

Скрининг природных штаммов молочнокислых бактерий вина по устойчивости к рН, температуре и спирту

Танащук Т.Н.[✉], Шаламитский М.Ю., Загоруйко В.И.

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

[✉]magarach_microbiol.lab@mail.ru

Аннотация. Оценка устойчивости штаммов молочнокислых бактерий к стрессовым условиям производства является важным этапом селекционных работ и способствует расширению выбора штаммов-кислотопонижателей по возможности их применения в зависимости от конкретных условий прохождения яблочно-молочного брожения. В работе представлены результаты скрининга 27 природных штаммов молочнокислых бактерий вина, принадлежащих к видам *Oenococcus oeni*, *Lactocaseibacillus paracasei* и *Lentilactobacillus hilgardii*, по активности потребления яблочной кислоты при низких значениях рН и устойчивости к технологически значимым стрессовым факторам виноделия – рН, температуре, спирту. Изучение декарбоксилирующей способности молочнокислых бактерий позволило отобрать 13 штаммов, сохранивших способность сбрасывать яблочную кислоту при значении рН 3,2 и показало, что снижение рН среды культивирования в разной степени в зависимости от штамма влияло на ослабление активности штаммов сбрасывать яблочную кислоту. Понижение температуры, рН и наличие спирта в среде культивирования в целом влияло на снижение активности роста всех штаммов, однако штаммы обладали разной устойчивостью к воздействию этих факторов. Наиболее значимыми факторами отмечены рН и спирт, по сравнению с которыми температура оказывала меньшее влияние на рост штаммов. Исследование показало, что влияние каждого фактора или их совокупности на ростовую активность МКБ может избирательно зависеть от культивируемого штамма, что подтверждает многочисленные данные о генетическом разнообразии микроорганизмов данной группы и необходимости индивидуального подхода к выбору условий их культивирования. Для дальнейшей селекции отобраны пять штаммов *O. oeni*, три штамма *L. paracasei* и штамм *L. hilgardii*, показавшие лучшую устойчивость к стрессовым факторам по сравнению с другими штаммами.

Ключевые слова: активность роста; молочнокислые бактерии; *O. oeni*, *L. paracasei*; *L. hilgardii*; декарбоксилирующая активность; L-яблочная кислота.

Для цитирования: Танащук Т.Н., Шаламитский М.Ю., Загоруйко В.И. Скрининг природных штаммов молочнокислых бактерий вина по устойчивости к рН, температуре и спирту // «Магарач». Виноградарство и виноделие, 2022;24(1):55-62. DOI 10.35547/IM.2022.86.57.009

Screening of original strains of lactic acid bacteria in wine by resistance to pH, temperature and alcohol

Tanashchuk T.N.[✉], Shalamitskiy M.Yu., Zagoruiko V.I.

All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, 31 Kirova Str., 298600 Yalta, Republic of Crimea, Russia

[✉]magarach_microbiol.lab@mail.ru

Abstract. Evaluation of resistance of lactic acid bacteria strains to stressful production conditions is an important stage of selection work. It contributes to raising options of acidity-reducing strains by potential for use, depending on the specific conditions of passing malolactic fermentation. The paper presents the results of screening of 27 original strains of wine lactic acid bacteria, which belong to the species *Oenococcus oeni*, *Lactocaseibacillus paracasei* and *Lentilactobacillus hilgardii*, according to the activity of malic acid consumption at low pH values and resistance to technologically significant winemaking stress factors - pH, temperature, alcohol. The study of the decarboxylating ability of lactic acid bacteria made it possible to select 13 strains that preserve the ability to ferment malic acid at pH 3.2 and showed that a decrease in pH of the cultivating medium to a different extent, depending on the strain, impacted the reducing of strain activity to ferment malic acid. A decrease in temperature, pH and alcohol presence in the cultivation medium generally impacted the decrease in the growth activity of all strains, however, the strains had different resistance degree to these factors. The most significant factors were pH and alcohol, in comparison with which, temperature had a lower effect on the growth of strains. The study showed that the effect of each factor or their combination on the growth activity of LAB can selectively depend on the cultivated strain, which confirms numerous data on the genetic diversity of microorganisms in this group and the need for an individual approach to select the conditions for their cultivation. Five strains of *O. oeni*, three strains of *L. paracasei* and a strain of *L. hilgardii*, which showed better resistance to stress factors compared to other strains, were collected for further selection.

Key words: growth activity; lactic acid bacteria; *O. oeni*; *L. paracasei*; *L. hilgardii*; decarboxylating activity; L-malic acid.

For citation: Tanashchuk T.N., Shalamitskiy M.Yu., Zagoruiko V.I. Screening of original strains of lactic acid bacteria in wine by resistance to pH, temperature and alcohol. Magarach. Viticulture and Winemaking, 2022; 24(1):55-62 (in Russian). DOI 10.35547/IM.2022.86.57.009

Введение

В современном мировом виноделии особая роль отводится проведению индуцированного яблочно-молочного брожения (ЯМБ) с применением чистых культур молочнокислых бактерий (МКБ). Надежность проведения такого процесса напрямую зависит от применяемых штаммов, основным критерием отбора которых является их высокая ростовая и декарбоксилирующая активность, что в контролируемых условиях прохождения ЯМБ способствует повышению биологической стабильности вина и улучшению органолептических показателей столовых вин. Роль молочнокислых бактерий в последние годы повысилась в результате тенденций к уменьшению использования SO_2 и потребительских предпочтений винам с меньшей кислотностью, в особенности для вин, производимых в рамках органического виноделия и в регионах с прохладным климатом. Считается, что наиболее перспективными для проведения биологического раскисления вин являются МКБ вида *O. oeni*, которые по сравнению с другими видами более всего толерантны к низким значениям pH и присутствию спирта в винной среде [1-5]. Это подтверждается исследованиями биоразнообразия МКБ, которые показывают, что штаммы данного вида являются преобладающими при спонтанной яблочно-молочной ферментации высококислотного сусла [6-9], поскольку вина ниже pH 3,5 не способствуют росту *Lactobacillus spp.* и *Pediococcus spp.* [10]. Однако опыт применения промышленных препаратов МКБ в виноделии показал необходимость пополнения базы стартовых культур, в том числе включающей штаммы, принадлежащие к роду *Lactobacillus* [11-13].

Поиск и селекция перспективных для виноделия штаммов МКБ-кислотопонижателей является довольно сложной и многогранной задачей, поскольку представители данной группы характеризуются большим штаммовым разнообразием, физиолого-биохимическими свойствами и высокой избирательностью к питательным веществам [4, 13-15]. Успешное осуществление процесса ЯМБ также напрямую зависит от конкретного штамма и его быстрой адаптации к специфическим винодельческим условиям, которые во многом определяют видовое разнообразие бактерий, их жизнеспособность и активность роста, скорость разложения яблочной кислоты и особенности метаболизма [1, 16, 17]. В сложных условиях виноделия высокая концентрация спирта, наличие SO_2 , низкий уровень питательных веществ, высокая кислотность и низкая температура может ослабить или подавить активность МКБ [18, 19]. Поэтому оценка устойчивости штаммов к стрессовым условиям производства является важным этапом селекционных работ и способствует расширению выбора штаммов-кислотопонижателей по возможности их применения в зависимости от конкретных условий прохождения ЯМБ.

Цель исследований: провести скрининг природных штаммов МКБ-кислотопонижателей по устойчивости к технологически значимым стрессовым факторам виноделия – pH, температуре, спирту.

Объекты и методы исследований

Штаммы МКБ и подготовка накопительных культур. Всего было изучено 27 штаммов МКБ родов *Oenococcus* и *Lactobacillus* из рабочей коллекции лаборатории микробиологии института «Магарач», выделенные из винограда и вин Крыма в 2018-2019 гг. [20-22]. Для культивирования МКБ использовали синтетическую среду MRS [23] и виноградное сусло, разведенное водой до содержания сахаров 50 г/л с добавлением 1% дрожжевого автолизата [24]. Корректировку pH сред проводили добавлением DL-яблочной кислоты (Sigma-Aldrich) и концентрированной соляной кислотой (HCl). Накопительные культуры получали при культивировании на средах при значении pH 4,5 и температуре $(28 \pm 0,5)^\circ C$ с использованием технологии Aquilla CGQ, основанной на наблюдении за ростом микроорганизмов в реальном времени [25]. Для засева культуру отбирали на этапе перехода в стационарную фазу роста. Рост культуры определяли с помощью измерения оптической плотности суспензии на фотоэлектрориметре КФК-3 в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 590 нм.

Идентификация изолятов МКБ. Предварительно проводили чистку штаммов путем рассева накопительных культур на плотную среду MRS (pH 4,5) с последующим оттиванием двадцати изолированных колоний на жидкую среду MRS (pH 4,5). Отбитые колонии культивировали при температуре $(28 \pm 0,5)^\circ C$, ежедневно визуально оценивая активность роста по помутнению среды культивирования. Для дальнейшей работы отбирали однородные по морфологической картине культуры, активно накапливающие биомассу ($D_{590} > 0,8$) в течение 1–3 сут. ДНК выделяли (LiOAc)-SDS методом [26, 27]. Для амплификации гена 16s рДНК использовали пару праймеров BSF8/27 – BSR1541/20 [28]. ПЦР проводили в 25 мкл буфера, содержащего 1,5 mM $MgCl_2$, 2,5 mM каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2,5 единицы Taq-полимеразы («Синтол», Россия) и 20–30 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при $94^\circ C$ в течение 5 мин., затем 30 циклов в следующем режиме: денатурация при $94^\circ C$ – 60 с, отжиг праймеров при $55^\circ C$ – 60 с, синтез ДНК при $72^\circ C$ – 90 с; конечная достройка при $72^\circ C$ – 7 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 1,0 TAE буфере (40 mM трис, 1 mM ЭДТА, 30 mM уксусная кислота, pH 8,4) в течение 2–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде. В качестве маркера молекулярных весов использовали 1 kb DNA Ladder («Fermentas», Литва). Амплифицированные фрагменты генов 16S элюировали из геля с помощью набора ColGen («Синтол», Россия) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Секвенирование полученных фрагментов 16S рДНК проводили по методу Сенгера [29] на автоматическом секвенаторе «Applied Biosystems 3130» (Applied Biosystems, Inc., США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программы SeqMan package (DNA Star Inc., США). Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рДНК изучаемых

штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST [30].

Способность штаммов молочнокислых бактерий усваивать яблочную кислоту оценивали по яблочно-молочной активности не размножающихся делением клеток [31, 32]. Штаммы культивировали в разведенном виноградном сусле (рН 4,5 и рН 3,0) при температуре (28±0,5)°С.

Исследование активности роста штаммов МКБ. Штаммы культивировали в разведенном виноградном сусле при значениях рН 3,4 и 3,0 и температуре 14 °С, 18 °С, 28 °С. При исследовании влияния спирта на активность роста штаммов в среду вносили 96%-ный этиловый спирт до объемной доли спирта в среде культивирования 12 %, 14 % и 16 %. Среды разливали в стеклянные микробиологические пробирки под ватно-марлевыми пробками по 7 мл и вносили по 2 % (D₅₉₀=0,9-1,0) накопительной культуры. Пробирки с посевами перемешивали несколько раз в сутки. Штаммы вида *O. oeni* культивировали в течение семи суток, штаммы видов *L. paracasei* и *L. hilgardii* – в течение четырех суток. При значениях D₅₉₀ > 0,500 активность роста оценивали как высокую; от 0,500 до 0,300 – как среднюю; менее 0,299 – как слабую. Отсутствие роста определяли при сравнении с оптической плотностью среды сразу после внесения накопительной культуры.

Математическая обработка данных. Математическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistic v.17.0 (IBM, США). Устойчивость штаммов МКБ к изменению условий культивирования оценивали по линейному коэффициенту корреляции Пирсона. За критерий значимости отличий между группами данных принимали критерий вероятности P < 0,10.

Результаты и их обсуждение

Генетическая идентификация изолятов МКБ. Для эксперимента нами были отобраны 27 перспективных штаммов МКБ, которые по результатам исследований 2018-2020 гг. характеризовались высокой скоростью накопления биомассы и способностью потребления L-яблочной кислоты в оптимальных условиях культивирования [21]. Генетические исследования видовой принадлежности и чистоты штаммов позволили отобрать 21 штамм (чистые линии), относящиеся к видам *O. oeni* (9 штаммов), *L. paracasei* (7 штаммов) и *L. hilgardii* (5 штаммов). Показательно, что все штаммы *O. oeni* и *L. paracasei* были выделены при прохождении спонтанного МКБ, а все штаммы *L. hilgardii* – из виноматериалов на хранении.

Скрининг штаммов МКБ по активности потребления яблочной кислоты при низких значениях рН. При выборе штаммов для проведения ЯМБ основным критерием является высокая активность сбраживания яблочной кислоты при низких значениях рН виноградного сусла. Исследование декарбоксилирующей способности 21 штамма показало (табл. 1), что сниже-

Таблица 1. Характеристика природных штаммов МКБ
Table 1. Characteristics of natural LAB strains

Чистые линии штаммов МКБ	Источник выделения	Количество штаммов	Вид	Потребление L-яблочной кислоты, %	
				рН среды 4,5	рН среды 3,2
К.1-2, К.3-1, К.4-2, К.6-4, К.17-4, К.19-3, К.24-3, К.25-10, К.48-5	сусло на стадии ферментации, молодые необработанные виноматериалы	9	<i>O. oeni</i>	95,0 - 82,5	75,3 - 35,3
П.4, П.39-2, П.41-2	сусло на стадии ферментации,	3	<i>L. paracasei</i>	87,5	58,6 - 54,7
П.3-2, П.10-1, П.37-1	молодые необработанные виноматериалы	3	<i>L. paracasei</i>	87,5-34,9	не обнаружен
П.85-2	виноматериалы	1		не обнаружен	не обнаружен
П.83-1	обработанные виноматериалы и вина (инфицированные, больные)	1		48,0	19,2
П.28-3, П.31-1, П.61-4, П.64-4	виноматериалы и вина (инфицированные, больные)	4	<i>L. hilgardii</i>	не обнаружен	не обнаружен

ние рН среды культивирования в целом влияло на ослабление активности штаммов сбраживать яблочную кислоту. Однако, степень снижения данной активности зависела как от видовой принадлежности штаммов, так и являлась характеристикой штамма, что согласуется с данными других исследователей [33, 34]. Все штаммы вида *O. oeni* активно сбраживали яблочную кислоту, потребление которой в зависимости от штамма снизилась в более широком диапазоне от 35,3% до 75,3 % при значении рН 3,2 по сравнению со значением рН 4,5, при котором потребление яблочной кислоты составляло от 82,5 до 95,0 %. Из 12 штаммов МКБ палочковидной формы к кислотопонижателям отнесли 3 штамма вида *L. paracasei*, которые проявили эту способность при значении рН 3,2 в диапазоне от 54,7 % до 58,6 % и один штамм *L. hilgardii*, способствующий снижению яблочной кислоты на 19,2 % при значении рН 3,2.

На этом этапе нами были отобраны 13 штаммов, сохранивших способность сбраживать яблочную кислоту при значении рН 3,2.

Влияние рН, температуры и спирта на ростовую активность штаммов МКБ. Анализ данных, полученных в рамках данного исследования, показал, что снижение температуры, рН и наличие спирта в среде культивирования в целом влияло на снижение активности роста всех штаммов (табл. 2). При этом штаммы обладали разной устойчивостью к воздействию этих факторов (рис. 1-6). Наиболее значимыми факторами являлись рН и спирт, по сравнению с которыми температура оказывала меньшее влияние на рост штаммов (табл. 2). Выводы согласуются с многочисленными исследованиями по данной проблеме [16, 17, 35].

Активному развитию МКБ в вине для надежного и быстрого прохождения ЯМБ способствуют значения рН 3,5 и температура около 20 °С, а при значении рН 3,0 и температуры 15 °С рост остается возможным, но медленным [17, 36]. Наше исследование также показало, что культивирование штаммов при значении рН 3,0 и температуре 14 °С способствовало значительному замедлению их роста по сравнению с другими заданными условиями, при этом, снижение рН оказывало меньшее влияние на замедление роста

штаммов по сравнению с низкой температурой. При 14 °С ни один из исследованных штаммов не проявил высокую активность роста и у одного штамма *O. oeni* рост отсутствовал. Доля нестойких к низкой температуре штаммов при значении рН 3,0 составила 85%, при значении рН 3,4 – 62 % (табл. 2).

Повышение температуры до 18 °С и 28 °С значительно стимулировало рост штаммов, что было ожидаемо, поскольку эти температуры ближе к оптимальным температурам роста МКБ вина. При данных температурах накопление биомассы штаммами значительно активизировалось, а определяющее влияние на снижение активности роста штаммов оказало значение рН 3,0. Так, доля нестойких штаммов к температуре 18 °С составила: один штамм при рН 3,4 и 8 штаммов при рН 3,0; нестойкими к температуре 28 °С отмечены только 5 штаммов при значении рН 3,0 (табл. 2). Сравнительная оценка изменения активности роста при снижении рН показала, что штаммы *O. oeni* между собой имели больше отличий по устойчивости к рН, по сравнению с *L. paracasei*. При температуре 14 °С снижение активности роста штаммов *O. oeni* при снижении рН отмечено в диапазоне от 6 до 35 %, при 18 °С – от 39 до 83 %, при 28 °С – от 5 до 86 % в зависимости от штамма. Штаммы *L. paracasei* по устойчивости к рН были более

Таблица 2. Влияние рН, температуры и спирта на рост природных штаммов МКБ
Table 2. The effect of pH, temperature and alcohol on the growth of natural LAB strains

Факторы	рН 3,4			рН 3,0		
	D ₅₉₀	количество штаммов	активность роста	D ₅₉₀	количество штаммов	активность роста
Температура 14 °С	-	-	-	-	-	высокая
	0,441-0,315	5	средняя	0,319	1	средняя
	0,267-0,118	8	слабая	0,288-0,144	11	слабая
Температура 18 °С	-	-	нет роста	0,096	1	нет роста
	1,409-0,532	9	высокая	0,564	1	высокая
	0,399-0,347	3	средняя	0,488-0,302	4	средняя
Температура 28 °С	0,298	1	слабая	0,256-0,100	8	слабая
	-	-	нет роста	-	-	нет роста
	1,835-0,677	12	высокая	1,084-0,577	4	высокая
Температура 18 °С, спирт 12 % об.	0,377	1	средняя	0,481-0,320	4	средняя
	-	-	слабая	0,291-0,101	5	слабая
	-	-	нет роста	-	-	нет роста
Температура 18 °С, спирт 14 % об.	0,758-0,519	4	высокая	-	-	высокая
	0,423	1	средняя	0,363	2	средняя
	0,260-0,200	7	слабая	0,245-0,127	11	слабая
Температура 18 °С, спирт 16 % об.	0,080	1	нет роста	0,067	1	нет роста
	0,605	1	высокая	-	-	высокая
	0,464-0,334	4	средняя	0,322	1	средняя
Температура 28 °С, спирт 12 % об.	0,230-0,123	7	слабая	0,256-0,120	10	слабая
	0,067	1	нет роста	0,095	1	нет роста
	-	-	высокая	-	-	высокая
Температура 28 °С, спирт 14 % об.	0,412-0,340	2	средняя	-	-	средняя
	0,287-0,134	10	слабая	0,277-0,122	12	слабая
	0,090	1	нет роста	0,098	1	нет роста
Температура 28 °С, спирт 16 % об.	1,041-0,613	5	высокая	-	-	высокая
	-	-	средняя	0,344	2	средняя
	0,272-0,112	8	слабая	0,275-0,110	11	слабая
Температура 28 °С, спирт 16 % об.	-	-	нет роста	-	-	нет роста
	0,610-0,514	2	высокая	-	-	высокая
	0,498-0,375	3	средняя	-	-	средняя
Температура 28 °С, спирт 16 % об.	0,248-0,112	8	слабая	0,290-0,120	12	слабая
	-	-	нет роста	0,093	1	нет роста
	-	-	высокая	-	-	высокая
Температура 28 °С, спирт 16 % об.	0,381-0,363	2	средняя	-	-	средняя
	0,245-0,108	10	слабая	0,236-0,113	12	слабая
	0,098	1	нет роста	0,093	1	нет роста

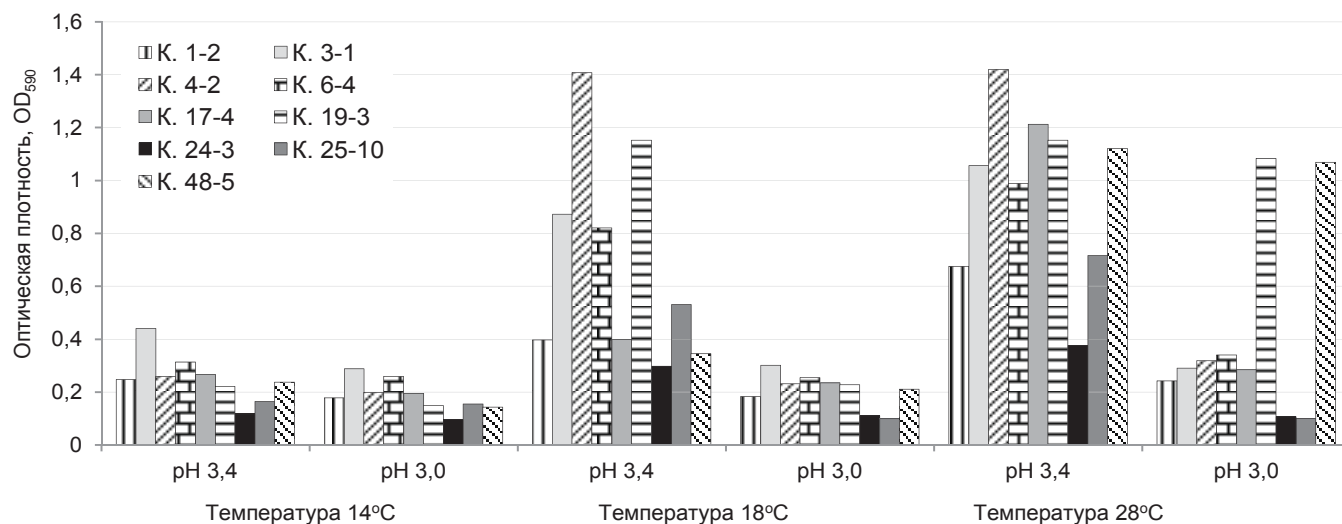


Рис. 1. Влияние рН среды и температуры культивирования на накопление биомассы МКБ рода *Oenococcus*
Fig. 1. The effect of pH medium and cultivation temperature on accumulation of LAB biomass of *Oenococcus* genus

близки и снижение их роста при температуре 14 °С составило 40 %, при 18 °С – в диапазоне от 41 до 50 %, при 28 °С – от 48 до 62 %. Отмеченная способность *L.paracasei* активно накапливать биомассу в стрессовых условиях позволяет предположить, что представители данного вида также могут иметь интерес для дальнейшей селекции. Отмечены четыре штамма *O. oeni* (К.3-1, К.6-4, К.19-3, К. 48-5) и три штамма *L. paracasei* (П.4-7, П.39-2, П.41-2), показавшие лучшую устойчивость к низким значениям температуры и рН по сравнению с другими штаммами (рис. 1, 2). Для оценки представителей вида *L. hilgardii* требуется проведение дополнительных исследований, поскольку в работе был представлен только

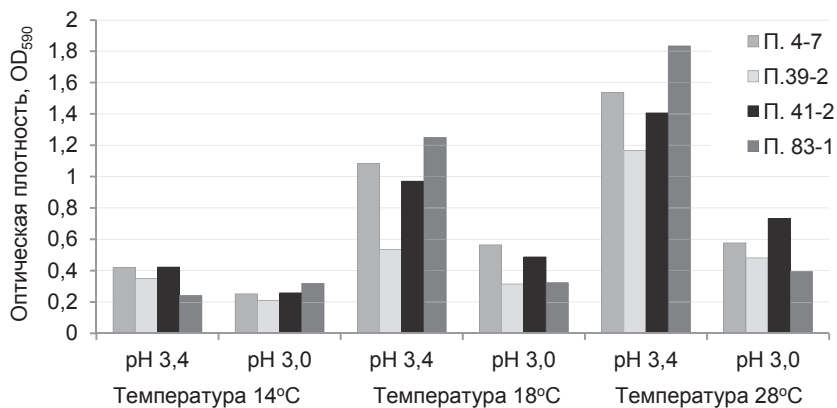


Рис. 2. Влияние рН среды и температуры культивирования на накопление биомассы МКБ родов *Lactocaseibacillus* и *Lentilactobacillus*
 Fig. 2. The effect of pH medium and cultivation temperature on accumulation of LAB biomass of *Lactocaseibacillus* and *Lentilactobacillus* genera

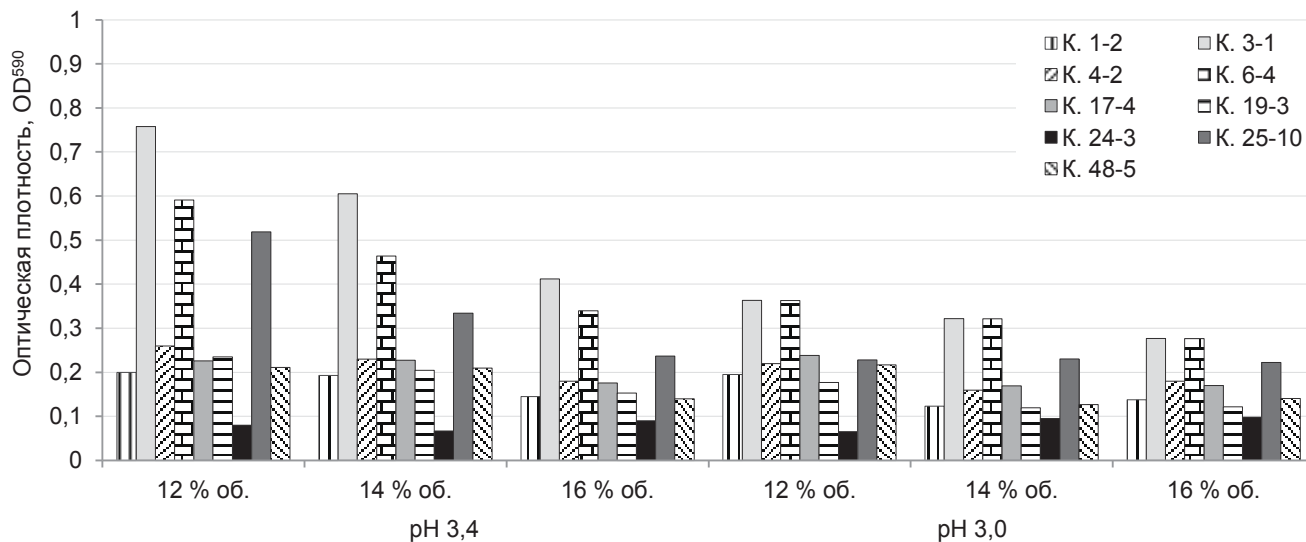


Рис. 3. Влияние рН среды и объемной доли этилового спирта при температуре культивирования 18 °С на накопление биомассы МКБ рода *Oenococcus*

Fig. 3 The effect of pH medium and volume ratio of ethyl alcohol at a cultivation temperature of 18 °С on accumulation of LAB biomass of *Oenococcus* genus

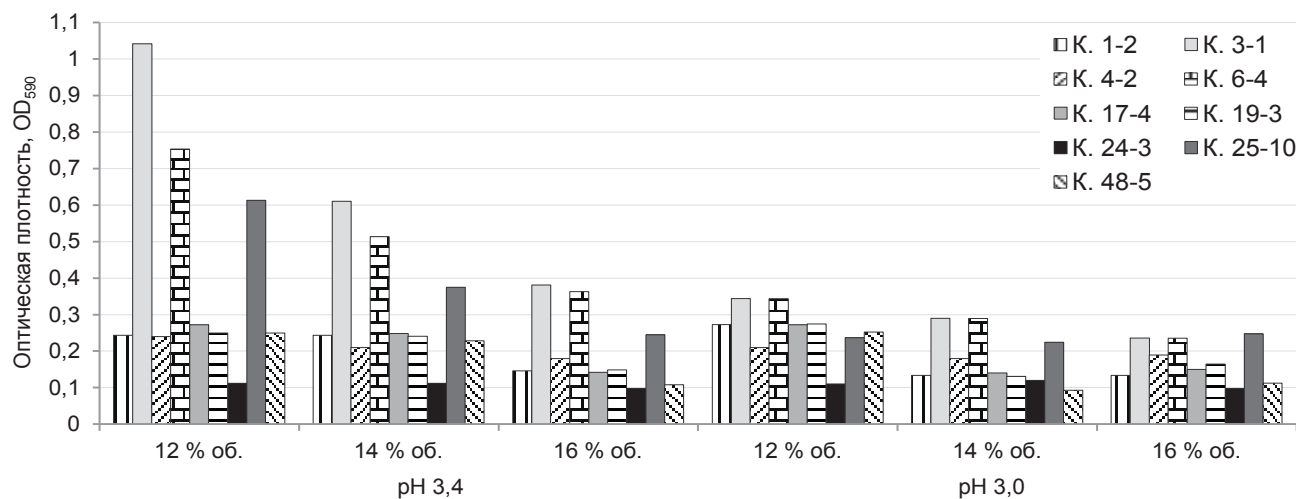


Рис. 4. Влияние рН среды и объемной доли этилового спирта при температуре культивирования 28 °С на накопление биомассы МКБ рода *Oenococcus*

Fig. 4. The effect of pH medium and volume ratio of ethyl alcohol at a cultivation temperature of 28 °С on accumulation of LAB biomass of *Oenococcus* genus

один штамм, показавший меньшую устойчивость к стрессовым факторам, чем штаммы *L.paracasei*.

Внесение в среду культивирования спирта способствовало еще более сильному снижению роста штаммов и данный эффект усиливался при увеличении концентрации спирта в среде. При таких условиях увеличилось количество штаммов со слабой активностью по сравнению с аналогичными условиями культивирования без добавления спирта. Показательно, что температура 28°C при pH 3,0 может оказывать влияние на снижение устойчивости отдельных штаммов к спирту. Устойчивыми к спирту проявили себя только 5 штаммов – три штамма *O. oeni* (К.3-1, К.6-4, К.25-10), штамм *L. paracasei* (П.41-2) и штамм *L. hilgardii* (П.83-1), среди которых штаммы *O. oeni* (К.3-1, К.6-4) обладали большей устойчивостью к спирту и хорошо росли при низком значении pH (рис. 3-6). В литературе также встречаются сведения о том, что некоторые виды *Lactobacillus* (например, *L. hilgardii*) и *O. oeni* могут расти при более высоких концентрациях этанола [36].

Математический анализ полученных данных позволил оценить возможный отклик штаммов на изменение условий культивирования и также показал, что штаммовые отличия наиболее сильно проявились для МКБ, принадлежащих к *O. oeni*, по сравнению с бактериями палочковидной формы (табл. 3).

Выводы

Исследование показало, что природные штаммы МКБ обладают разной чувстви-

Таблица 3. Статистический анализ устойчивости штаммов к изменению условий культивирования
Table 3. Statistical analysis of strain resistance to changes in cultivation conditions

Штамм	Коэффициент Пирсона		
	pH	температура	объемная доля этилового спирта
<i>Oenococcus oeni</i>			
К 1-2	0,390	0,226	-0,558
К 3-1	0,736	0,153	-0,198
К 4-2	0,365	0,065	-0,543
К 6-4	0,670	0,168	-0,259
К 17-1	0,315	0,222	-0,487
К 19-3	0,191	0,234	-0,643
К 24-3	0,728	0,417	-0,564
К 25-10	0,646	0,249	-0,014
К 48-5	0,092	0,344	-0,575
<i>L. paracasei</i>			
П 4-7	0,220	0,105	-0,764
П 39-2	0,258	0,157	-0,671
П 41-2	0,481	0,158	-0,627
<i>L. hilgardii</i>			
П 83-1	0,419	0,184	-0,492

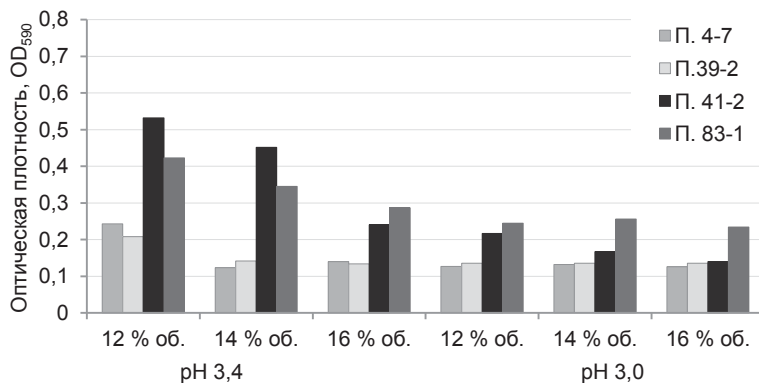


Рис. 5. Влияние pH среды и объемной доли этилового спирта при температуре культивирования 18°C на накопление биомассы МКБ родов *Lacticaseibacillus* и *Lentilactobacillus*
Fig. 5. The effect of pH medium and volume ratio of ethyl alcohol at a cultivation temperature of 18 °C on accumulation of LAB biomass of *Lacticaseibacillus* and *Lentilactobacillus* genera

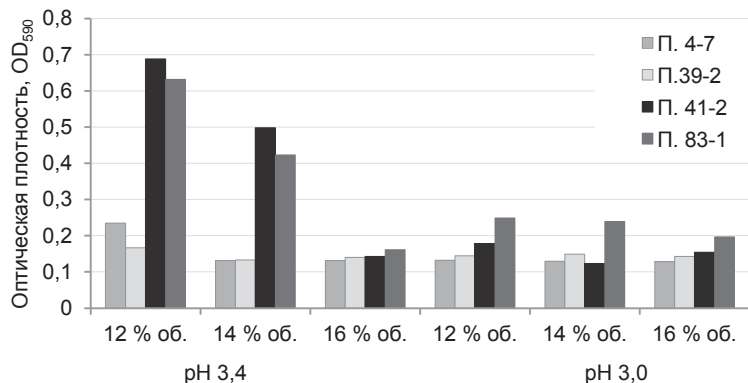


Рис. 6. Влияние pH среды и объемной доли этилового спирта при температуре культивирования 28°C на накопление биомассы МКБ родов *Lacticaseibacillus* и *Lentilactobacillus*
Fig. 6. The effect of pH medium and volume ratio of ethyl alcohol at a cultivation temperature of 28 °C on accumulation of LAB biomass of *Lacticaseibacillus* and *Lentilactobacillus* genera

тельностью к изменениям pH, температуры, спирта, что подтверждает данные о генетическом разнообразии микроорганизмов данной группы и необходимости индивидуального подхода к выбору условий их культивирования.

Для дальнейшей селекции нами отобраны пять штаммов *O. oeni* (К.3-1, К.6-4, К.19-3, К.25-10, К. 48-5), три штамма *L. paracasei* (П.4-7, П.39-2, П.41-2) и штамм *L. hilgardii* (П. 83-1) показавшие лучшую устойчивость к стрессовым факторам по сравнению с другими штаммами.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0833-2019-0008.

Financing source

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

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы / References

- Krieger-Weber S. Application of yeast and bacteria as starter cultures. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Eds. König H., Uden G., Fruchlich J. Berlin: Springer, 2009:489–513. doi: 10.1007/978-3-540-85463-0.
- 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;4:876–906. doi: 10.1007/s11947-010-0448-8.
- Bartowsky E.J., Costello P.J., Chambers P.J. Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Aus. J. Grape Wine Res.* 2015;21:663–669. doi: 10.1111/ajgw.12185.
- Betteridge A., Grbin P., Jiranek V. Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends Biotechnol.* 2015;33:547–553. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.008.
- 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;50:327–334. doi: 10.1111/j.1472-765x.2010.02795.x.
- Romero J., Ilabaca C., Ruiz M., Jara C. *Oenococcus oeni* in Chilean red wines: technological and genomic characterization. *Front. Microbiol.* 2018. Article 90. doi: 10.3389/fmicb.2018.00090.
- Nisiotou A.A., Dourou D., Filippousi M.E., Diamantea E., Fragkouli P., Tassou C., Banilas G. Genetic and technological characterization of vineyard- and winery-associated lactic acid bacteria. *Biomed. Res. Int.* 2015; Article ID508254. doi: 10.1155/2015/508254.
- Cafaro C., Bonomo M.G., Guerrieri A., Crispo F., Ciriello R., Salzano G. Assessment of the genetic polymorphism and physiological characterization of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Aglianico del Vulture red wine. *Folia Microbiol.* 2016;61:1–10. doi: 10.1007/s12223-015-0402-2.
- Cañas P.M., Pérez P.R., Prieto S.S., Herreros M.L. Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. *J. Biosci. Bioeng.* 2009;108:220–224. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.04.001.
- Wibowo D., Eschenbruch R., Davis C.R., Fleet G.H., Lee T.H. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* 1985;36(4):302–313.
- López-Seijas J., García-Fraga B., Silva A.F., Zas-García X., Lois L.C., Gago-Martínez A., Leão-Martins J.M., Sieiro C. Evaluation of malolactic bacteria associated with wines from Albariño variety as potential starters: screening for quality and safety. *Foods.* 2020;9:99. doi:10.3390/foods9010099.
- Berbegal C., Peña N., Russo P., Grieco F., Pardo I., Ferrer S., Spano G., Capozzi V. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. *Food Microbiol.* 2016;57:187–194. doi: 10.1016/j.fm.2016.03.002.
- Valdés La Hens D., Bravo-Ferrada B.M., Delfederico L., Caballero A.C., Semorile L.C. Prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* during spontaneous malolactic fermentation in Patagonian red wines revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis with two targeted genes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 2015;21:49–56. doi: 10.1111/ajgw.12110.
- Buckenhüskes H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993;12:253–272. doi: 10.1016/0168-6445(93)90067-J.
- Versari A., Parpinello G.P., Cattaneo M. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: A Review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1999;23:447–455. doi: 10.1038/sj.jim.2900733.
- Malolactic fermentation in wine. Understanding the science and the practice. Legal deposit. Library and Archives. Canada: Lallemand, 2005:1-170.
- Ribereau-Gayon J., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. Lactic acid bacteria. *Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications*. 2nd edn. London: Wiley, 2006;1:1-495.
- Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M. Malolactic fermentation: the ABC's of MLF. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2010;31:186–212. doi: 10.21548/31-2-1417.
- Lasik M. The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: a review. *Eur Food Res Technol.* 2013;237:843–850. doi: 10.1007/s00217-013-2083-x.
- Танащук Т.Н., Шаламитский М.Ю. Влияние условий культивирования на активность роста природных штаммов молочнокислых бактерий виноделия // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2020;22(3):266-271. doi: 10.35547/IM.2020.22.3.016.
- 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 (in Russian).
- 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):328-332. doi: 10.35547/IM.2019.21.4.010.
- 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):328-332 (in Russian).
- Танащук Т.Н. Выделение и характеристика молочнокислых бактерий виноделия // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2018;105(3):84-86.
- Tanashchuk T.N. Isolation and performance profile of lactic acid bacteria in winemaking. *Magarach. Viticulture and Winemaking.* 2018;105(3):84-86 (in Russian).
- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* 1960;23(1):130–135.
- Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия. Симферополь: Таврида. 2003:1-560.
- Buryan N.I. Practical microbiology of winemaking. Simferopol: Tavrida. 2003:1-560 (in Russian).
- Bruder S., Reifenrath M., Thomik T., Boles E., Herzod K. Parallelized online biomass monitoring in shake flasks enables efficient strain and carbon source dependent growth characterization of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Cell Fact.* 2016;15:127. doi: 10.1186/s12934-016-0526-3.
- Lôoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques.* 2011;50:325–328. doi: 10.2144/000113672.
- Pulpipat T., Viriyarumpa S., Chumsing S., Boonyawiwat V., Wajjwalku W. Lithium acetate (LiOAc)-SDS lysis DNA extraction method of gram-positive bacteria for PCR templates. *KKU Vet. J.* 2013;23(1):24–31.
- Benga L., Benten W.P.M., Engelhardt E., Kohrer K., Gougoula C., Sager M. 16S ribosomal DNA sequence-based identification of bacteria in laboratory rodents: a practical approach in laboratory animal bacteriology diagnostics. *Lab. Anim.* 2017;48(4):305–312. doi: 10.1177/0023677214538240.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;74(12):5463–5467.

30. McGinnis S., Madden T.L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(web server issue):20-25. doi 10.1093/nar/gkh435.
31. Lafon-Lafourcade S. Propriétés de l'enzyme malyque des bactères lactiques isolées de vins. *Conn. Vigne Vin.* 1970;3:273-282.
32. Работнова И.Л. Культивирование микроорганизмов / Промышленная микробиология под общ. ред. Егорова Н.С. М.: Высшая школа. 1989:130-131.
Rabotnova I.L. Cultivation of microorganisms / Industrial microbiology under the general. Editorship of Egorov N.S. M.: Higher school. 1989:130-131 (*in Russian*).
33. Jaomanjaka F., Ballestra P., Dols-Lafargue M., Le Marrec C. Expanding the diversity of oenococcal bacteriophages: insights into a novel group based on the integrase sequence. *Int J Food Microbiol.* 2013;166:331-340. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.032.
34. Grandvalet C. Oenococcus oeni: queen of the cellar, nightmare of geneticists *Microbiol.* 2017;163:297-299. doi: 10.1099/mic.0.000456.
35. Sumbly K.M., Bartle L., Grbin P.R., Jirenek V. Measures to improve wine malolactic fermentation. *App. Microbiol. Biotechnol.* 2019;103:2033-2051. doi: 10.1007/s00253-018-09608-8.
36. König H., Fröhlich J. Lactic Acid Bacteria. Biology of Microorganisms on Grapes in Must and in Wine. Berlin: Springer, 2009:3-31. doi: 10.1007/978-3-540-85463-0.

Информация об авторах

Татьяна Николаевна Танащук, канд. техн. наук, вед. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-мейл: magarach_microbiol.lab@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7847-1246>;
Максим Юрьевич Шаламитский, мл. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-мейл: mshalamitskiy@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-5888-6228>;
Загоруйко Валентина Ивановна, вед. инженер лаборатории микробиологии.

Information about authors

Tatiana N. Tanashchuk, Cand. Techn. Sci, Leading Staff Scientist of the Laboratory of Microbiology; e-mail: magarach_microbiol.lab@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7847-1246>;
Maksim Yu. Shalamitskiy, Junior Staff Scientist of the Laboratory of Microbiology; e-mail: mshalamitskiy@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-5888-6228>;
Valentina I. Zagoruiko, Leading Engineer of the Laboratory of Microbiology.

Статья поступила в редакцию 20.12.2021, одобрена после рецензии 27.12.2021, принята к публикации 10.03.2022