

Влияние условий культивирования на активность роста природных штаммов молочнокислых бактерий виноделия

Татьяна Николаевна Танащук, канд. техн. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией микробиологии, magarach_microbiol.lab@mail.ru, тел. +79892405952, <https://orcid.org/0000-0002-7847-1246>;

Максим Юрьевич Шаламитский, мл. науч. сотр. лаборатории микробиологии, mshalamitskiy@yahoo.com; +79780226148, <https://orcid.org/0000-0001-5888-6228>

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

Характеристика ростовой активности молочнокислых бактерий (МКБ) виноделия является одним из основных критериев отбора штамма при проведении селекционных работ на лабораторном этапе определения условий его культивирования и сохранения. В работе представлены результаты изучения влияния температуры, pH среды культивирования и ее состава на ростовую активность штаммов МКБ виноделия родов *Oenococcus* (9 штаммов) и *Lactobacillus* (6 штаммов) с высокой декарбоксилирующей активностью. При проведении работ использовали методы и подходы, общепринятые при изучении микроорганизмов виноделия. Ростовую активность штаммов оценивали нефелометрическим методом по количеству биомассы, накопленной в процессе культивирования штаммов в различных условиях. Анализ полученных результатов, представленных в статье, позволил рекомендовать оптимальные значения pH и температуры для культивирования штаммов МКБ виноделия родов *Lactobacillus* и *Oenococcus* на стандартной среде MRS, а также целесообразность снижения pH среды при помощи яблочной кислоты для увеличения скорости размножения клеток. Изучение влияния таких компонентов среды, как глюкоза, пептон, Твин-80, гидроортофосфат калия, яблочная кислота на ростовую активность штаммов МКБ показало, что наиболее значимыми факторами, влияющими на их рост, являются глюкоза и яблочная кислота. Влияние каждого фактора или их совокупности на ростовую активность МКБ может избирательно зависеть от культивируемого штамма, что подтверждает данные о генетическом разнообразии микроорганизмов данной группы и необходимости индивидуального подхода к выбору условий их культивирования.

Ключевые слова: питательная среда; биомасса; pH среды; температура культивирования; яблочная кислота.

Введение. Организация любого микробиологического процесса, направленного на отбор штаммов с практически важными свойствами, начинается с изучения физиологии продуцента. Основой изучения

Как цитировать эту статью:

Танащук Т.Н., Шаламитский М.Ю. Влияние условий культивирования на активность роста природных штаммов молочнокислых бактерий виноделия // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2020; 22(3); С.266-271. DOI 10.35547/IM.2020.22.3.016

How to cite this article:

Tanashchuk T.N., Shalamitskiy M.Yu. Influence of cultivation conditions on the growth activity of natural strains of lactic acid bacteria in winemaking. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2020; 22(3):266-271. DOI 10.35547/IM.2020.22.3.016

УДК 663.252.4:579.863/864:577.15

Поступила 09.06.2020

Принята к публикации 01.09.2020

© Авторы

ORIGINAL RESEARCH

Influence of cultivation conditions on the growth activity of natural strains of lactic acid bacteria in winemaking

Tatiana Nikolaievna Tanashchuk, Maksim Yurievich Shalamitskiy

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

The characteristic of the growth activity of lactic acid bacteria (LAB) in winemaking is one of the main criteria of selecting a strain during the breeding work at the laboratory stage of determining the conditions for its cultivation and preservation. The article presents the results of study the effect of temperature, pH of the cultivation medium and its composition on the growth activity of winemaking LAB strains of the genera *Oenococcus* (9 strains) and *Lactobacillus* (6 strains) with high decarboxylating activity. In the working process we used methods and approaches generally accepted in the study of microorganisms in winemaking. Growth activity of strains was assessed by nephelometric method according to the amount of biomass accumulated in the process of cultivation strains under various conditions. The analysis of the results, presented in the article, made it possible to recommend the optimal pH and temperature values for the cultivation of LAB strains *Lactobacillus* and *Oenococcus* on a standard MRS medium, as well as the viability of decreasing the pH of the medium using malic acid to increase the speed of cell reproduction. Study of the influence of such environmental components as glucose, peptone, Tween-80, dipotassium hydrogenphosphate, malic acid on the growth activity of LAB strains showed that the most significant factors affecting growth are glucose and malic acid. Influence of each factor or their combination on the growth activity of LAB can selectively depend on the cultivated strain, confirming data of microorganism genetic diversity of the group and the necessity of an individual approach to the selection of cultivation conditions.

Key words: nutrient medium; biomass; pH of the medium; cultivation temperature; malic acid.

характера питания продуцента и влияния внешних факторов на состояние клеток является оптимизация процесса культивирования микроорганизмов в контролируемых и управляемых условиях. В современном виноделии особая роль отводится проведению индуцированного яблочно-молочного брожения (ЯМБ) с применением чистых культур молочнокислых бактерий (МКБ), принадлежащих к родам *Oenococcus* и *Lactobacillus* [1-3]. Надежность проведения такого процесса напрямую зависит от применяемых штаммов с высокой декарбоксилирующей активностью. Также одним из основных требований, предъявляемых к промышленным штаммам МКБ – кислотопонижателям, является их высокая физиологическая активность на этапе проведения ЯМБ, начало которого отмечается при численности популяции молочнокислых бактерий 10^6 - 10^8 клеток/см³ [4-6]. Очевидно, что ростовые характеристики играют одну из центральных ролей в определении места и роли МКБ в естественной среде обитания и определяют стратегию регулирования промыш-

ленных процессов с их участием.

Характеристика ростовой активности МКБ виноделия является одним из основных критериев отбора штамма при проведении селекционных работ на лабораторном этапе определения условий его культивирования и сохранения. При этом среди наиболее важных внешних факторов, которые могут оказывать существенное влияние на скорость роста клеток и процессов ферментации, общепринято считать температуру культивирования и рН среды культивирования. Получение активных накопительных культур МКБ с большой биомассой также во многом зависит от правильного выбора питательной среды культивирования с учетом специфических требований этих медленно растущих микроорганизмов к питательным веществам.

Цель исследований – изучение влияния температуры, рН среды культивирования и ее состава на ростовую активность (накопление биомассы) штаммов МКБ с высокой декарбоксилирующей активностью.

Объекты и методы исследований. В опытах использовали природные штаммы молочнокислых бактерий родов *Oenococcus* и *Lactobacillus* из рабочей коллекции отдела микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» [7], обладающих высокой декарбоксили-

рующей активностью [8]. При отборе штаммов рода *Lactobacillus* предпочтение отдавали гомоферментативным палочкам. Характеристика штаммов МКБ представлена в таблице.

В качестве сред культивирования использовали жидкую не селективную синтетическую среду MRS [9] и опытную среду следующего состава (г/дм³): глюкоза – 20, пептон – 10, Твин 80 – 1,0, гидроортофосфат калия (K₂HPO₄) – 2,0.

Исследования проводили с 24-часовыми (*Lactobacillus*) и 48-72-часовыми культурами (*Oenococcus*), предварительно пересеянными не менее 3 раз на среду MRS (рН 4,5, корректировка HCl). Посевы инкубировали при температуре 26±0,5°C, перемешивая 3 раза в сутки. Накопительные культуры брали в работу при достижении оптической плотности клеточной суспензии 0,9-1,0 при длине волны 590, что соответствует 10⁸–10⁹ клеток/см³ среды. Засевной материал вносили в количестве 2 % по объему.

Накопление биомассы штаммами оценивали нефелометрическим методом. Количественно накопленную биомассу определяли по калибровочным кривым зависимости оптической плотности бактериальной суспензии от сухого веса (с.в.) клеток, построенных для палочковидной и кокковой форм бактерий [8].

Таблица. Характеристика природных штаммов МКБ

Table. Characteristics of natural LAB strains

№ штамма	Морфологическая характеристика	% потребления L-яблочной кислоты через 4 и 20 ч	Образование газа из глюкозы	Источник выделения
<i>Под Oenococcus</i>				
К.1	кокки сферической формы, размер 0,5 мкм, образуют пары и цепочки по 4–8 клеток, хлопьевидные скопления клеток	55,0/82,5	+	виноградное сусло
К.3	кокки сферической и яйцевидной форм, размер 0,6 мкм, образуют длинные цепочки	63,8/91,3	+	виноградное сусло
К.4	кокки сферической формы, размер 0,5 мкм, образуют в основном пары	75,0/95,0	+	виноматериал
К.6	кокки сферической формы, размер 0,5 мкм, образуют в основном в пары, встречаются цепочки по 4–8 клеток	67,5/87,5	+	виноматериал
К.17	кокки сферической и яйцевидной формы, размер 0,6 мкм, образуют длинные цепочки	67,5/87,5	+	виноградное сусло
К.19	кокки сферической формы, размер 0,5 мкм, образуют в основном в пары, встречаются цепочки по 4–8 клеток	67,5/91,3	+	виноматериал
К.21	кокки сферической и яйцевидной формы, размер 0,6 мкм, образуют пары, встречаются цепочки по 4–8 клеток	52,5/91,3	+	виноматериал
К.25	кокки сферические, размер 0,6 мкм, образуют пары, цепочки по 4–8–12 клеток	47,5/83,8	+	виноградное сусло
К.48	кокки сферические, размер 0,5 мкм, образуют в основном пары, встречаются цепочки по 4 клетки	47,5/87,5	+	виноградное сусло
<i>Под Lactobacillus</i>				
П.4	палочки, размер 0,5x1,9 мкм, образуют пары и короткие цепочки по 4–8 клеток, встречаются длинные нитевидные	63,8/87,5	–	виноградное сусло
П.10	палочки, размер 0,8x1,3 мкм, образуют пары и короткие цепочки 4–6 клеток	78,8/78,8	–	виноградное сусло
П.14	палочки, размер 0,5x0,8 мкм, образуют пары и короткие цепочки по 4 клетки	47,5/87,5	–	виноградное сусло
П.37	палочки, размер 0,7x2,6 мкм, образуют пары и цепочки по 4 клетки	63,8/87,5	+	виноградное сусло
П.45	палочки, размер 0,5x1,9 мкм, образуют пары и короткие цепочки по 4–8 клеток, встречаются длинные нитевидные	63,8/78,8	–	виноматериал
П.46	палочки, размер 0,7x2,2 мкм, образуют пары и цепочки по 4–8 клеток	71,3/78,8	–	виноматериал

Примечание: «+» – наличие признака (гетероферментативный характер брожения); «–» – отсутствие признака (гомоферментативный характер брожения)

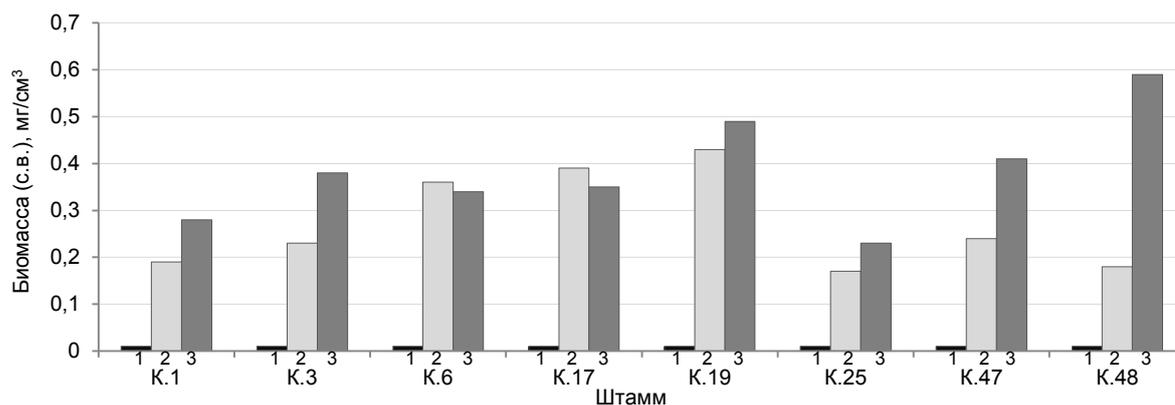


Рис. 1. Влияние pH среды культивирования на рост штаммов МКБ рода *Oenococcus*, 1 – pH 6,6, 2 – pH 4,5 (доведение соляной кислотой), 3 – pH 4,5 (доведение яблочной кислотой)

Figure 1. The effect of pH medium on the growth of *Oenococcus* LAB strains, 1– pH 6.6, 2 – pH 4.5 (hydrochloric acid adjusting), 3 – pH 4.5 (malic acid adjusting)

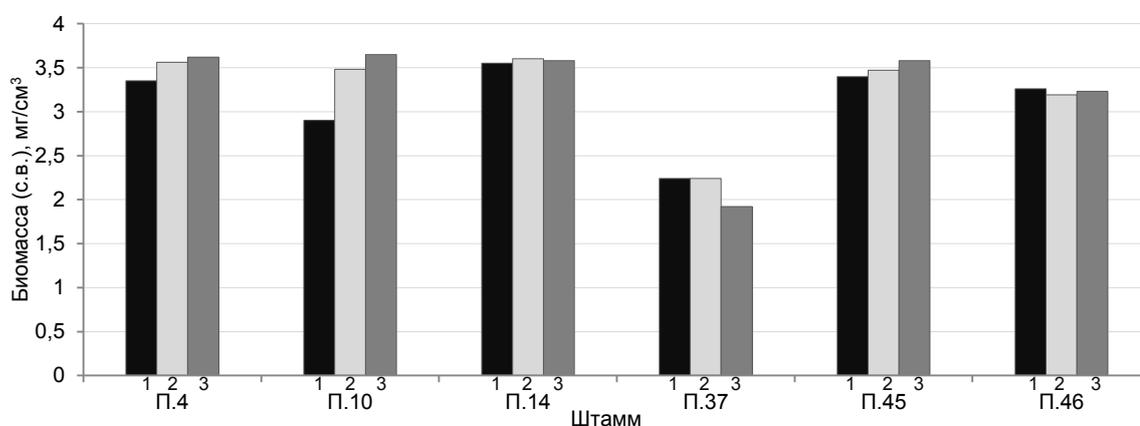


Рис. 2. Влияние pH среды культивирования на рост штаммов МКБ рода *Lactobacillus*, 1 – pH 6,6, 2 – pH 4,5 (доведение соляной кислотой), 3 – pH 4,5 (доведение яблочной кислотой)

Figure 2. The effect of pH medium on the growth of *Lactobacillus* LAB strains, 1– pH 6.6, 2 – pH 4.5 (hydrochloric acid adjusting), 3 – pH 4.5 (malic acid adjusting)

При исследовании влияния pH среды на ростовую активность штаммов культивирование проводили на жидкой среде MRS при pH 6,6 (исходное значение стандартной среды) и 4,5. Корректировку pH среды до значения 4,5 проводили соляной кислотой (HCl) в соответствии с ГОСТ ISO 11133 или добавлением синтетической DL-яблочной кислоты (Sigma-Aldrich). Посевы инкубировали при температуре $26 \pm 0,5$ °C.

При исследовании влияния температуры на ростовую активность штаммов культивирование проводили на жидкой среде MRS при pH 4,5 (корректировка HCl) при температурах в диапазоне 20 – 30 °C.

Влияние состава среды культивирования на рост МКБ изучали методом математического планирования эксперимента по схеме ДФЭ 2^{5-3} . При культивировании штаммов контролем служила опытная питательная среда. Значение pH среды корректировали до 4,5 раствором HCl. Для изучения влияния яблочной кислоты добавляли ее в среду в количестве 5,0 г/дм³. Значимость исследуемых компонентов определяли по количеству накопленной биомассы. Степень зависимости роста культур от эффекта воздействия компонента в среде оценивалась по критерию Стьюдента [10].

Все эксперименты проводили в трех повторностях, результаты представлены средними арифметиче-

скими величинами, отклонения от среднего значения не превышало 5 %.

Обсуждение результатов. Анализ литературных данных о применяемых питательных средах для культивирования и хранения штаммов МКБ позволил нам остановиться на среде MRS (pH 6,6). Ее использование принято в качестве универсальной культуральной среды для поддержания различных МКБ, а также в качестве основы для проведения биохимических тестов и генетических исследований этой группы микроорганизмов [11-14]. Большинство МКБ являются кислотоустойчивыми, но имеют разные оптимальные значения pH [13, 15, 16]. Рекомендуемое значение pH большинства культуральных сред для роста МКБ находится в диапазоне 5,5-6,6 [9, 13, 17, 18]. При этом штаммы МКБ, выделенные из вин, могут иметь более низкий оптимальный pH роста, в связи с чем некоторые авторы рекомендуют использовать среды с начальным pH 4,5 - 4,8 [13, 17, 19, 20].

Культивирование исследуемых штаммов на среде MRS показало (рис. 1, 2), что штаммы рода *Lactobacillus* активно размножались как при pH 6,6 так и при pH 4,5. Для трех штаммов (П.4, П.10, П.14) при pH 4,5 увеличение биомассы составило от 2 до 25 % по сравнению с ростом при pH 6,6 в зависимости от

штамма. Сравнительная оценка роста при pH 4,5 показала, что наличие яблочной кислоты незначительно способствовало усилению клеточного роста (2-5%). Для штаммов П.14, П.37, П.46 отмечена сравнительно одинаковая динамика роста на всех средах.

Штаммы рода *Oenococcus* не размножались при pH 6,6. Сравнительный анализ роста кокков при pH 4,5 показал, что для пяти штаммов (К.1, К.3, К.25, К.47, К.48) наличие яблочной кислоты в среде способствовало увеличению биомассы от 35 до 220 % в зависимости от штамма. Для трех штаммов (К.6, К.17, К.19) влияние яблочной кислоты на усиление ростовой активности не отмечено.

Полученные данные позволяют рекомендовать снижение pH среды MRS до значения 4,5 при культивировании МКБ родов *Lactobacillus* и *Oenococcus*, выделенных из винодельческих сред. Также следует отметить целесообразность снижения pH среды при помощи яблочной кислоты как стимулирующего фактора роста. Использование яблочной кислоты для снижения pH среды культивирования штаммов кислотопонижателей, вероятно, будет оказывать влияние на сохранение активности внутриклеточного фермента малатдекарбоксилазы, которая по данным С. Лафон-Лафуркад может зависеть от штамма и используемого способа подготовки стартовой культуры [21].

Выбор оптимальной температуры для культивирования штаммов МКБ в лабораторных условиях проводили в диапазоне температур от 20 до 30°C. Данный диапазон считается оптимальным для получения накопительных культур МКБ, выделенных из вина [4, 22, 23]. При введении штамма в культуру в основном проводят культивирование при температуре 30°C [20, 24-27], в то же время для штаммов рода *Oenococcus* нередко используют температуру 25-26°C [1, 28-30]. Оценка ростовой активности штаммов при температурах 20-30 °C показала, что при 26-30 °C все они

характеризовались сравнительно близкими кривыми роста, короткой лаг-фазой и большей скоростью накопления биомассы по сравнению с культивированием при более низких температурах. В данном диапазоне температур односуточные культуры МКБ рода *Lactobacillus* накапливали биомассу в пределах от 2,0 до 4,0 мг (сухой вес)/см³, трехсуточные культуры рода *Oenococcus* – от 0,1 до 0,6 мг (сухой вес)/см³. На основании полученных данных за оптимальную температуру культивирования лабораторных штаммов нами была выбрана температура 26 °C, поскольку при сравнительно одинаковой динамике роста повышение температуры может влиять на уменьшение числа живых клеток в накопительной культуре.

Исследование влияния состава среды культивирования на накопление штаммами МКБ клеточной биомассы является важным этапом при выборе условий сохранения его жизнеспособности. Известно, что поддержание штаммов МКБ может быть довольно сложным, так как они являются избирательными микроорганизмами по отношению к питательным веществам и могут легко терять свою активность и производственно-ценные свойства. По данным анализа состава питательных сред для культивирования МКБ, описанных в литературе, нами была приготовлена базовая среда, состоящая из четырех компонентов (факторов роста), присутствующих в большинстве синтетических сред – глюкозы, пептона, Твина-80, K₂HPO₄ [9, 13, 18, 19, 31]. Учитывая высокую вероятность яблочной кислоты влиять на физиологическую активность МКБ, мы так же ввели ее в состав среды. Всего было поставлено по 9 вариантов эксперимента для 6 штаммов – 3 штамма *Lactobacillus* (П.10, П.14, П.37) и 3 штамма *Leuconostoc* (К.1, К.6, К.48).

Анализ полученных данных (рис. 3, 4) показал, что отсутствие в опытной среде глюкозы оказывало сильное ингибирующее влияние на рост штаммов

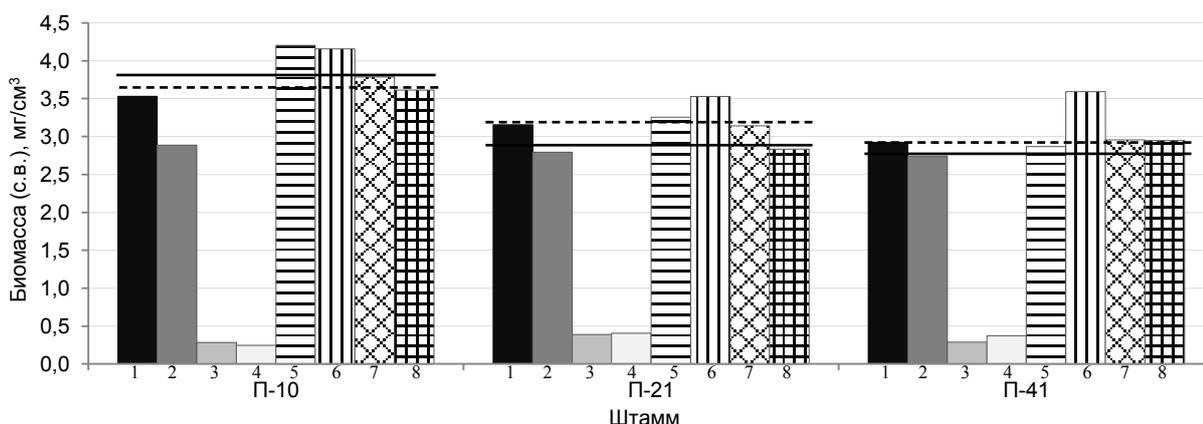


Рис. 3 Накопление биомассы МКБ рода *Lactobacillus* при изменении состава среды: 1) сплошная горизонтальная линия – накопление биомассы штаммом на опытной среде (доведение pH до 4,5 яблочной кислотой); пунктирная горизонтальная линия – накопление биомассы штаммом на полной среде (доведение pH до 4,5 соляной кислотой); 2) 1, 2 – в среде отсутствует пептон, 3, 4 – в среде отсутствует глюкоза, 5, 6 – в среде отсутствует K₂HPO₄, 7, 8 – в среде отсутствует Твин-80; 3) pH для позиций 1, 3, 5, 7 доводился соляной кислотой, для позиций 2, 4, 6, 8 – яблочной кислотой

Figure 3. Accumulation of *Lactobacillus* LAB biomass when the composition of the medium changes: 1) solid horizontal line – biomass accumulation with strain in experimental medium (adjusting the pH to 4.5 with malic acid); the dashed horizontal line – biomass accumulation with strain in complete medium (adjusting the pH to 4.5 with hydrochloric acid); 2) 1, 2 no peptone in the medium, 3, 4 – no glucose in the medium, 5, 6 no K₂HPO₄ in the medium, 7, 8 No Tween-80 in the medium; 3) pH for positions 1, 3, 5, 7 was adjusted with hydrochloric acid, for positions 2, 4, 6, 8 – with malic acid

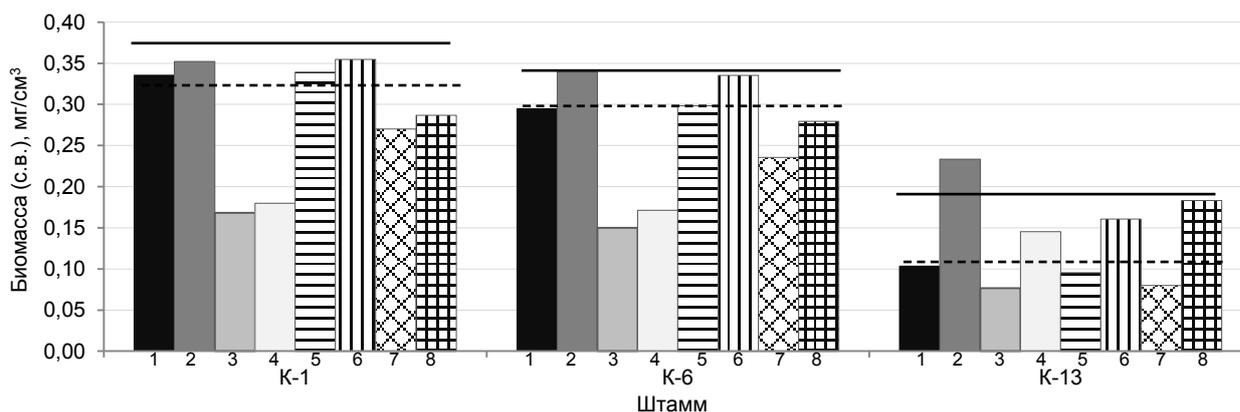


Рис. 4. Накопление биомассы МКБ рода *Leuconostoc* при изменении состава среды: 1) сплошная горизонтальная линия – накопление биомассы штаммом на опытной среде (доведение pH до 4.5 яблочной кислотой); пунктирная горизонтальная линия – накопление биомассы штаммом на полной среде (доведение pH до 4.5 соляной кислотой); 2) 1, 2 – в среде отсутствует пептон, 3, 4 – в среде отсутствует глюкоза, 5, 6 – в среде отсутствует K_2HPO_4 , 7, 8 – в среде отсутствует Твин-80; 3) pH для позиций 1, 3, 5, 7 доводился соляной кислотой, для позиций 2, 4, 6, 8 – яблочной кислотой

Figure 4. Accumulation of *Leuconostoc* LAB biomass when the composition of the medium changes: 1) solid horizontal line – biomass accumulation with strain in experimental medium (adjusting the pH to 4.5 with malic acid); the dashed horizontal line – biomass accumulation with strain in complete medium (adjusting the pH to 4.5 with hydrochloric acid); 2) 1, 2 no peptone in the medium, 3, 4 – no glucose in the medium, 5, 6 no K_2HPO_4 in the medium, 7, 8 No Tween-80 in the medium; 3) pH for positions 1, 3, 5, 7 was adjusted with hydrochloric acid, for positions 2, 4, 6, 8 – with malic acid

МКБ, особенно это влияние отмечено для МКБ палочковидной формы. Снижение ростовой активности наблюдали у бацилл – до 90 %, у кокков до 30-50 %. Внесение яблочной кислоты способствовало стимулированию роста всех штаммов.

Отсутствие пептона не оказывало значительного влияния на рост штаммов МКБ. Внесение яблочной кислоты в отсутствие пептона способствовало замедлению роста бацилл и стимулировало рост кокков.

Отсутствие Твина-80 в среде являлось значимым для штаммов кокковой формы и влияло на замедление их роста; для штаммов палочковидной формы данный фактор может быть значимым для отдельного штамма, стимулируя его рост. Внесение яблочной кислоты в отсутствие Твина-80 не оказывало существенного влияния на изменение роста бацилл, но стимулировало рост кокков.

Отсутствие K_2HPO_4 явилось незначимым для двух штаммов бацилл и одного штамма кокков, для остальных штаммов – рост усиливался. Внесение яблочной кислоты в отсутствие K_2HPO_4 стимулировало рост исследуемых штаммов МКБ.

Выводы. Проведенное исследование показало, что наиболее значимыми факторами роста для природных штаммов МКБ являются глюкоза и яблочная кислота. Внесение в культуральную среду яблочной кислоты явилось важным стимулирующим фактором для их размножения, что может служить тестом предварительной оценки их кислотопогибающей активности. Влияние каждого фактора или их совокупности на ростовую активность МКБ может избирательно зависеть от культивируемого штамма, что подтверждает данные о генетическом разнообразии микроорганизмов данной группы и необходимости индивидуально-го подхода к выбору условий их культивирования.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного за-

дания №0833-2019-0008.

Financing source

The work was conducted under public assignment № 0833-2019-0008.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы / References

- Bae S., Fleet G.H., Heard G.M. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.* 2006. Vol. 100. pp. 712-727.
- du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S. Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures – an Overview. *Food Bioprocess Tech.* 2011. Vol. 4. pp. 876-906.
- Lallemand. The Wine Expert – Practical Winemaking Information: Co-inoculation of Selected Wine Bacteria. 2013. <https://lallemandwine.com/wp-content/uploads/2013/07/WE4-Australia.pdf>
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications. 2-nd Edition. Chichester: *John Wiley & Sons.* 2006. Vol. 1. 497 p.
- Versari A., Parpinello G.P., Cattaneo M. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *Ind. Microbiol. Biot.* 1999. Vol. 23. pp. 447-455.
- Muñoz R., Moreno-Arribas M. V., de las Rivas B. Molecular Wine Microbiology, Chapter 8. Lactic Acid Bacteria. *Academic press.* 2011. 360 p.
- Танашчук Т.Н. Выделение и характеристика молочнокислых бактерий виноделия // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2018. № 3. С. 84-86. Tanashchuk T.N. Isolation and performance profile of lactic acid bacteria in winemaking. *Magarach. Viticulture and Winemaking*, 2018; No.3 (105). pp.84-86 (in Russian).
- Танашчук Т.Н., Шаламитский М.Ю., Погорелов Д.Ю. Оценка штаммов молочнокислых бактерий по способности ус-

- ваивать L-яблочную кислоту «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2019; 21(4). С. 328-332.
- 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; No. 21(4). pp.328-332 (in Russian).
9. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 1960. Vol. 23. No.1. pp. 130-135.
10. Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования // М.: Изд-во МГУ. 1969. С.128.
- Maksimov V.N., Fedorov V.D. The application of the methods of mathematical planning of the experiment in finding the optimal cultivation conditions. Moscow: *MSU*. 1969. 128 p. (in Russian).
11. Garvie E.I. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the *Leuconostocs* from other lactic acid bacteria. *Method Microbiol.* 1984. Vol. 16. pp. 147-177.
12. Holzapfel W.H. Culture media for non-sporulating gram-positive food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 1992. Vol. 17. pp. 113-133.
13. Carr F.J., Chill D., Maida N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002. Vol. 284. pp. 281-370.
14. Kandler O., Weiss N. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2*. Eds. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt. Baltimore: *Williams & Wilkins*. 1986. pp. 1208-1234.
15. Costantini A., García-Moruno E., Moreno-Arribas M.V. Biochemical Transformations Produced by Malolactic Fermentation. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Chapter 2. Berlin: *Springer Science+Business Media*. 2009. pp. 27-57.
16. Arena M.E., de Nadra M.C.M. Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Res. Microbiol.* 2005. Vol. 156. pp. 858-864.
17. Квасников Е.И. Биология молочнокислых бактерий. Изд-во АН УзССР. 1960. 351 с.
- Kvasnikov E.I. Biology of lactic acid bacteria. *Science Academy UzSSR*, 1960. 351 p. (in Russian).
18. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М.: Наука. 1975. 389 с.
- Kvasnikov E.I., Nesterenko O.A. Lactic acid bacteria and ways to use them. Moscow: *Science*. 1975. 389 p. (in Russian).
19. International Organisation of Vine and Wine. *International oenological codex*. 2019. 815 p.
20. Vendrame M., Iacumin L., Manzano M., Comi G. Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Oenococcus oeni* in must and wine by quantitative PCR. *Food Microbiol.* 2013. Vol. 35. pp. 49-57.
21. Lafon-Lafourcade S. Proprietes de l'enzyme malygue des bacteurs lactiques isolees de vins. *Conn. Vigne Vin*. 1970. Vol. 3. pp. 273-282.
22. van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D., Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Anton Leeuw*. 2002. Vol. 82. pp. 187-216.
23. Guzzo J., Desroche N. Physical and Chemical Stress Factors in Lactic Acid Bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Part III Secondary Metabolism*. Berlin: *Springer-Verlag*. 2009. 710 p.
24. Kawarai T., Furukawa S., Ogihara H., Yamasaki M. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. Vol. 73. pp. 4673-4676.
25. Petri A., Pfannebecker J., Fröhlich J., König H. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiol.* 2013. Vol. 33. pp. 48-54.
26. Chen Y.-S., Yanagida F., Shinohara T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Let. Appl. Microbiol.* 2005. Vol. 40. pp. 195-200.
27. Papamanoli E., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Kotzekidou P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 2003. Vol. 65. pp. 859-867.
28. Matthews A., Grbin P.R., Jiranek V. Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 2007. Vol. 77. pp. 329-337.
29. Bae S., Fleet G.H., Heard G.M. Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 2004. Vol. 94. pp. 301-312.
30. Bauer R., Dicks L.M.T. Control of malolactic fermentation in wine. A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2004. Vol. 25. No. 2. pp.74-88.
31. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия // Симферополь: Таврида. 2003. 560 с.
- Buryan N.I. Practical Microbiology of Winemaking. Simferopol: *Tavrida*. 2003. 560 p. (in Russian).