growth efficiency were selected. Strain-dependant cell biomass accumulation of these strains was around 10^8 - 10^9 cells/cm³ after 24-48 h of cultivation. A sufficiently high activity with refer to L-malic acid assimilation was found in the majority of the 39 native lactic acid strains tested for potential capability to conduct malolactic fermentation. This feature was observed in 94% of the studied coccal form of lactic acid bacteria, which proves that they are typical agents of malolactic fermentation for winemaking, and in not more than 50% of the study lactic acid bacteria of *Lactobacillus*. Nevertheless, the prospects for their use as active deacidifiers are also high.

Key words: L-malic acid; L-lactic acid; racemate; enantiomeric acid; malolactic fermentation; malate decarboxylase; growth medium; growth activity; titratable acidity.

Введение. В условиях технологического процесса виноделия могут развиваться только очень немногие группы микроорганизмов, среди которых важное место занимают молочнокислые бактерии. Из всех процессов, вызываемых молочнокислыми бактериями в вине, единственным полезным является яблочно-молочное брожение (ЯМБ), вопросы которого подробно отражены в литературе [1-7]. Основной метаболической характеристикой этого процесса является ферментное преобразование двухосновной L-яблочной кислоты в одноосновную L-молочную кислоту и углекислый газ [8, 9], в резуль-

тате чего кислотность вина снижается. В контролируемых условиях прохождения ЯМБ также способствует повышению биологической стабильности вина и усилению желаемых органолептических изменений столовых вин [10, 11]. Роль молочнокислых бактерий в последние годы повысилась в результате тенденций к уменьшению использования SO_2 и потребительских предпочтений винам с меньшей кислотностью и большей комплексностью. Традиционно многие виноделы создают условия для спонтанного прохождения этого процесса, однако естественный процесс ненадежный и может занять продолжительное время. В современной виноделии особая роль отводится проведению индуцированного ЯМБ с применением чистых культур молочнокислых бактерий. Надежность проведения такого процесса напрямую зависит от применяемых штаммов, основным критерием отбора которых является их высокая декарбоксилирующая активность.

Прохождение яблочно-молочного брожения во многом определяется активностью внутриклеточного фермента малат-декарбоксилазы, который был выделен из молочнокислых бактерий *Lactobacillus* spp., *Oenococcus oeni* и *Lactococcus lactis* и охарактеризован [13, 14], а также скоростью транспортирования L-яблочной кислоты в клетку и L-молочной кислоты из клетки, процесс которого еще недостаточно изучен [15]. По данным С. Лафон-Лафуркад, данный фермент может иметь конститутивный и индуктивный характер и его активность по отношению к L-яблочной кислоте может зависеть от штамма и используемого способа подготовки стартовой культуры [16].

Цель исследования – оценить способность природных штаммов молочнокислых бактерий усваивать L-яблочную кислоту и отобрать перспективные для проведения процесса ЯМБ.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований являлись 88 природных штаммов молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus* и *Leuconostoc* из рабочей коллекции отдела микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН, сформированной по результатам исследований 2015-2017 гг. [17].

В качестве сред культивирования использовали жидкую не селективную синтетическую среду MRS [18] и опытную среду следующего состава (г/дм^3): DL-яблочная кислота – 3,5; гидрофосфат

калия (K_2HPO_4) – 2,0; сульфат магния семиводный ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 0,125; сульфат марганца четырехводный ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) – 0,125. Посевы культивировали при температуре $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ при перемешивании 2 раза в день.

Активность роста штаммов МКБ оценивали нефелометрически. Накопительные культуры получали при культивировании на среде MRS, засевной материал вносили в количестве 2%. Отмечали штаммы, при культивировании которых оптическая плотность клеточной суспензии через 48 ч достигала значения не менее 0,5 при длине волны 590. Для характеристики штаммов по накоплению биомассы строили кривые зависимости оптической плотности бактериальной суспензии от сухой массы клеток для палочковидной и кокковой форм бактерий.

При изучении способности штаммов МКБ усваивать яблочную кислоту применяли тест на яблочно-молочную активность не размножающихся делением клеток [16, 19]. Биомассу накопительных культур, полученную при культивировании на среде MRS, отделяли от культуральной жидкости центрифугированием и несколько раз промывали стерильной дистиллированной водой. Затем отделенные от воды клетки в количестве 50 мг переносили в пробирки с 10 см^3 опытной среды. Через 4 ч и 20 ч определяли массовую концентрацию титруемых кислот в среде методом титриметрии [20].

Расчет потребления яблочной кислоты осуществляли по данным изменения титруемой кислотности до и после инкубирования пробы. Для этого предварительно была проведена математическая обработка массива расчетных характеристик бинарных систем, построенных на основе варьирования различных соотношений яблочной и молочной кислот, с учетом особенностей их катионного и анионного состава, максимально близких по содержанию к опытным вариантам сред. При моделировании систем учитывали, что рК энантиомеров яблочной кислоты в чистых растворах совпадают между собой и не отличаются от рК рацемата яблочной кислоты, пренебрегая при этом влиянием на результат расчета защитных коллоидных веществ, образующихся в культуральной жидкости при ЯМБ, а также наличием других компонентов, способных незначительно влиять на протолитические свойства пробы. Все расчеты были подготовлены с учетом уравнений материального баланса, соблюдением принципа электронейтральности и особенностей катионного состава поликомпонентных систем по методам, изложенным в литературе [21-23]. Для определения расхода яблочной кислоты в экспериментальных вариантах результаты эмпирического анализа были

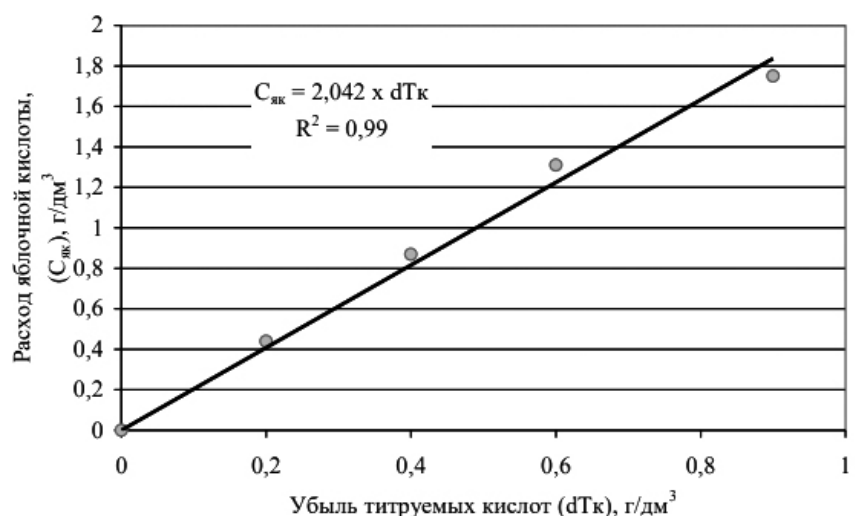


Рис. Математическая взаимосвязь между расходом яблочной кислоты и убылью титруемых кислот при культивировании штамма

Fig. Mathematical relationship between consumption of malic acid and decrease of titratable acids in the process of strain cultivation

обработаны математически (рис.).

Обсуждение результатов

Отбор перспективных штаммов молочнокислых бактерий для ЯМБ проводили по результатам двухступенчатого скрининга. На первом этапе штаммы оценивали по ростовой активности, на втором этапе давали оценку по активности усваивать ими L-яблочную кислоту.

Изначально высокая плотность клеток бактерий в вине способствует быстрому декарбоксилированию L-яблочной кислоты [8, 24, 25], поэтому важным показателем при отборе перспективных штаммов МКБ для проведения процесса ЯМБ в высококислотных винах является их способность в оптимальные сроки накапливать большую биомассу. Существует мнение, что для прохождения яблочно-молочного брожения в вине численность популяции молочнокислых бактерий должна быть не менее 10^6 клеток/см³ [2, 8]. Для отбора молочнокислых бактерий по данному показателю мы проводили скрининг штаммов на среде MRS, которая является полной питательной средой и наиболее часто используется для получения накопительных культур [26]. Изучение динамики роста 88 природных штаммов молочнокислых бактерий позволило отобрать 39 штаммов, оптическая плотность (D_{590}) клеточной суспензии которых через 24–48 ч культивирования, в зависимости от штамма, составила 0,8–1,0, что соответствует примерно 10^8 – 10^9 клеток/см³ [27–29]. Полученные данные показали, что штаммы молочнокислых бактерий рода *Leuconostoc* характеризовались более продолжительным временем роста, чем штаммы рода *Lactobacillus*. Начало роста для 17 отобранных штаммов рода *Leuconostoc* было отмечено через 16–24 ч, начало стационарной фазы роста наблюдали через 72–96 ч, а завершение накопления биомассы в зависимости от штамма отмечено через 4–7 сут. и составляло в диапазоне 0,350–0,659 мг/см³ (сухая масса) или 1,170–2,200 мг/см³ (влажная масса). Начало роста для 22 изолятов рода *Lactobacillus* наблюдали через 5–8 ч, начало стационарной фазы роста – через 15–48 ч, а завершение накопления биомассы в зависимости от штамма отмечено через 1–3 сут. в диапазоне 2,480–5,160 мг/см³ (сухая масса) или 8,247–17,200 (влажная масса).

Известно, что молочнокислые бактерии, выделенные из вин, характеризуются различными способностями по превращению яблочной кислоты в молочную. Для рекомендации штамма в качестве стартовой культуры проведения яблочно-молочного брожения он должен характеризоваться вы-

Таблица. Характеристика штаммов МКБ по активности усвоения L-яблочной кислоты

Table. Characterization of lactic acid strains for activity with refer to L-malic acid assimilation

Коллекционный номер	Продолжительность культивирования, ч	Δ титруемых кислот до и после культивирования пробы, г/дм ³	Потребление L-яблочной кислоты, %
род <i>Leuconostoc</i>			
К.3, К.4, К.6, К.17, К.19, К.22	4	0,51 – 0,60	63,8 – 75,0
	20	0,67 – 0,76	83,8 – 95,0
К.1, К.14, К.21, К.25, К.26, К.48	4	0,35 – 0,44	47,5 – 55,0
	20	0,66 – 0,73	82,5 – 91,3
К.13, К.49	4	0,16 – 0,19	20,0 – 23,8
	20	0,66 – 0,69	82,5 – 86,3
К.18, К.40	4	0,03	3,8
	20	0,19	23,8
К.24	4	нет	нет
	20	нет	нет
род <i>Lactobacillus</i>			
П.4, П.10, П.11, П.37, П.45, П.46, П.47, П.60	4	0,51 – 0,63	63,8 – 78,8
	20	0,63 – 0,70	78,8 – 87,5
П.14	4	0,38	47,5
	20	0,70	87,5
П.78	4	0,13	16,3
	20	0,63	78,8
П.83	4	нет	нет
	20	0,38	47,5
П.19, П.27, П.28, П.32, П.33, П.34, П.43, П.44, П.61, П.64, П.65	4	нет	нет
	20	нет	нет

сокой активностью усвоения яблочной кислоты, способствуя прохождению ЯМБ в оптимальные сроки.

В таблице представлены результаты исследования активности изолятов МКБ усваивать яблочную кислоту через 4 ч и 20 ч после задачи в среду культивирования 50 мг/см³ влажной биомассы бактерий.

Анализ полученных данных показал, что 69 % исследованных штаммов МКБ обладали способностью к потреблению L-яблочной кислоты, на что указывает снижение титруемой кислотности среды в процессе культивирования. Для 31% штаммов изменение титруемой кислотности не наблюдали. Из 12 штаммов, не проявивших способность сбрасывать L-яблочную кислоту, 11 штаммов являются представителями рода *Lactobacillus*. Эти данные подтверждают многочисленные сведения о том, что основными типичными кислотопонижателями в практике виноделия являются штаммы рода *Leuconostoc*.

По эффективности снижения титруемой кислотности и потребления яблочной кислоты из 27 штаммов МКБ, как коковой, так и палочковидной формы, к активным кислотопонижателям отнесли 24 штамма (14 штаммов рода *Leuconostoc* и 10

штаммов рода *Lactobacillus*), для которых потребление L-яблочной кислоты через 20 ч культивирования составило около 80-90%. Однако эти штаммы отличались между собой по количеству потребленной L-яблочной кислоты в первые 4 ч культивирования, что указывает на штаммовые отличия, связанные с адаптацией при переходе с потребления углеводов на усвоение низкокалорийного субстрата – яблочной кислоты.

Выявлены 3 штамма (2 штамма рода *Leuconostoc* и 1 штамм рода *Lactobacillus*), обладающие слабой активностью к сбраживанию L-яблочной кислоты, что возможно связано с более медленным ее транспортированием в клетку. Через 20 ч потребление L-яблочной кислоты этими штаммами кокковой формы составило 23,8%, а штаммом палочковидной формы — 47,5 %.

На основании анализа полученных данных нами отмечены 23 штамма молочнокислых бактерий, усваивающих до 87,5-95,0 % L-яблочной кислоты за 20 ч при вносимой в среду культивирования дозе влажной биомассы 5 г/дм³.

Выводы

Изучение потенциальной возможности 39 природных штаммов молочнокислых бактерий осуществлять процесс яблочно-молочного брожения позволило установить, что большинство штаммов обладают достаточно высокой активностью к потреблению L-яблочной кислоты. Данный признак отмечен у 94% исследованных молочнокислых бактерий кокковой формы, что подтверждает их характеристику как типичных агентов яблочно-молочного брожения в практике виноделия. Среди молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* таким признаком обладали только 50%, однако перспектива их использования в качестве активных кислотопонижателей также высока.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания 0833-2019-0009.

Financing source

The work was conducted under public assignment 0833-2019-0009.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы / References

1. Квасников Е.И., Кондо Г.Ф. Молочнокислые бактерии вина и основы регулирования их жизнедеятельности. М.: Пищевая промышленность, 1964. 45 с.
Kvasnikov E.I., Kondo G.F. Lactic acid bacteria of wine and fundamentals of regulating their vital activity. Moscow: *Pishchevaia promeshlennost*, 1964. 45 p. (in Russian)
2. du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S. *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures — an overview. *Food Bioprocess Technol.*, 2011. Vol. 4. № 6. pp. 876-906. doi: 10.1007/s11947-010-0448-8
3. Bartowsky E.J. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation — moving into the molecular arena. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2005. 11:174-187.
4. Izquierdo Cañas P.M., García Romero E., Gómez Alonso S.,

Fernández González M. and Palop Herreros M. L. L. Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines /P. M. Izquierdo Cañas, E. García Romero, S. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007. 21:731-735.

5. Liu S.-Q. Malolactic fermentation in wine—Beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 2002. 92: 589-601.
6. Henick-Kling T. Malolactic fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Eds Fleet G.H. Chur: *Harwood Academic Publishers*, 1993. pp. 289-326.
7. Горина В.А. Проблемные вопросы биологии молочнокислых бактерий вина. Симферополь: Таврия плюс, 2000. – 104 с.
Gorina V.A. Complex issues of biology of wine lactic acid bacteria. Simferopol: *Tavria Plus*, 2000. 104 p. (in Russian)
8. Handbook of Enology. Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition /P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud. 2006 John Wiley & Sons. 497 p. Ltd ISBN: 0-470-01034-7
9. Zapparoli G., Tosi E., Azzolini M., Vagnoli P., Krieger S. Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in highalcohol wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic*, 2009. 30:49-55.
10. Lòpez R., Lòpez-Alfaro I., Gutiérrez A. R., Tenorio C., Carijo P., Gonzàles-Arenzana L. and Santamaría P. Malolactic fermentation of Tempranillo wine: contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition. *Int. J. Food Science Tech.* 2011. 46 :166-174.
11. Capozzi V., Russo P., Beneduce L., Weidmann S., Grieco F., Guzzo J. & Spano G. Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010. 5:327-334.
12. Costello P.J., Francis I.L. and Bartowsky E.J. Variations in the effect of malolactic fermentation on the chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine: interactive influences of *Oenococcus oeni* strain and wine matrix composition. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2012. 18:287-301.
13. Bartowsky E.J. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation — moving into the molecular arena. *Aust J. Grape Wine Res.*, 2005. 11:174-187.
14. Miller B.J., Franz C. M. A. P., Cho G.-S., du Toit M. Expression of the malolactic enzyme gene (mle) from *Lactobacillus plantarum* under winemaking conditions. *Curr. Microbiol.* 2011. Vol. 62. № 6. pp. 1682-1688. doi:10.1007/s00284-011-9914-4.
15. Konings W.N. The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 2002. 82:3-27.
16. Lafon-Lafourcade S. Proprieties de l'enzyme malygue des bacteurs lactiques isolees de vins. *Conn. Vigne Vin.* 1970. № 3. pp. 273-282.
17. Танащук Т.Н. Выделение и характеристика молочнокислых бактерий виноделия. "Магарач". Виноградарство и виноделие. 2018. № 3(105). С. 84-86.
Tanashchuk T.N. Isolation and performance profile of lactic acid bacteria in winemaking. *Magarach. Viticulture and winemaking*. 2018. № 3(105). pp. 84-86 (in Russian).
18. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* 1960. Vol. 23. № 1. pp. 130-135.
19. Работнова И.Л. Культивирование микроорганизмов. Промышленная микробиология/ Под общ. ред. Н.С.Егорова. Москва: Высшая школа, 1989. С.130-131.
Robotnova I.L. Cultivation of microorganisms. Industrial microbiology / Edited by N.S. Yegorov. Moscow: *Higher School*, 1989. pp. 130-131. (in Russian)

20. Гержилова В.Г. Методы технокимического контроля в виноделии / Под ред. В.Г. Гержиковой. Симферополь: Таврида, 2009. 304 с.
Gerzhikova V.G. Methods of technochemical control in winemaking / Edited by V.G. Gerzhikova. Simferopol: Tavrída Publ., 2009. 304 p. (in Russian).
21. Булатов М.И. Расчеты равновесий в аналитической химии. Москва: Химия. 1984. 184 с.
Bulatov M.I. Calculation of equilibriums in analytical chemistry. Moscow: Chemistry. 1984. 184 p. (in Russian).
22. Тессман А.Б., Иванов А.В. Программа «Acid-base Calculator» для расчета кислотно-основных равновесий в водных растворах // Вестник Московского университета. – 2001. Серия 2. Химия. Т. 42. №1. С. 19–22.
Tessman A.B., Ivanov A.V. The program "Acid-base Calculator" for calculation of acid-base equilibriums. Reporter of Moscow University. 2001. Series 2. Chemistry. Vol. 42. №1. pp.19-22 (in Russian).
23. Moreno J., Peinado R. Enological Chemistry. London: Academic Press. 2012. 442 p.
24. Lafon-Lafourcade S. Factors of the malo-lactic fermentation of wines / Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food // Eds. Carr J.G., Cutting C.V., Whiting G.C. London: Academic Press. 1975. pp. 43-53.
25. Gao C., Fleet G.H. The degradation of malic acid by high density cell suspensions of *Leuconostoc oenos*. J. Appl. Bacteriol. 1994. 76:632-637.
26. Carr F.J., Chill D., Maida N. The Lactic acid bacteria: a literature survey. Crit. Rev. Microbiol. 2002. Vol. 28. № 4. pp. 281-370. doi:10.1080/1040-840291046759.
27. Валидов Ш.З., Панькова Н.В., Козлова Е.В., Кузьмин Н.П., Клименко В.В., Боронин А.М. Схема быстрого выделения и идентификации *Lactobacillus plantarum* с использованием НП-ПЦР / Микробиология. – 1998. – Т.67. – №3. – С. 384-390.
Validov Sh.Z., Pan'kova N.V., Kozlova E.V., Kuzmin N.P., Klimenko V.V., Boronin A.M. A scheme for rapid isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* using RT-PCR. Microbiology. 1998. Vol. 67. №3. pp.384-390 (in Russian).
28. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: «Мир». 1984. 479 с.
Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning/ Moscow: Mir. 1984. 479 p.
29. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982. 545 p.

ORCID iD

Танашук Т.Н. <https://orcid.org/0000-0002-7847-1246>
Шаламитский М.Ю. <https://orcid.org/0000-0001-5888-6228>
Погорелов Д.Ю. <https://orcid.org/0000-0001-6388-9706>