Міністерство освіти і науки України

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кафедра біохімії,
мікробіології та фізіології харчування

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ ТА ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

з курсу

«МІКРОБІОЛОГІЯ ГАЛУЗІ»

(«МІКРОБІОЛОГІЯ БРОДИЛЬНИХ ВИРОБНИЦТВ»)

для бакалаврів
за спеціальністю 181 ХАРЧОВІ ТЕХНОЛОГІЇ
освітньо-професійної програми
Технології продуктів бродіння та виноробства

Затверджено
Науково-методичною радою ОНАХТ
Протокол № 15 від 03.07.2018 р.

Одеса ОНАХТ 2018

Конспект лекцій та лабораторний практикум з курсу «Мікробіологія галузі» («Мікробіологія бродильних виробництв») для бакалаврів для бакалаврів за спеціальністю 181 ХАРЧОВІ ТЕХНОЛОГЇЇ освітньо-професійної програми Технології продуктів бродіння та виноробства денної та заочної форм навчання / Уклад. Л. В. Капрельянц, А. В. Єгорова, Л. В. Труфкаті, Т. В. Шпирко – Одеса: ОНАХТ, 2018. – 90 с .

Укладачі Л. В. Капрельянц, д-р техн. наук, професор,
А. В. Єгорова, канд. техн. наук, доцент,
Л. В. Труфкаті, канд. техн. наук, доцент.

Відповідальний за випуск зав. кафедри біохімії, мікробіології і фізіології харчування Л. В. Капрельянц, д-р техн. наук, професор.

ПОЛОЖЕННЯ ПРО ВІДПРАЦЮВАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Кредитно-модульна система передбачає обов'язкове відвідування і систематичне опрацювання студентами матеріалу дисципліни на лекціях та лабораторних роботах.

Студенти, які пропустили лабораторні роботи і не відпрацювали їх, не допускаються до модульного контролю (заліку або іспиту).

Відпрацювання лабораторних робіт проходить в навчальних лабораторіях мікробіології згідно з графіком. Студент повинен заздалегідь записатися у інженера-мікробіолога на відпрацювання лабораторної роботи, яка була пропущена. Термін відпрацювання – 2 тижні з дня пропуску лабораторної роботи. Допуском до відпрацювання є протокол лабораторної роботи, підписаний викладачем, також заздалегідь.

Студенти також мають можливість відпрацювати лабораторну роботу з іншими групами у разі, якщо теми лабораторних робіт співпадають.

Студенти мають право на організацію платних занять із зазначеної дисципліни поза графіком навчального процесу за індивідуальним планом та за калькуляцією навчального закладу.

“Мікробіологія бродильних виробництв” є однією з фундаментальних дисциплін для студентів – технологів освітньо-професійної програми Технології продуктів бродіння та виноробства, тому що її знання є основою для організації технологічного процесу виробництва вина, шампанського, пива, забезпечення необхідних показників якості, у тому числі органолептичних, та мікробіологічної стабільності продуктів виноробства та пивоваріння при зберіганні. У ході лабораторних робіт вивчаються морфолого-фізіологічні особливості кожних технічно важливих мікроорганізмів і мікроорганізмів-шкідників виробництва, висвітлюються способи мікробіологічного контролю виробництва вина, шампанського, пива, методи професійного ведення чистих культур мікроорганізмів та їх ідентифікації, викладається теорія збалансованих поживних середовищ, приділяється увага питанням переробки відходів виробництва.

Під час приготування вина з виноградного сусла в ньому протікають складні біохімічні процеси, пов'язані з життєдіяльністю мікроорганізмів. Для виготовлення якісної продукції, що відповідає установленим кондиціям, необхідно вчасно та грамотно здійснювати мікробіологічний контроль.

Для керування технологічним процесом приготування вина й шампанського необхідно знати морфологію та фізіологію різних видів дріжджів, молочнокислих і оцтовокислих бактерій.

У процесі вивчення дисципліни студенти повинні засвоїти умови, що сприяють кращому виробничому використанню мікроорганізмів, забезпеченню відсутності браку виноробної продукції та пива.

Завдання вивчення дисципліни:

– виховання фахівців, здатних вести технологічний процес на високому технічному й екологічному рівні, запобігати ризикованим ситуаціям, пов'язаним з присутністю у виробництві живих мікроорганізмів та багатих поживних середовищ;

– засвоєння сучасних мікробіологічних способів вивчення морфолого-фізіологічних ознак дріжджів, плісеневих грибів, молочнокислих і оцтовокислих бактерій, техніки культивування, принципів виділення чистих культур дріжджів та інших мікроорганізмів, які мають значення у виноробстві та пивоварінні;

– знайомство з методами мікробіологічного та санітарно-гігієнічного контролю на підприємствах виноробної галузі та пивоваріння. Уміння відповідно до чинних ДСТУ проводити контроль виробництва, застосовувати основні мікробіологічні та бактеріологічні методи дослідження виробничих культур, мікроорганізмів-шкідників; освоєння методів мікробіологічного аналізу винограду, виноградного та зернового сусла, виноматеріалів і готових вин, повітря, тари, інвентарю та обладнання;

– вивчення основних видів мікроорганізмів- «бур'янів» виноробства, їх фізіологічних особливостей і процесів, які вони викликають у виноматеріалах; освоєння методів їх визначення та ідентифікації; ознайомлення зі способами боротьби зі сторонньою мікрофлорою та хворобами вин та пива;

– вивчення способів раціонального використання відходів виноробного виробництва та пивоваріння; уміння на практиці використовувати отримані результати, знаходити проблемні ділянки в технологічному процесі.

Курс дисципліни “Мікробіологія бродильного виробництва” включає один модуль. Модуль містить півтори кредити, у які входять лекції, лабораторні роботи й самостійна робота студентів. Вивчення дисципліни полягає у засвоєнні лекційного матеріалу та окремих розділів, які не виносяться на лекції, у виконанні лабораторних робіт, а рівень засвоєння знань контролюється написанням модульної роботи.

Методичні вказівки складені на підставі чинних ДСТУ, інструкцій, інших офіційних документів, що регламентують порядок і методи мікробіологічного і санітарно-технологічного контролю у бродильному виробництві.

Мета видання методичних вказівок – допомогти студентам освоїти методи мікробіологічного контролю у виноробстві та вивчити теоретичні основи цих методів.

Список літератури, яка була використана для підготовки методичних вказівок, та яку можна рекомендувати для самостійного поглибленого вивчення окремих тем дисципліни, наведений у кінці посібника.

Основи мікробіологічного контролю у харчовому виробництві

Харчові продукти, які щоденно вживають люди, не стерильні, тобто завжди містять певну кількість мікроорганізмів. Частина цих мікроорганізмів не шкідливі і навіть бажані для людини, оскільки захищають її від патогенної мікрофлори і є її антагоністами.

Кожний харчовий продукт є ареною діяльності складного мікробного біоценозу. На рухому рівновагу цього біоценозу впливають різноманітні фактори та взаємозв'язки, які направляють його діяльність або в потрібному, або в небажаному напрямку.

Одні і ті ж мікроорганізми в одних харчових продуктах відіграють корисну роль, а в інших небажані і навіть шкідливі. Одні продукти готують з використанням чистих культур мікроорганізмів у вигляді заквасок, в інших продуктах намагаються ці ж мікроорганізми знищити. Наприклад, ентерокок вважають показником фекального забруднення харчових продуктів, деякі спеціалісти вважають його збудником харчових токсикоінфекцій. Але саме його використовують у виробництві сиру «чеддер». Молочнокислі бактерії використовують у виготовленні кисломолочних продуктів, хлібопеченні, але вони ж спричиняють псування кондитерських виробів, меду, вина, напівфабрикатів консервів та ін.

Підхід до кожного мікроорганізму в харчовій промисловості має бути обережним, індивідуальним, зваженим та добре продуманим.

Ідея санітарно-бактеріологічного контролю та нормування мікроорганізмів в харчових продуктах виникла та була реалізована при введенні пастеризації молока, а пізніше була розповсюджена і на інші харчові продукти. Введення такого нормування для харчових продуктів виявилося дуже складним питанням, оскільки вони мають високу поживну цінність, тобто містять всі необхідні для життєдіяльності мікроорганізмів речовини. Ця особливість робить санітарно-бактеріологічний контроль харчових продуктів необхідним та ефективним, тому що він вказує на динаміку росту мікроорганізмів та на процеси, які вони викликають.

Головним завданням мікробіологічного контролю харчових виробництв є забезпечення випуску доброякісної та безпечної продукції. Як і у всіх випадках проблем здоров'я та безпеки, профілактика є найбільш бажаним варіантом. Її вважають першою лінією оборони проти зараження харчових продуктів сторонньою мікрофлорою. Головним принципом профілактики є інформованість про цю потенційну загрозу.

Найважливішим моментом в системі профілактики та попередження контамінації харчових продуктів сапрофітами та виключення розповсюдження інфекційних захворювань є мікробіологічні дослідження, які дозволяють гарантувати санітарне благополуччя сировини та готової продукції. Головною задачею мікробіологічного контролю є швидке виявлення шляхів проникнення у виробництво мікроорганізмів-шкідників, джерел їх розповсюдження та можливості розмноження на етапах технологічного процесу, а також розробка методів попередження їх розвитку та активного знищення.

Мікробіологічний контроль проводять в лабораторіях підприємств систематично. Він здійснюється на всіх етапах технологічного процесу, починаючи із сировини та закінчуючи готовою продукцією у відповідності до державних стандартів, технічних умов, інструкцій, правил, методичних вказівок та іншої нормативної документації, яку розробляють для кожної галузі харчової промисловості.

Основними показниками мікробної забрудненості предметів є загальна кількість мікроорганізмів на одиницю поверхні досліджуваного предмета (МАФАнМ) та наявність на предметах санітарно-показових мікроорганізмів як показників фекального забруднення.

Для окремих харчових виробництв є свої схеми мікробіологічного контролю, в яких визначено його об’єкти, місця відбору проб, періодичність контролю та вказані мікробіологічні показники, які необхідно визначати та їх допустимі норми.

Мікробіологічний контроль буде дієвим та буде сприяти покращенню роботи підприємства тільки в тому випадку, якщо він буде відбуватися одночасно із санітарно-гігієнічним контролем.

Призначенням санітарно-гігієнічного контролю є виявлення патогенних мікроорганізмів. Можливу їх присутність визначають по наявності санітарно-показових мікроорганізмів. Контроль містить перевірку чистоти води, повітря виробничих приміщень, харчових продуктів, санітарного стану технологічного обладнання, тари, гігієнічного стану персоналу. Він проводиться як в мікробіологічній лабораторії підприємства, так і санітарно-епідеміологічними станціями за затвердженими методиками.

Мікробіологічні лабораторії підприємств підпорядковані Державній санітарно-епідеміологічній службі (ДСЕС), яку очолює Головний санітарний лікар України – перший заступник Міністра охорони здоров'я. ДСЕС визначає порядок і проводить гігієнічну, токсикологічну, епідеміологічну експертизу, видає висновки щодо відповідності об’єктів експертизи вимогам Державних стандартів України (ДСТУ). Об’єктами експертизи є повітря, вода, ґрунт, сировина, готова продукція та ін. Національна Комісія України з Кодексу Аліментаріус (створена 3 липня 2006 р.) рекомендує, ДСЕС організує розробку нормативів, погоджує норми державних стандартів, технічні регламенти та інші нормативно-технічні документи на вироби, сировину, технології, об’єкти середовища життєдіяльності у частині вимог щодо їх безпеки для здоров'я і життя людини, узгоджує норми з Міжнародними стандартами, а Головний державний санітарний лікар України затверджує їх.

Джерела сторонніх мікроорганізмів в харчовій промисловості. Мікробіологічні та санітарно-гігієнічні критерії безпеки харчових продуктів

Мікроорганізмів в природі надзвичайна кількість. Вони знаходяться в повітрі, воді, ґрунті, на рослинах, предметах, продуктах, на поверхні та в організмах птахів, тварин та людей. Властивості мікроорганізмів також дуже

різноманітні. Вони легко пристосовуються до джерел харчування, стійкі до нестачі вологи, коливань температури, здатні швидко розмножуватися.

Значення мікроорганізмів в природі надзвичайно велике. Вони приймають участь у кругообігу речовин у природі: розкладають рослинні та тваринні залишки та перетворюють їх в мінеральні сполуки з утворенням кінцевих продуктів – вуглекислого газу, аміаку та води, які знову використовуються рослинами. Мікроорганізми відіграють важливу роль в геохімічних перетвореннях азоту, сірки, фосфору, заліза та інших елементів. З їх життєдіяльністю пов`язано утворення корисних копалин: вугілля, нафти, руд, торфу та ін.

В господарській діяльності людини мікроорганізми використовуються дуже активно. Виноробство, пивоваріння, хлібопечення, виготовлення оцту, кисломолочних продуктів, сирів, квашених овочів та фруктів – всі ці технології пов`язані з життєдіяльністю мікроорганізмів. В біотехнології за допомогою мікроорганізмів отримують ферменти, амінокислоти, вітаміни, антибіотики, гормони, білково-вітамінні концентрати та ін.

Але поряд з цим є мікроорганізми, які наносять суттєву шкоду: викликають псування сировини, напівфабрикатів та готової продукції.

Обмін речовин, який проводять мікроорганізми – природній процес, дуже важливий для переробки органічних речовин. Такі процеси називають *біодеградацією*, але якщо ці органічні речовини важливі для життя та здоров'я людини, то такий мікробний метаболізм називають *псуванням*. Якщо ж діяльність мікроорганізмів вигідна для людини, то такі процеси метаболізму називають *ферментацією* або *біотрансформацією*.

Отже, «псування харчових продуктів» - поняття соціально обумовлене і його можна визначити як процес зміни харчового продукту, який приводить до небажаності або навіть неможливості його вживання.

Значна кількість мікроорганізмів є збудниками інфекційних захворювань людей, тварин та рослин. Все це примушує оцінювати ризики псування харчових продуктів та висувати на пріоритетне місце їх безпеку. Саме тому головною умовою функціонування харчових підприємств є високий рівень культури виробництва, мікробіологічного та санітарно-гігієнічного контролю.

Споживачі висувають до харчових продуктів суперечливі вимоги: з одного боку вони мають бути максимально свіжими, тобто з мінімальною переробкою, з іншого – мати високу якість, бути гарантовано безпечними для здоров'я, мати тривалий строк зберігання та оптимальну ціну. Такий споживацький тиск вимагає зменшувати виробничі затрати на всіх етапах технологічного процесу, а це в свою чергу вимагає від мікробіологічного контролю величезної відповідальності.

Згідно закону України «Про безпечність та якість харчових продуктів» харчові продукти, вироблені в Україні, повинні бути безпечними, придатними до споживання, правильно маркованими та відповідати санітарним нормам і технологічним регламентам.

Безпечний харчовий продукт - це харчовий продукт, який не створює шкідливого впливу на здоров'я людини безпосередньо або опосередковано за

умов його виробництва та обігу з дотриманням санітарних вимог та споживання (використання) за призначенням.

Санітарно-мікробіологічні дослідження відносяться до однієї з найбільш регламентованих сфер діяльності харчового підприємства. Проведення санітарно-мікробіологічних досліджень можливе тільки при наявності на підприємстві чинної нормативної документації. Оцінку якості сировини, напівфабрикатів та готової продукції проводять на основі органолептичних, фізико-хімічних та мікробіологічних показників.

Шляхи забруднення сировини, напівфабрикатів та готової продукції мікроорганізмами надзвичайно різноманітні. Джерелом інфікування можуть бути сировина, недотримання санітарних правил в технологічному процесі, об'єкти зовнішнього середовища, наприклад повітря, вода, якщо вона не відповідає вимогам до якості питної води. Джерелом забруднення можуть бути обладнання, руки працівників підприємства, комахи та гризуни. На харчових підприємствах можуть бути зовнішні та внутрішні джерела інфекції. До зовнішніх джерел відносяться: сировина, вода та повітря. До внутрішніх - повітря виробничих приміщень, технологічна культура мікроорганізмів, мікробіота технологічного обладнання, тари, рук та одягу персоналу. Сторонні мікроорганізми, які потрапляють в сприятливі умови, швидко розмножуються та розносяться по всьому підприємству.

Мікроорганізми, які потрапляють в харчові продукти, можуть бути *сапрофітами*, які не викликають інфекційних захворювань, але є шкідниками технологічних процесів. Вони збільшують втрати сировини, знижують вихід та якість готової продукції. *Патогенні* мікроорганізми, які потрапляють в харчові продукти, можуть стати збудниками харчових захворювань. Тому мікробіологічні показники (кількісний та якісний склад мікробіоти) мають велике значення для якості та безпеки харчових продуктів.

Гігієнічні нормативи за мікробіологічними показниками містять контроль за чотирма групами мікроорганізмів:

- ***санітарно-показові***, до яких відносяться мезофільні аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми (МАФАнМ) та бактерії групи кишкових паличок – БГКП (колі-форми);
- ***умовно-патогенні мікроорганізми***, до яких відносяться *E. coli*, *S. aureus*, бактерії роду *Proteus*, *B. cereus* та сульфітредукуючі клостридії;
- ***патогенні мікроорганізми***, в тому числі сальмонели;
- ***мікроорганізми псування*** – головним чином це плісеневі гриби та дріжджі.

Лабораторний мікробіологічний контроль поділяється на плановий та позаплановий. Останній проводиться за епідемічними показниками у випадках виникнення харчових отруєнь та кишкових інфекцій. Плановий контроль включає:

- мікробіологічний контроль виробництва харчових продуктів:
- контроль санітарного стану всіх етапів технологічного процесу;

- контроль відповідності технологічних режимів та дотримання обов'язкових технологічних вимог виробництва продуктів.
- контроль якості зберігання харчових продуктів.
- контроль безпеки продукту, попередження виникнення харчових захворювань, отруєнь або токсикоінфекцій.

Показником санітарного стану харчового підприємства є рівень мікробної контамінації поверхні приладів, обладнання, спеціального одягу та рук цехового персоналу, який визначають через прямий мікробіологічний контроль класичними або сучасними експрес-методами дослідження.

З метою забезпечення якості та безпеки харчових продуктів за кордоном використовують систему критичних контрольних точок (HACCP) – контроль якості за аналізом ризиків в критичних контрольних точках. HACCP – абревіатура від англійського «Hazard Analysis and Critical Control Point», що в перекладі означає «аналіз безпечності та критичних контрольних точок».

Характерною особливістю цієї системи є плановий нагляд та контроль харчових продуктів за попереднім визначенням всіх можливих факторів, пов'язаних з повним контролем, починаючи з умов вирощування і закінчуючи дослідженням готового продукту, контролем за його зберіганням, транспортуванням та реалізацією. Повсякденний санітарно-бактеріологічний контроль виробництва харчових продуктів дозволяє контролювати динаміку загального санітарного режиму виробництва, виявляти його слабкі етапи та виправляти їх. Контроль необхідно проводити на всіх етапах виробництва. Дослідження тільки кінцевого продукту не відображує загального стану на виробництві.

Оскільки результати класичних мікробіологічних досліджень можна одержати не раніше, як через 24–72 години, тобто в терміни, коли продукти, що особливо швидко псуються, уже потрібно реалізувати, то результати досліджень можна використати лише для оцінки санітарно-гігієнічного стану харчових підприємств, які зайняті виробництвом та реалізацією харчових продуктів даної категорії, наприклад:

- виявлення в продукті підвищеної кількості МАФАнМ свідчить, головним чином, про порушення температурного режиму, а також інших умов нормативно-технічної документації в процесі виробництва харчової продукції;
- наявність у харчовому продукті підвищеної кількості колі-форм свідчить про низький рівень санітарно-гігієнічного стану, порушення технології виробництва та (або) зберігання харчової продукції;
- підвищений рівень коагулазопозитивних золотистих стафілококів у термічно оброблених харчових продуктах свідчить про їх вторинне забруднення мікроорганізмами;
- виявлення бактерій роду *Proteus* в харчових продуктах після термічної обробки свідчить про незадовільний санітарний стан на харчовому підприємстві та про необхідність проведення додаткової санітарної обробки обладнання, тари т.д.

Важливе значення має контроль відповідності технологічних умов виробництва режимам, зазначеним у нормативно-технічній документації, особливо тих продуктів, технологія яких передбачає термічну, хімічну обробку або інші прийоми. При цьому необхідно встановити кількісно та якісно допустимі межі вмісту мікроорганізмів після відповідної технологічної обробки та на наступних етапах пакування, транспортування, зберігання та реалізації.

Невідповідність продукту встановленим нормам відразу ж після виробництва вказує на недотримання технологічних режимів, а виявлення санітарних негараздів на наступних етапах – на вторинне забруднення.

В Україні активно запроваджується міжнародна система оцінки якості виробництва – ISO-стандарти. Головна ідея концепції полягає в тому, що якість продукту має створюватися під час виробництва. До запровадження ISO-стандартів на харчових підприємствах головна увага приділялася контролю лише готової продукції.

Ефективні системи контролю харчових продуктів мають важливе значення для захисту здоров'я споживачів. Крім того, вони вкрай необхідні для створення умов, у яких країни можуть забезпечити безпеку та якість харчових продуктів, що потрапляють в міжнародну торгівлю та перевірити відповідність імпортованих харчових продуктів національним вимогам.

Зі всіма законодавчими нормами Європейського союзу та з іншою відповідною інформацією можна ознайомитися за адресою: http://europa.eu.int/eur-lex/.

Контроль сировини, яка надходить на підприємство, готової продукції, технологічних процесів і санітарно-гігієнічних умов виробництва здійснює лабораторія підприємства відповідно до інструкцій з мікробіологічного і технологічного контролю.

Контроль дозволяє вчасно виявити біологічне забруднення продукту, виявити джерело забруднення, а також дає можливість проконтролювати виконання умов нормативно-технічної документації виробництва.

Особливості загальної мікробіологічної оцінки харчових продуктів

Жоден харчовий продукт не може зберігати свою первинну оптимальну якість безкінечно тривалий час. Під час зберігання відбувається його псування, в результаті чого він стає непридатним для вживання. Час, на протязі якого властивості харчового продукту залишаються стабільними і він зберігає придатну для споживача якість, називають *терміном придатності*. На протязі цього часу продукт має:

- бути безпечним для споживача;
- відповідати всім вказаним на етикетці параметрам харчової цінності;
- зберігати органолептичні, хімічні, фізичні та мікробіологічні властивості.

Методичні особливості вивчення загальної мікрофлори харчових продуктів визначаються характером і властивостями цих продуктів, а також

завданнями, що стоять перед аналізом. Метою дослідження може бути якісна або кількісна характеристика мікробіоценозу.

Якісна оцінка загальної мікрофлори

Повна якісна оцінка всіх складових мікробіоти продукту – завдання виключно важке, і якщо необхідна ідентифікація мікроорганізмів, то головним чином визначають характеристику технологічної мікробіоти або збудників псування продукту. Зазвичай для якісної оцінки загальної мікробіоти використовують прості методи. Наприклад, для аналізу свіжості кисломолочних продуктів з проби, яка добре гомогенізована, готується мазок, який висушується, фіксується і забарвлюється метиленовим синім. Під час мікроскопії констатують наявність молочнокислих бактерій, зерен кефіру або присутність сторонніх дріжджів, фрагментів міцелію грибів та інших невластивих продукту мікроорганізмів. Якщо в препараті виявляють лише технологічну мікробіоту, то продукт вважається доброякісним; якщо ж є сторонні мікроорганізми, то продукт визначається як несвіжий.

При мікробіологічному дослідженні свіжості м'яса та риби роблять препарати-відбитки. Мікроскопічні препарати можуть виготовлятися також із змивів і зрізів тканин.

У випадках, коли кількісний аналіз не потрібний, можна вдаватися до провокації розвитку мікроорганізмів безпосередньо в харчовому продукті. Найчастіше для цього використовують термостати (консерви перед бактеріологічним дослідженням) або вологі камери (для діагностики грибної поразки по характеру міцелію або по особливостям спороутворення).

При детальному аналізі харчових продуктів зазвичай йдеться про виділення однієї-двох найбільш характерних груп мікроорганізмів, для чого застосовуються різні селективні (елективні) або збагачувальні поживні середовища.

Кількісні дослідження загальної мікрофлори

Для визначення мікробіологічних критеріїв, які використовують для оцінки якості харчових продуктів та умов їх виготовлення використовують кількісні та альтернативні методи дослідження. Кількісні методи показують дійсне або найбільш вірогідне число життєздатних клітин мікроорганізмів в 1г продукту. Альтернативні методи визначають відсутність життєздатних клітин мікроорганізмів у конкретній масі продукту.

Мікробіологічні критерії, які характеризують безпеку та санітарно-епідеміологічний стан продукту, як правило, висловлюють *альтернативними показниками*. Наприклад, сальмонели нормуються відсутністю їх в 25г продукту, БГКП можуть нормуватися відсутністю в 1г, або в 0,1г або 0,01г в залежності від продукту. ***Чим більша маса наважки, тим суворіший показник.***

Мікробіологічні критерії, які характеризують технологічні режими виробництва харчових продуктів та їх надійність при зберіганні, висловлюють

кількісно тобто числовим вмістом колонії утворюючих одиниць (КУО) в 1г продукту. Такими методами визначають МАФАнМ.

Методи визначення кількості мезофільних аеробних та факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФАнМ)

Основними показниками мікробної забрудненості предметів є загальна кількість мікроорганізмів в розрахунку на одиницю поверхні досліджуваного предмета (МАФАнМ) та наявність на предметах санітарно-показових мікроорганізмів як показників фекального забруднення.

Кількість МАФАнМ – це критерій, який дозволяє виявити при температурі 30–37^{o}С на протязі 48–72 годин всі групи мікроорганізмів, які здатні рости на відповідних поживних середовищах. Ці мікроорганізми присутні повсюди і завжди: у воді, повітрі, на поверхні обладнання та ін.

В оцінці якості та безпеки харчових продуктів ці показники мають істотне значення. Зазвичай вважається, що якщо продукт виготовлений без участі мікроорганізмів, які викликають ферментативні процеси, то наявність в ньому мезофільних аеробів в кількості 10^6 в 1г (см^3) і більше роблять його потенційно небезпечним для споживачів (навіть якщо відсутні органолептичні прояви псування продукту).

Існують міжнародні стандарти, Державні стандарти України, які регламентують методи визначення МАФАнМ в харчових продуктах.

Кількість мікроорганізмів можна визначити методами прямого підрахунку або методом висіву продукту або його розведень у відповідні агаризовані середовища або в рідкі в разі визначення найбільш вірогідного числа мікроорганізмів (НВЧ) або титру методом граничних розведень.

Для визначення МАФАнМ ***методом висіву продукту*** в агаризовані середовища готують його десятикратні розведення і з них роблять висіви під відповідне середовище. Після культивування підраховують колонії мікроорганізмів і перераховують на 1г(см^3), беручи до уваги тільки ті чашки, де виросло від 30 до 300 колоній.

Прямий підрахунок мікроорганізмів застосовується для визначення загальної кількості мікроорганізмів в суспензіях. Для цього використовують камери Горяєва, Розенталя, Тома-Цейса та ін. Вони виготовлені на товстому предметному склі, мають певну глибину і площу, наприклад 0,1 мм і 1 мм^2 відповідно. На дні камери вигравірувана сітка, на яку наносять суспензію мікроорганізмів або розведення продукту. Камеру покривають покривним склом, яке притирають до появи так званих Ньютонівських кілець на бокових площинах, підрахунок мікроорганізмів ведуть об'єктивом 40. Перерахунок мікроорганізмів на одиницю об’єму проводять за формулою, до якої входять розміри камери (глибина, площа) та середня кількість мікроорганізмів у великих квадратах камери.

Метод кількісного обліку мікроорганізмів за допомогою лічильної камери має недоліки, пов'язані з тим, що в них проводиться облік всіх клітин мікроорганізмів без диференціації на живі та мертві. Крім того, лічильні камери

можуть бути використані лише для підрахунку відносно великих об'єктів - клітин водоростей, дріжджів, спор плісеневих грибів, які мікроскопують об'єктивами 8 та 40.

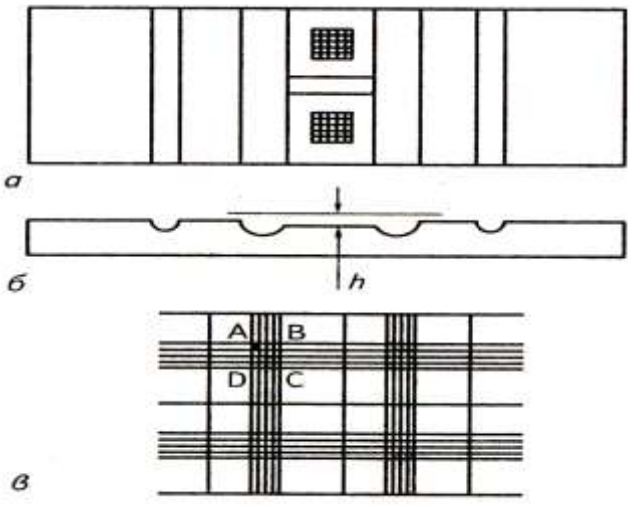


Рис.1. Лічильна камера Горяєва:

а – вид зверху*; б* – вид збоку, *h* – висота камери*; в* – вид при малому збільшенні мікроскопа

Метод граничних розведень (титру) полягає в тому, що рідкий продукт розводять доти, поки в останній пробірці не буде жодної бактеріальної клітини. Зазвичай розведення ведуть з десятикратним інтервалом. З цих розведень роблять висіви у/на відповідні агаризовані поживні середовища і визначають або титр, або НВЧ (за таблицями).

Титр – це той найменший об’єм матеріалу ($см^3$) або вагова кількість (г), у якому виявлена хоч одна клітина мікроорганізму. Посіви роблять в рідкі поживні селективні середовища з подальшим виділенням культури і визначенням її короткої характеристики.

Наприклад, для визначення титру кишкової палички у воді висівають кілька різних об’ємів (від 100 до 0,1 або до 0,01 $см^3$ залежно від передбачуваного ступеня забруднення) у рідкі цукровмісні поживні середовища. Розмноження в них кишкових паличок реєструється за наявністю бродіння – розщеплення вуглеводів до кислоти й газу. Пересів на щільні диференційно-діагностичні середовища та ідентифікація колоній, які на них виросли, дають змогу з’ясувати ті об’єми, в яких дійсно була присутня кишкова паличка. Потім за допомогою спеціальних таблиць визначають колі-титр.

Аналогічно визначається титр будь-яких інших мікроорганізмів, для яких розроблено діагностичні середовища.

Індекс – кількість клітин мікроорганізмів, виявлених у певному об’ємі (кількості) досліджуваного об’єкта. Для води, молока інших рідких продуктів – в 1 $дм^3$, для грунту і харчових продуктів – в 1 г. Індекс – величина, зворотня титру, тому перерахунок титру в індекс і назад можна робити шляхом поділу кількості грамів чи $см^3$ на значення титру або індексу. Індекс визначають, застосовуючи мембранні фільтри або посів різних розведень досліджуваних субстратів на поживні середовища.

Необхідно відмітити, що безпеку харчових продуктів та стан виробництва характеризують не тільки МАФАнМ але і наявність санітарно-показових мікроорганізмів.

Коротка історична довідка про етапи розвитку мікробіології бродильних виробництв

Виноробство є одним із прадавніх бродильних виробництв. Ще в середні віки у Франції існувало промислове виробництво виноградного вина. Але тільки роботи Пастера наприкінці XIX століття пояснили процеси, які протікають під час бродіння. На основі перетворень продуктів виноградного та плодово-ягідного сусла дріжджами, молочнокислими та оцтовокислими бактеріями формується продукт – вино, технологія виробництва якого залежить від ефективного управління процесами життєдіяльності мікроорганізмів.

Вино - це напій складний за хімічним вмістом. Воно містить спирт, цукри, органічні кислоти, білки, амінокислоти, вітаміни групи В та вітамін С. Для виготовлення якісної продукції, що відповідає установленим кондиціям, необхідно вчасно та грамотно здійснювати мікробіологічний контроль.

Для керування технологічним процесом приготування вина необхідно знати морфологію та фізіологію різних видів дріжджів, молочно- та оцтовокислих бактерій, вивчити основні види мікроорганізмів - «бур'янів» виноробства, їх фізіологічні особливості і процеси, які вони викликають у виноматеріалах, засвоїти методи їх визначення та ідентифікації, ознайомитися зі способами боротьби зі сторонньою мікрофлорою та хворобами вин.

1. Археологічні розкопки свідчать, що пиво варили ще шумери, які жили на території між річками Тигр та Євфрат понад 4000 років до н.е., а в районах Месопотамії та Середземномор’я виноробство було одним з найважливіших ремесел. Про лікувальні властивості вина говорив ще Гіпократ біля 2500 років назад.
2. Про мікробіологічний характер цих процесів стало відомо завдяки роботам Л.Пастера, який в 1857–1860 роках вперше довів, що спиртове бродіння викликають дріжджі, а причиною захворювання вин та пива є інші мікроорганізми. Він запропонував простий метод попередження захворювань – пастеризацію.
3. Значна роль в історії розвитку мікробіології бродильних виробництв належить датському ботаніку Ганзену, який запропонував в 1881 році метод виділення чистої культури дріжджів (ЧКД) з однієї ізольованої клітини.
4. М. А.Герасимова 1924–1926 рр. запропонувала застосування антисептиків для відстоювання сусла, що надалі давало можливість використовувати для виробництва вин ЧКД, адаптовані до сірчаного ангідриду.
5. Виявлено антагоністичні відносини між культурними видами винних дріжджів.
6. Розвиваються дослідження з селекції дріжджів методами гібридизації для отримання штамів, які поєднують у собі важливі технологічні показники.

Виноробство та пивоваріння відносяться до біотехнологічного виробництва, де головну роль відіграють процеси бродіння, які викликають мікроорганізми: в першу чергу – це дріжджі, молочнокислі бактерії (МКБ), оцтовокислі бактерії (ОКБ), плісеневі гриби. Дріжджі асимілюють вуглеводи, проводять анаеробний процес спиртового бродіння, продуктами якого є етиловий спирт та вторинні продукти.

Основні технологічні процеси при виробництві пива: очищення та сортування зерна (ячменю, пшениці, рису, жита, вівса…), миття зерна, замочування та вирощування солоду, сушка, подрібнення, змішування з водою в співвідношенні 1:4 та затирання, фільтрування та вимивання затору, кип'ятіння сусла з хмелем, відділення сусла від хмелевої шротини, освітлення з охолодженням, головне зброджування 7–12 діб, доброджування та дозрівання 20–90 діб, фільтрування та розлив.

Основні технологічні процеси при виробництві вина:

Первинне виноробство – це інспекція винограду або іншої плодово-ягідної сировини, видалення гребенів та кісточок, пресування (відділення соку), охолодження, при необхідності – сульфітація, бродіння, зняття з осаду, фільтрація, розлив.

Вторинне виноробство – стабілізація виноматеріалів, специфічні технологічні операції для хересу, мадери та ін., витримка, доливання, переливання, термічна обробка, освітлення, купажування, егалізація та розлив.

Найбільше практичне значення у галузях виробництва, основою яких є спиртове бродіння, мають дріжджі роду *Saccharomyces*, які активно зброджують вуглеводи. Їх називають *спиртоутворюючими, або культурними.* Вивчення генетичних та молекулярно-біологічних властивостей дріжджів цього роду дозволили об'єднати в один біологічний вид 15 «видів», назви яких за сучасною таксономією є синонімами *Saccharomyces cerevisiae*. Раніше дріжджі розглядалися як самостійні види: *S.vini, S.uwarum, S.carlsbergensis, S.oviformis, S.cheresiensis* та ін. Вони відрізняються між собою за морфологічними та фізіологічними ознаками. Однак, наукові дослідження довели, що вони є мутантами S. cerevisiae з частково втраченими або набутими ознаками. В сучасній науковій літературі можна зустріти і традиційні назви дріжджів, які використовуються у бродильних виробництвах, і нові, які відповідають сучасній таксономії.

Бур'яни бродіння, або дикі дріжджі – це та група дріжджів, що відноситься до слабко бродячих, які здатні викликати захворювання, пороки (вади) вин, що супроводжуються сторонніми тонами в смаку та ароматі. До таких відносяться дріжджі родів *Brettanomyces, Candida, Hanseniaspora, Hansenula, Mycoderma, Pichia, Rhodotorula*.

МОРФОЛОГІЧНІ, КУЛЬТУРАЛЬНІ ОЗНАКИ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ВИННИХ ДРІЖДЖІВ

Виноградна ягода, особливо пошкоджена, є носієм різноманітних мікроорганізмів. При роздавлюванні винограду всі ці мікроорганізми

потрапляють в сусло і розмножуються в ньому з величезною швидкістю.

Представники культурних видів винних дріжджів *Saccharomyces vini* складають незначну кількість загальної мікрофлори ягоди. Більшість видів мікроорганізмів сусла є шкідниками, бур'янами виробництва, викликають захворювання і псування вин. Участь таких "диких" видів дріжджових мікроорганізмів у бродінні повинна бути повністю усунена або максимально обмежена.

Продукти життєдіяльності "диких" дріжджів гальмують розмноження і бродильну енергію винних дріжджів і додають винам невластивий їм аромат і смак, виноматеріали погано освітлюються.

Знайомство з представниками різних видів мікроорганізмів, вивчення їх морфолого-фізіологічних і біологічних особливостей дозволить своєчасно виявити осередок інфекції у виробництві, попередити подальше її розповсюдження.

I. ***Морфологія культурних видів винних дріжджів***

Винні дріжджі використовуються у виноробстві як збудники спиртового бродіння. Вони відносяться до сімейства *Saccharomycetaceae* роду *Saccharomyces.* Більшу частину вина виготовляють з використанням різних штамів *Saccharomyces vini*. Раніше цей вид називався S.*ellipsoideus,* оскільки клітини мають форму еліпса. Окрім *S. vini* у виноробстві використовуються також дріжджі *S. oviformis, S. uvarum* та ін.

а) ***Saccharomyces vini***. Форма клітин еліптична або овальна, розмір (5-12)х(3-8) мкм. Іноді зустрічаються круглі клітини. Форма і розміри клітин можуть мінятися залежно від умов культивування (рис. 2). Це найбільш поширений вид дріжджів при зброджуванні виноградного сусла. Серед всіх дріжджів, що розвиваються при бродінні сусел, *S. vini* складають 80%. Оптимальні умови для життєдіяльності: pH 3,5; температура 28-30ºС; вміст цукру 18-20 %. Найбільша кількість спирту накопичується при зброджуванні 25% цукру; гранична концентрація накопиченного спирту 14-16 % об. Характерною особливістю культурних винних дріжджів є їх значна спиртостійкість (до 16% у *S.vini).*

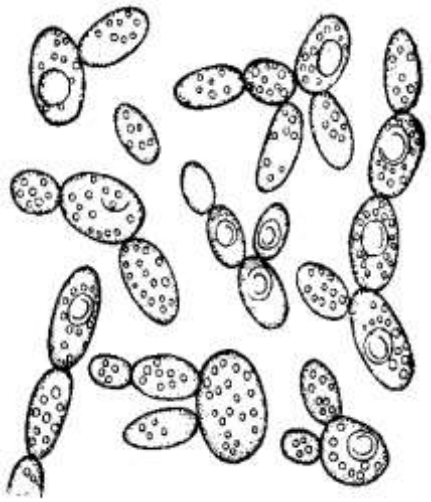


Рис. 2. Дріжджі *Saccharomyces vini*

Вміст сірчистого ангідриду (SO_2) 75-100 мг/л здатний затримувати бродіння при 20ºС на 2-4 доби.

Будова клітин винних дріжджів не відрізняється від будови клітин інших дріжджів. Розмножуються винні дріжджі брунькуванням і за допомогою спор. Спори утворюються за несприятливих умов. Кількість спор складає звичайно від 2 до 4, а іноді до 8. Утворюються спори безстатевим шляхом: ядро клітини ділиться на кількість частин, відповідно кількості спор, що утворилися. Кожне нове ядро оточується протоплазмою, покривається оболонкою і перетворюється на спору, а клітина

перетворюється на сумку, або аск. В порівнянні з вегетативними клітинами спори дещо стійкіші до несприятливих дій. При бродінні на виноградному суслі клітини розташовуються окремо або парами, бруньки на деякий час залишаються пов'язаними з материнською клітиною.

На твердому живильному середовищі (агаризоване сусло) колонії білі, вологі, більш - менш гладкі, іноді зернисті, мало порізані. На соку з желатином колонії можуть бути матовими або блискучими; вони звичайно досить великі, часто опуклі. Великі колонії *S. vini* можуть мати різний вигляд залежно від штаму.

Кожен вид дріжджів включає велику кількість рас, які мало розрізняються за зовнішніми ознаками, але значно – за цінними для виробництва фізіологічними і біохімічними властивостями. Зокрема, раси дріжджів виду *S. vini* володіють індивідуальними особливостями щодо спиртоутворюючої здатності, сульфітостійкості, за біосинтезом летких компонентів та інших продуктів, що створюють органолептичні властивості вин. Тому вибір рас дріжджів має велике практичне значення для виноробства.

В процесі бродіння на дріжджах *S.vini* середовище покривається піною; характер дріжджового осаду залежить від раси: він пилоподібний, скаламучений або пластівчастий, що легко осідає.

Джерелами вуглецевого живлення винних дріжджів є цукри, спирти, кислоти. Як ростові речовини для *S. vini* найбільш ефективні пантотенова кислота, біотин, інозит. Крім того, певний вплив мають тіамін і піридоксин. Дріжджі *S. vini* зброджують глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу і частково рафінозу.

б) ***Saccharomyces oviformis***. На виноградному суслі клітини мають найчастіше овальну, еліптичну, а іноді круглу форму (рис. 3). Розміри клітин (4-7)х(5-9) мкм, розташовані окремо або парами. Утворюють осад і іноді слабке кільце на поверхні. На твердому живильному середовищі (агаризоване сусло) клітини трохи вужчі і довші, розміром (3-6)х(5-9) мкм, причому деякі дуже подовжені. На даному живильному середовищі культура дріжджів має білий колір, колонії з розгалуженими краями, товсті, іноді гладенькі, іноді зернисті.

Форма колоній залежить від штамів і нагадує колонії *S. vini.*

Спороутворення на середовищі з агаром відбувається поволі і швидше на морквяному бульйоні з агаром. Найчастіше спостерігається по 2-3 спори в асці.

Дріжджі *S.oviformis* здатні зброджувати глюкозу, сахарозу, мальтозу і частково рафінозу. Ці дріжджі не розріджують желатин. *S.oviformis* відносно своїх потреб в стимуляторах практично не відрізняються від *S.vini.*

Чисті культури *S.oviformis* добре розвиваються у виноградному суслі, майже повністю зброджуючи цукри, які містяться в ньому, утворюючи близько 18%

Рис. 3. Дріжджі *S. oviformis*

спирту. На початку бродіння вони розвиваються трохи повільніше, ніж *S. vini*, але внаслідок великої стійкості до спирту вміст їх безперервно підвищується в ході бродіння. При використанні цих дріжджів у виноробстві одержують добрі результати у разі зброджування сусла з високим вмістом цукру при отриманні сухих вин.

Унаслідок широкого розповсюдження, високої спиртоутворюючої здатності і стійкості до етанолу *S.oviformis* в основному викликають бродіння виноматеріалів, що містять цукор. Дуже часто саме дріжджі *S.oviformis* закінчують бродіння, тобто це дріжджі, які завершують бродіння.

Здатність дріжджів *S.oviformis* краще ніж *S.vini,* виживати в середовищі з більш високим вмістом спирту, має велике значення при витримуванні вина і доброджуванні виноматеріалів із вмістом спирту біля 17%. Їх знаходять в дріжджових плівках, що утворюються на поверхні, при доступі повітря, у вин з високим вмістом спирту.

Дріжджі *S. oviformis* дуже стійкі по відношенню до сірчистого ангідриду. Зокрема, французькі винороби спостерігали розмноження дріжджів *S.oviformis* у високоцукристому суслі (20%) із вмістом сірчистого ангідриду 300 мг/дм^3. Підвищена сульфітостійкість *S.oviformis* пояснюється тим, що у момент припинення бродіння дріжджі починають посилено утворювати оцтовий альдегід, який з'єднується з SO_2 і позбавляє його антисептичної дії.

Дріжджі *S.oviformis* широко використовуються у виробництві шампанського і хересу.

Хересні дріжджі (*S. oviformis var. cheresiensis*) утворюють на поверхні плівку і енергійно зброджують цукри з утворенням до 17,6 % спирту. Після закінчення бродіння на цьому ж вині вони розвиваються у вигляді плівки, в результаті окиснення спирту з утворенням ацетальдегіду (до 700 мг/дм^3), ацеталів і летких ефірів надають вину хересний тон. Хересні дріжджі застосовують також для виправлення хворих вин, що містять оцтову і молочну кислоти і котрі мають мишачий тон.

в) *Saccharomyces uvarum*. У виноградному суслі клітини мають овальну форму, злегка подовжені. Розмір (3-5)х(5-10) мкм; розташовані окремо або по 2-3 клітини. Утворюється осад і кільце; деякі штами дають плівку на поверхні старої культури.

На агаризованому суслі форма клітин більш подовжена, деякі мають циліндричну форму, розмір їх (3-5)х(6-15) мкм. На солодовому сусло-агарі колонії бежевого кольору, матові, поверхня гладка без опуклості.

S.uvarum зброджує глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу і рафінозу.

Рясне спороутворення на солодовому агарі спостерігається тільки спочатку після виділення їх з природних умов. Раси дріжджів *S.uvarum* при бродінні виноградного сусла утворюють 12-13 % спирту. При бродінні піна відсутня.

Особливістю дріжджів *S.uvarum* є висока холодостійкість.

Дріжджі цього виду зустрічаються в суслі, що спонтанно заграло, а також у виноматеріалах.

У виноробстві широко застосовується раса Новоцимлянська 3. Окремі

раси використовуються в хлібопекарській промисловості, а також при виробництві пива методом низового бродіння.

г) *Saccharomyces carlsbergensis*. У виноградному суслі клітини майже круглі, кругло-овальні або овальні, злегка подовжені; вони розташовані окремо, або попарно, або у вигляді груп, що брунькуються, розміром (4-8)х(5-12) мкм. Вони мають менш подовжені клітини, ніж *S.uvarum.* У старих культурах з'являється кільце, але не плівка.

На агаризованому суслі багато клітин мають більш подовжену форму. Колонії білуваті, вологі, гладкі, краї з широкими зубцями. Спороутворення легко протікає на твердому середовищі, 1-4 спори в асці.

Дріжджі *S.carlsbergensis* добре пристосовані до бродіння при низькій температурі 5-10°С. Вони зброджують глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу і рафінозу.

У виноградному суслі і вині в умовах України дріжджі цього виду зустрічаються порівняно рідко, хоча в Західній Європі їх дуже часто знаходять у виноградному суслі. У багатьох країнах ці дріжджі використовуються в пивоварінні (низові дріжджі).

Вплив факторів середовища на розвиток збудників спиртового бродіння

Ріст та розвиток дріжджів під час бродіння залежить від багатьох умов і в першу чергу – від кількості *кисню*, оскільки саме кисень є одним із факторів, які визначають швидкість розмноження дріжджів, їх фізіологічну активність, а інтенсивність бродіння залежить від концентрації дріжджових клітин. Аерацію необхідно проводити під час логарифмічної фази розвитку дріжджів, а особливо корисна аерація під час приготування розводки.

На активність дріжджів, на якість вина та вміст в ньому спирту і ароматичних речовин впливає *температура*, яку при бродінні необхідно підтримувати в межах 10-30 °С в залежності від культури дріжджів, яку використовують для бродіння. Різке підвищення температури навіть в межах 10-30 °С призводить до затримки брунькування, тому що дочірні клітини залишаються зв’язаними з материнською клітиною, утворюються скупчення клітин, які нагадують псевдоміцелій, збільшується доля мертвих клітин.

При підвищенні *концентрації етилового спирту* в суслі, яке бродить, розвиток дріжджів затримується, особливо при підвищенні температури.

Чим вища температура під час бродіння, тим більше спирт пригнічує життєдіяльність дріжджів. Тому чим вища температура, тим раніше починається процес бродіння, він інтенсивніше протікає, але закінчується з більшою кількістю залишкових вуглеводів, які потім утилізують молочнокислі бактерії і викликають захворювання вин.

Висока *концентрація вуглеводів* може зупинити бродіння, але при цьому додатковим фактором пригнічення розвитку дріжджів є етиловий спирт. Пов’язано це з високим осмотичним тиском, який у більшості видів дріжджів крім осмофільних викликає процес плазмолізу (зневоднення та загибель). Вміст у виноградному суслі вуглеводів в кількості до 20% не затримує бродіння.

Кислотність виноградного сусла може коливатися в межах pH 2,8 - 3,8. На підвищення кислотності дріжджі реагують зміною морфологічних властивостей. Клітини дрібнішають, набувають округлої форми, накопичують ліпіди. Процеси бродіння у більшості випадків при високій кислотності сусла пригнічуються.

Вуглекислий газ при атмосферному тискові практично не впливає на ріст, розмноження та бродильну активність дріжджів.

Вітаміни. Потреба дріжджів у факторах росту головним чином обмежується низьким вмістом вітамінів групи В: біотина, пантотенової кислоти, вітамінів B_1 (тіаміна), B_6 (пиридоксина), нікотинаміда, РР, ніацина, фолієвої кислоти, рибофлавіна.

Потреба дріжджів у факторах росту не постійна і залежить від видової належності, вона може змінюватися від джерела вуглецевого харчування, від умов культивування: аеробних або анаеробних, температури культивування та ін. Сахароміцетові дріжджі не здатні синтезувати біотин та пантотенову кислоту. З підвищенням температури культивування потреба дріжджів у вітамінах значно збільшується.

Крім вітамінів активаторами бродіння є ацетальдегід, піровиноградна кислота, янтарна кислота та її солі, ергостерин, азотисті речовини.

II. *Морфологія "диких" дріжджів - шкідників виноробства*

"Дикі" дріжджі виробляють речовини, які псують смак вина і пригнічують розвиток винних дріжджів. Деякі з них не здатні викликати спиртове бродіння. Більшість викликають захворювання і помутніння вин.

а*) Pichia hansen*. На виноградному суслі клітини мають овальну подовжену форму, іноді паличкоподібну, утворюють ланцюжки, більш-менш довгі або розгалужені, розміром (3-10)х(2-4) мкм (рис. 4). На середовищі Городкової клітини округлі, розташовані окремо або по дві. Спори круглі, але спороутворення відбувається із зусиллям.

У рідкому середовищі розвивається зморшкувата плівка. На твердому середовищі культура матова, тонкозморщена.

Дріжджі роду *Pichia* відносяться до слабозброджуючих дріжджів. Вони здатні асимілювати тільки глюкозу і фруктозу. Спиртоутворююча здатність складає 1,8-3 %. Дріжджі цього роду володіють здатністю засвоювати цукри в основному шляхом окиснення. Крім того, вони можуть розвиватися за рахунок окиснення спиртів, органічних кислот, тому добре ростуть на поверхні вже зброджених субстратів – вина, пива і інших, вміст спирту в яких не перевищує 12-13 %. У молодих винах дріжджі роду *Pichia* можуть зустрічатися у великих кількостях, що у багато разів перевищують кількість інших дріжджів.

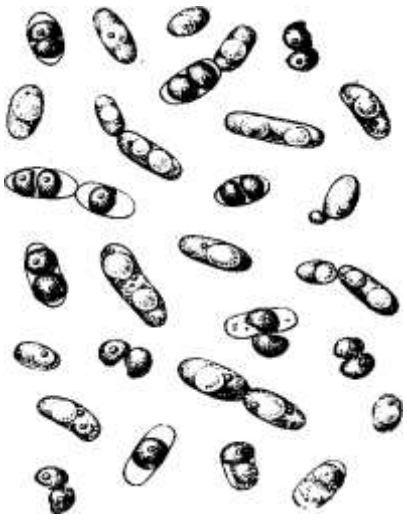


Рис. 4. Дріжджі роду *Pichia*.

Дріжджі р. *Pichia* викликають захворювання

столових вин "цвіль" і помутніння вин, розлитих у пляшки. За рахунок вмісту в цих винах залишкової кількості цукру, спирту, гліцерину і органічних кислот вони швидко розвиваються і утворюють осад, який робить вино абсолютно непридатним до реалізації.

Розвиваючись на поверхні вина у вигляді білої борошнистої плівки, дріжджі роду *Pichia* значно змінюють як склад вин, так і смакові його достоїнства. У вині збільшується кількість летких кислот, ефірів, в смаку з'являється невластивий йому фруктовий і лікарський тон, вино стає менш екстрактивним, менш забарвленим.

При розливі столових вин в пляшки з доступом повітря дріжджі роду *Pichia* швидко розмножуються і викликають дріжджове помутніння вина. Продукти обміну дріжджів роду *Pichia* гальмують розмноження і знижують бродильну енергію шампанських і хересних дріжджів. Дріжджі роду *Pichia* дуже стійкі до сірчистого ангідриду. Їх розвиток можна затримати введенням великих доз SO_2 (> 500 мг/дм^3). Вони є сильними відновниками сульфатів і сульфітів до елементарної сірки, частина якої може відновлюватися в сірководень.

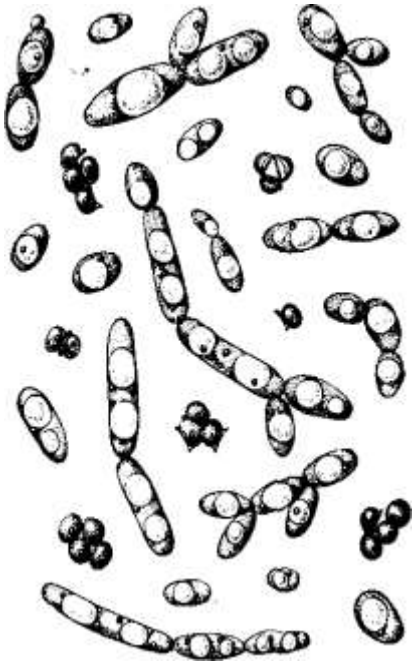


Рис. 5. Дріжджі роду *Hansenula*

б) *Hansenula anomala*. На виноградному суслі клітини еліптичні, подовжені, розміром (4-10)х(3-4) мкм, розташовані окремо або групами по дві або у вигляді ланцюжків (рис. 5), здатні до спороутворення на пивному суслі з агаром. Утворювані ними спори мають характерну капелюхоподібну форму і містяться від 1 до 4 в асці. Рідина каламутна з сухою зморшкуватою матовою плівкою сірувато-білого кольору, що сильно піднімається по стінках посудини.

Клітини, які утворюють плівку, подовжені, з великими вакуолями і ліпідними включеннями, які сильно заломлюють світло. Клітини осаду – меншого розміру, овальної або округлої форми з однорідною плазмою.

Дріжджі роду *Hansenula* зброджують глюкозу, манозу, сахарозу, галактозу, мальтозу, і частково рафінозу. Вони швидко розвиваються на поверхні виноградного і плодового сусла, утворюючи на другу добу плівку, на третю – осад. Більшість штамів можуть розвиватися на поверхні вина із вмістом спирту не вище 10 %. *Hansenula* є енергійним ефіроутворювачем. Вона надає вину стороннього аромату, обумовленого утворенням етилацетату, леткі кислоти утворює в невеликій кількості. Дріжджі роду *Hansenula* разом з *Pichia* і *Candida* є збудниками «цвілі» вина і дріжджових помутнінь. Дріжджі родів *Pichia* і *Hansenula* можуть розвиватися на меззі в ході бродіння, на поверхні вина, на стінках бочок, просочених вином.

в) *Candida mycoderma*. Клітини *C. mycoderma* мають овальну або циліндричну форму із заокругленими кінцями. Жирові відкладення накопичуються в клітинах у вигляді кульок і нерідко біполярно, сильно

заломлюють світло.

В рідкому середовищі ці дріжджі швидко утворюють суху зморшкувату плівку білого або жовтого кольору; вона товщає, і її частинки опускаються на дно. Згодом клітини, що знаходяться в осаді, за своєю формою відрізняються від клітин на поверхні. Поверхневі клітини більш подовжені, розміром (2-4)х(6-12) мкм (рис. 6). На твердому середовищі культура білувата, матова, злегка зморшкувата на поверхні. У середовищі, що містить цукор, бродіння немає; асимілюється тільки глюкоза. Хороше зростання дріжджів *Candida mycoderma* відбувається тільки на середовищах, що містять етиловий спирт, оскільки останній є для цих дріжджів джерелом вуглецю.

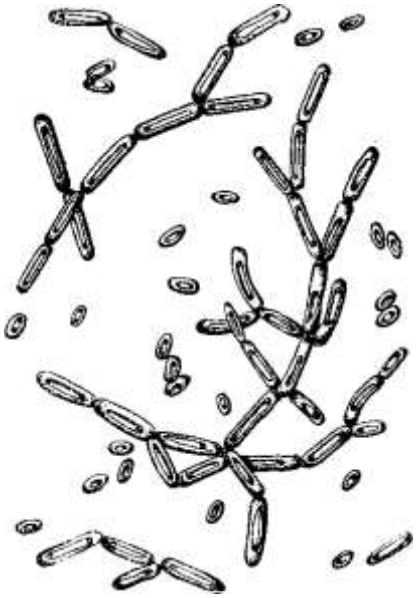


Рис. 6. Дріжджі *Candida mycoderma*

Дріжджі *C. mycoderma* є аспорогенними. Бродіння не викликають, але розвиваючись на поверхні вина при доступі повітря знижують вміст у вині спирту і екстрактних речовин. При цьому виноматеріали збагачуються леткми .кислотами, які додають вину гострий смак. Дріжджі *Candida mycoderma* здатні повністю розкласти у виноматеріалах спирт. Ці дріжджі є головним збудником хвороби вина – цвіль. Розвиток дріжджів *Candida mycoderma* гальмує розмноження винних дріжджів і знижує їх бродильну активність при вторинному бродінні. Зокрема, у виноматеріалах, що містять велику кількість продуктів обміну дріжджів роду *Candida*, хересна плівка не розвивається. Багато штамів *Candida mycoderma* можуть рости у винах, що містять 9-12 % спирту, і викликати помутніння вина в пляшках, утворюючи легко скаламучуваний осад.

г) *Schizosaccharomyces lindner*. Клітини мають еліптичну або циліндричну форму, із заокругленими кінцями і розмірами (3-5)х(6-16) мкм. Вони розмножуються шляхом ділення, а не брунькування. Тому у виноробстві їх також називають "дріжджі, які діляться" (рис. 7).

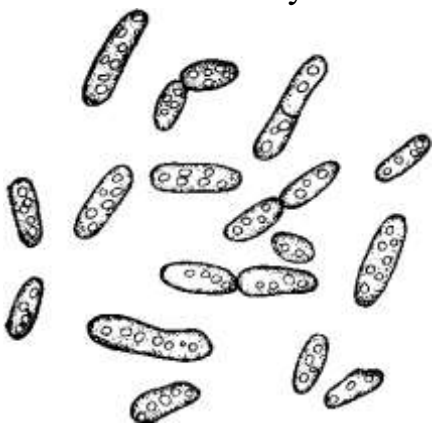


Рис. 7. Дріжджі роду *Schizosaccharomyces*

На щільних поживних середовищах клітини сильно витягуються, розташовуються окремо, парами, групами. На рідких середовищах утворюють осад пилоподібний або пластівчастий, на поверхні середовища іноді утворюють кільце.

За несприятливих умов відбувається попарна копуляція вегетативних клітин, потім утворення асків із спорами по 4 і 8 в кожному. Ці дріжджі розвиваються не тільки за рахунок глюкози і сахарози, але і за рахунок оцукрених крохмалистих субстратів мальтози і декстрину. Окиснювальна здатність у дріжджів цього роду розвинена дуже слабо. Вони засвоюють

джерела вуглецевого живлення в основному в процесі бродіння. *Schizosaccharomyces* є ауксотрофами і вимагають для свого розвитку інозит і пантотенову кислоту. Оптимальна температура їх розвитку 30ºС , тому при низьких температурах ці дріжджі розвиваються повільніше, ніж S.*vini*.

Особливістю дріжджів *Schizosaccharomyces* є дуже висока сульфітостійкість (до 1000 мг/дм^3), тому їх іноді використовують для біологічної десульфітації.

У практиці виноградного виноробства ці дріжджі зустрічаються досить рідко. Проте при виробництві плодово-ягідних вин, особливо яблучних, вони добре розмножуються і дуже шкодять, оскільки одночасно із зброджуванням цукру можуть зброджувати яблучну кислоту в спирт і вуглекислий газ. Здатність дріжджів р. *Schizosaccharomyces* використовувати яблучну кислоту застосовують у виноробстві для біологічного кислотопониження. Ці дріжджі володіють достатньою спиртоутворюючою здатністю, але зброджування цукру протікає поволі. У зв'язку із їх здатністю зброджувати крохмалисті субстрати їх використовують у виробництві рому і деяких сортів пива.

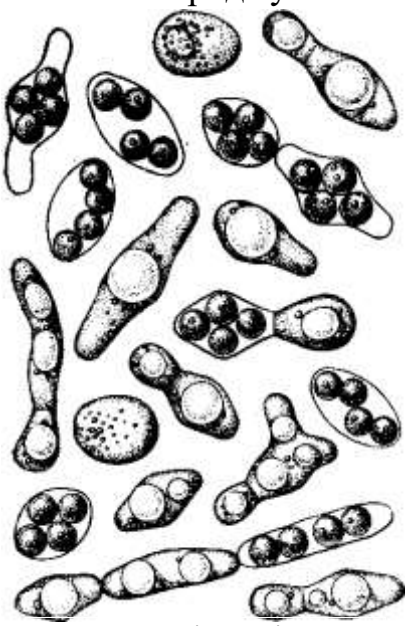


Рис. 8 Дріжджі роду *Saccharomycodes*

Особливістю цих дріжджів є висока термостійкість. Для їх знищення потрібна висока температура (70-80 °С) протягом 10-15 хв.

д) *Saccharomycodes hansen*. *У* виноградному суслі клітини великі, у вигляді лимона, загострені, подовжені на обох кінцях. Деякі клітини не мають характерної форми, а виглядають просто подовженими. Це найбільші клітини серед всіх видів дріжджів, що зустрічаються у виноградному суслі і вині, розміри (5-9)х(10-25) мкм (рис. 8). При бродінні в суслі вони розташовані окремо або попарно. Вони розмножуються брунькуванням на кінцях, причому дочірня клітина відділяється перегородкою від материнської клітини (змішана форма розмноження, тобто ділення + брунькування). Оскільки форма і розміри клітин сахаромікодів є дуже характерними, то це єдиний рід дріжджів, які можна впевнено ідентифікувати у вині шляхом звичайного мікроскопування.

При бродінні у виноградному суслі ці дріжджі утворюють осад і часто – кільце на поверхні. На агаризованому виноградному суслі форма і розміри клітин такі ж, як в рідкому середовищі. Колонії бежевого кольору, гладенькі.

Дріжджі сахаромікоди утворюють спори круглі з гладкою поверхнею, звичайно по 4 в асці. Вони зливаються попарно за допомогою трубок або проростають без копуляції.

Дріжджі роду *Saccharamycodes* зброджують глюкозу, сахарозу, і частково рафінозу. Одна з особливих властивостей цих дріжджів полягає в тому, що вони потребують комплексу тіамін-піридоксин, оскільки синтез тіаміну протікає у них тільки за участю піридоксину, і навпаки.

У виноградних суслах, які нормально бродять, вони зустрічаються рідко, але дуже часто – у сульфітованих винах і соках, що містять до 800 мг/дм^3 загальної і від 80 до 120 мг/дм^3 вільної $S0_2$. Ці дріжджі використовуються іноді для збудження бродіння соків (для десульфітації) і подальшого доброджування винними дріжджами.

При бродінні сахаромікоди утворюють етанолу в середньому 10%. Вміст летких кислот і інших вторинних продуктів ідентичний вмісту речовин, які утворюють культурні види винних дріжджів. Проте підвищена здатність до синтезу оцтово-етилового ефіру (80 мг/дм^3 при аеробному бродінні і 200 мг/дм^3 без доступу повітря), який надає неприємний кислий запах, не дозволяє рекомендувати їх для приготування вин.

У шампанському виробництві вони можуть гальмувати вторинне бродіння. Вони нерідко викликають помутніння темно-зелених сидрів, натуральних напівсолодких вин, а іноді столових і навіть кріплених. Часто дріжджі роду *Saccharomycodes* зустрічаються в плодово-ягідних винах, що 9піддалися кислотопониженню дріжджами *Schizosaccharomyces.* При зброджуванні виноградних і плодово-ягідних сусел дріжджі роду *Saccharomycodes* гальмують розвиток винних дріжджів.

Слід зазначити, що вітчизняними виноробами були виведені спеціальні штами дріжджів р. *Saccharomycodes,* здатні зброджувати сульфітовані плодово-ягідні сусла з отриманням вин, які мають чистий аромат і смак з фруктовим тоном.

За даними французьких виноробів, дріжджі сахаромікоди нерідко заражають винні підвали і склади. Це звичайно відбувається через сульфітовані сусла, які використовуються для підсолоджування вин.

У зв'язку з високою сульфітостійкістю боротьба з дріжджами роду *Saccharomycodes* дуже складна. Для їх знищення застосовуються високі дози $S0_2$ (> 850 мг/дм^3).

е)*Hanseniaspora apiculata*. Клітини загостреної форми, овальної більш-менш подовженої, іноді лимоноподібні, розміром (2-4)х(4-10) мкм, розташовані окремо або парами (рис. 9). На твердих живильних середовищах форма така ж. Спори напівкулясті з маслянистою крапелькою. Спороутворення спостерігається порівняно рідко, по 1-2 або 3-4 в асці. Вегетативне розмноження відбувається шляхом брунькування по подовжній осі материнської клітини з одного або двох її кінців.

Ці дріжджі зброджують тільки глюкозу і не асимілюють етиловий спирт.

H. apiculata – найбільш поширений в природі «бур'ян» бродіння: у багатьох виноробницьких районах складає 90% *і* вище за всю мікрофлору сусла, що поступає на бродіння. У виноробстві ці дріжджі прийнято називати апікулятусами. Вони добре розвиваються на пошкоджених ягодах, плодах, фруктах, а також в суслах, майже в два рази випереджаючи за швидкістю розмноження S.*vini.* Деякі раси накопичують 6-7 % спирту*;* утворюють багато летких кислот (до 1,5 г/дм^3) і оцтово-етилового ефіру (250 мг/дм^3), мурашину, янтарну, пропіонову і масляну кислоти. Ці продукти бродіння надають виноматеріалам сторонній тон, гальмують розмноження і бродильну енергію

винних дріжджів. Апікулятуси часто є причиною недобродів у виноробстві. Присутність цих дріжджів в шампанському виробництві ускладнює проведення освітлення шампанських виноматеріалів. Особливо небезпечні апікулятуси в суслах, що переробляються на хересні виноматеріали, оскільки продукти їх обміну гальмують зростання хересної плівки.

Дріжджі *Hanseniaspora apiculata* чутливі до сірчистого ангідриду. Доза $S0_2$ 75 мг/дм^3 затримує їх розвиток.

Незважаючи на те, що дріжджі р. *Hanseniaspora* вважаються шкідниками виноробства, деякі винороби (зокрема у Франції) одержували за участю цих дріжджів високоякісні вина з особливим плодовим ароматом, обумовленим ефірами, які синтезують апікулятуси.

ж)*Torulopsis bacillaris*. У виноградному суслі клітини овальні або майже круглі, малих розмірів (1-2)х(3-4) мкм, розташовані окремо, а частіше утворюють короткі ланцюжки або дрібні скупчення, що брунькуються. Молода культура має вигляд простого осаду. Старі культури деяких штамів дають кільця на поверхні. У клітинах містяться великі краплі жиру, що заповнюють іноді всю клітину. Дріжджі *Torulopsis bacillaris* відносяться до аспорогенних дріжджів. Розмноження відбувається багатобічним брунькуванням.

На агаризованому суслі клітини більш подовжені і вузькі, ніж в рідкому середовищі. Колонії білі, плоскі, іноді підведені з центральною вершиною.

Дріжджі *Torulopsis bacillaris* зброджують глюкозу, сахарозу, частково рафінозу. Асиміляція етилового спирту практично відсутня. Спиртоутворююча здатність коливається в інтервалі 7-10 % спирту. Утворення оцтово-етилового ефіру у виноградному суслі дуже слабке (40 мг/дм^3).

Ці дріжджі досить специфічні для винограду з гнилизною. Вони часто є причиною спонтанного зброджування сусел з білих сортів винограду.

Ці дріжджі часто зустрічаються на винограді і в суслі. Володіють осмофільними властивостями і можуть розвиватися в середовищі з концентрацією цукру 50-60%. Погано переносять низькі температури, але добре розвиваються при підвищених температурах (30-35°С). При розвитку у вині вони мало міняють його органолептичні властивості. Проте їх теж відносять до шкідників виноробства, оскільки вони можуть утворювати в суслі і вині слиз.

і)*Brettanomyces vini*. Клітини еліптичні, трохи подовжені, часто загострені з однієї або двох сторін. Зустрічаються і ковбасоподібні клітини. Розміри (2,5-8,8)х(3,1-6,8) мкм. Розташовані окремо або по дві. Іноді у вигляді коротеньких ланцюжків, що містять до 5 клітин (рис. 9). На виноградному суслі розмноження відбувається дуже поволі. Рідина прозора, на дні і на стінках посуду утворюється осад.

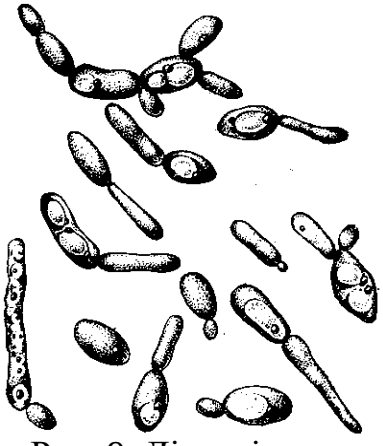


Рис. 9. Дріжджі роду *Brettanomyces*

На агаризованому соку більшість клітин такого ж розміру, як і в рідкому середовищі. Проте деякі

клітини дуже довгі (20 х 3 мкм) і мають вигляд розгалужених ланцюжків (псевдоміцелій). У клітинах помітні вакуолі і гранули. Культура кремового кольору, волога і блискуча, краї розгалужені, трохи порізані. Спори відсутні. Розмноження брунькуванням, причому брунькування двостороннє і множинне.

На поверхні вина більшість штамів утворюють тонку, гладку, сірувато-білу плівку.

Дріжджі роду *Brettanomyces* володіють високою здатністю до спиртоутворення. Вони можуть зброджувати 18-відсоткові розчини цукру з утворенням до 12-13% спирту. Проте концентрація спирту 14% вже діє на них згубно.

В порівнянні з винними дріжджами вони бродять поволі і дуже чутливі до SO_2. При введенні 100мг/дм^3 сірчистого ангідриду дріжджі *Brettanomyces* гинуть. Оптимальна температура розмноження 32ºС, при температурі нижче за 12ºС їх життєдіяльність припиняється.

На відміну від інших видів "диких" ці дріжджі дуже стійкі до сорбінової кислоти. При розвитку у виноградному суслі і вині дріжджі р. *Brettanomyces* викликають їх помутніння, з'являється сторонній яблучний тон, накопичується значна кількість оцтової кислоти. Іноді у вині утворюється ацетамід, який обумовлює "мишачий тон". В результаті вино стає непридатним до вживання.

Особливо велику шкоду ці дріжджі можуть завдати шампанському виробництву, оскільки пригнічують розвиток винних дріжджів, що веде до недобродів. Шампанське виходить каламутним, містить багато летких кислот і має слабкі ігристі властивості.

У виноробстві для боротьби з цими дріжджами використовують сульфітацію сусла, відстоювання, витримування на холоді, фільтрацію і пастеризацію.

к)*Zygosaccharomyces barker*. Клітини цих дріжджів морфологічно схожі на дріжджі роду *Saccharomyces,* але відрізняються тим, що спороутворенню у них передує злиття клітин (копуляція). Відмінною рисою дріжджів роду *Zygosaccharomyces* є їх дуже висока осмофільність. Вони розвиваються в середовищах із вмістом цукру 60-80%. Тому вони можуть зброджувати вакуум – сусло, бекмес, мед, сиропи.

Бродильна здатність дріжджів *Zygosaccharomyces* низька, вони бродять поволі і утворюють не більше 10% спирту. Можуть розвиватися у вині в присутності 12% спирту, викликаючи його псування.

л) *Debaryomyces dekkeri*. Клітини мають округлу, рідше овальну форму. На виноградному соку в триденній культурі розміри клітин (5-15)х(3-4) мкм. Утворюють товсту плівку, а рідина спочатку залишається прозорою. Бродіння непомітне. На твердому середовищі колонії бежево-рожеві, матові і зморшкуваті.

Дріжджі р. *Debaryomyces* не зброджують ані глюкози, ані інших цукрів, але асимілюють їх так само, як і спирт. Дуже чутливі до низьких температур і добре розвиваються при підвищених температурах (30-35°С).

У клітинах містяться крапельки жиру. Характерним для цих дріжджів є багатобічне брунькування. Дріжджі цього роду відносяться до шкідників,

оскільки можуть утворювати в суслі і вині слиз.

м) *Rhodotorula havrison*. Характеризується сильним поліморфізмом, клітини мають округлу форму, овальну, витягнуту, зігнуту. Містять каротиноїдні пігменти, які надають їм забарвлення від жовтого до червоного кольору. На поверхні виноградного соку утворюють кільце червоне або оранжеве. Глюкозу засвоюють окисненням, спирту не утворюють. Зустрічаються в напівсолодких і десертних винах, проте в умовах виноробних заводів України їх виявляють вкрай рідко.

ЧИСТІ КУЛЬТУРИ ДРІЖДЖІВ В БРОДИЛЬНИХ ВИРОБНИЦТВАХ

Для правильного протікання бродильних процесів останнім часом у виноробстві та пивоварінні використовують чисті культури дріжджів (ЧКД). ЧК – це сукупність клітин одного виду які мають стійкі ознаки. Причинами, які стимулюють використання ЧКД, є їх бродильні властивості, боротьба з конкурентною мікрофлорою – бур'янами бродіння та шкідниками спиртового бродіння, а також здатність ЧКД синтезувати певні вторинні та побічні продукти бродіння, які суттєво впливають на смак та букет напоїв.

Для виробництва *пива* використовують пивні дріжджі різних рас. Вибір раси визначається специфікою технологічного процесу. Перед введенням дріжджів у сусло здійснюється їх підготовка. В умовах мікробіологічної стерильності відбувається накопичення біомаси дріжджів в кількості, яка необхідна для початку бродіння.

У процесі бродіння пивного сусла розрізняють дві стадії:

– на першій стадії (*головне бродіння*) зброджується основна маса цукрів пивного сусла. Результатом цього процесу є молоде пиво. Бродіння проводять за певним температурним графіком. Тривалість головного бродіння залежить від режимів бродіння, хімічного складу початкового сусла, від кількості внесених дріжджів і т.д. і складає від 7 до 12 діб.

– після закінчення головного бродіння молоде пиво при температурі не більше 5 ^{o}C перекачують на *доброджування* (друга стадія) та дозрівання. Осілі дріжджі збирають, проціджують, промивають водою при температурі 1-2 ^{o}C. Після цього дріжджі готові до повторного використання. Зберігають рідкі дріжджі протягом двох діб під водою при температурі 1-2^{o}C. Основна мета доброджування – одержання напою з приємним смаком, специфічним для даного виду пива ароматом і достатнім насиченням вуглекислим газом. Тривалість доброджування залежить від сорту пива (від 20 до 90) діб і регламентована у відповідній нормативно-технічній документації.

Використання ЧКД у виноробстві тісно пов'язано з введенням в практику антисептика – сірчаного ангідрида. Процес цей більш складний, ніж в пивоварінні. Пивне сусло звичайно готується відносно постійного складу, стерилізується кип'ятінням на протязі біля 2 годин, тому внесення ЧКД дозволяє отримувати пиво стандартної якості. Більшість мікроорганізмів не здатні розвиватися в пиві, оскільки пригнічуються антимікробними

властивостями хмелю, зниженням pH до 3,8-4,0, утворенням CO_2, анаеробними умовами та збільшенням вмісту етилового спирту.

Якість *вина* головним чином залежить від сорту винограду та району його культивування, ніж від дріжджів. Крім того, виноградне сусло *не стерилізується*, і тому в бродінні приймають участь крім ЧКД і епіфітні (поверхневі) дріжджі винограду.

В країнах, які виготовляють вина і використовують ЧКД нерегулярно, бродіння сусла проходить на спонтанній мікрофлорі. Науковці та практики більшості країн вважають за необхідне в майбутньому використовувати ЧКД більш регулярно.

В наший країні «Загальними правилами збору і переробки винограду на виноматеріали» КДУ 00011050-15.93.12-01:2008 рекомендується бродіння для всіх типів вин проводити на ЧКД.

«3.14 Бродіння сусла для всіх типів вин проводять на дріжджах чистої культури. Приготування дріжджових розводок та способи їх використання зазначені у відповідних інструкціях. Вносять готову дріжджову розводку у кількості 1-2% до об'єму зароджуваного сусла або 3-5% м'язги. Під час переробки хворого та пошкодженого винограду об'єм дріжджової розводки збільшують до 7-10%»

Зброджування стерильного виноградного соку в лабораторних умовах з використанням ЧКД дозволяє порівняти їх між собою. Відомо, що раси винних дріжджів відрізняються між собою за багатьма властивостями: швидкістю розмноження, швидкістю зброджування сусла, сульфітостійкістю, термо- та холодостійкістю, кислотовитривалістю, швидкістю освітлення вин а також за здатністю утворювати спирт.

Вказані властивості враховують при відборі культури дріжджів для бродіння сусла в різних умовах. Тільки з використанням ЧКД можна отримати напої з наперед заданою якістю. Відбувається це тому, що внесена в сусло в певній кількості розводка ЧКД потрапляє в оптимальні умови. Дріжджі енергійно розмножуються, пригнічують розвиток дикої мікрофлори, активно проводять бродіння, швидко вибродкують вуглеводи.

До дріжджів, які використовують в промисловості, висувають такі вимоги:

- здатність до глибокого вибродкування сусла;
- сульфітостійкість;
- холодо- та термостійкість;
- висока спиртоутворююча здатність при високій концентрації цукрів в суслі (більше 22%);
- пилевидна структура осаду– при необхідності більшого контакту дріжджів з середовищем, при зупинці бродіння;
- пластівцеподібна структура осаду (конгломератні раси) – для кріплених виноматеріалів, з метою швидкого освітлення виноматеріалів, для шампанізації вин;
- ароматоутворення;
- стійкість до спирту, кислот, антисептиків.

Особливе значення мають дріжджі, оптимальна температура яких не співпадає з оптимальними температурами МКБ, тобто створюються несприятливі умови для останніх.

Виноградне сусло потрапляє на бродіння нестерильним і навіть при гарному відстоюванні з сульфітацією містить в 1см³ десятки тисяч клітин епіфітних дріжджів. Якщо невелику кількість культурних дріжджів внести у велику ємність з суслом, то мікрофлора, яка міститься в суслі в значній кількості, пригнічує розвиток ЧКД. Тому ЧКД необхідно попередньо розмножити для того, щоб вона могла своєю масою подавити природну мікрофлору.

Доведено, що для витіснення спонтанної мікрофлори необхідно внести в 1дм³ сусла 100 млн. дріжджових клітин.

Винзаводи, пивзаводи отримують ЧКД або у вигляді колоній на твердому середовищі або у вигляді осаду в рідкому середовищі. В наш час більшість вин та пивзаводів використовують імпортовані – активні сухі дріжджі. З ЧКД готують розводку – це поступове збільшення біомаси та активності ЧКД. Під час приготування розводки необхідно дотримуватися стерильності. Готують її в два етапи спочатку в лабораторних умовах, а потім - у виробничих.

Для того, щоб забезпечити нормальне бродіння, у виноробстві вносять від 3% (за об'ємом) дріжджової розводки на початку сезону і знижують до 1% в другій половині сезону. При переробці хворого або пошкодженого винограду кількість розводки збільшують до 5–10%.

На великих сучасних підприємствах розводку готують безперервним способом у потоці. Вона має містити дріжджових клітин 100–150 млн/см³. Для забезпечення бродіння сусла на ЧКД необхідно, щоб кількість її клітин в суслі була приблизно в 10 разів більша, ніж містилося епіфітних дріжджів в суслі до внесення ЧК.

Використання ЧКД у виробництві вина має цілий ряд переваг:

- процес бродіння проходить рівномірно;
- не розвиваються бур'яни бродіння;
- збільшується вихід спирту;
- зменшується термін бродіння;
- вино має чистий смак та приємний аромат;
- освітлення відбувається швидко завдяки щільному осаду, який властивий ЧКД;
- молоде вино більш стійке до захворювань при зберіганні.

ВЗАЄМОВІДНОШЕННЯ ДРІЖДЖІВ У БРОДИЛЬНИХ ВИРОБНИЦТВАХ

Антагоністичні взаємовідносини, при яких один мікроорганізм пригнічує розвиток іншого в мікробіології було відомо давно. Феномен таких взаємовідносин серед сахароміцетових дріжджів було виявлено серед штамів Оксфордської генетичної колекції в 1963 році. Пізніше Н.І. Бур'ян (професор, співробітник Інституту винограда та вина «Магарач») виявила, що

антагоністичні відносини існують не тільки у представників дріжджів роду *Saccharomyces*, але і у родів *Torulopsis, Pichia, Hansenula* та ін. Штами-убивці родів *Torulopsis, Pichia, Hansenula* можуть убивати штами родів Candida, Saccharomyces.

Доведено, що існують три фенотипи дріжджів: *убивці* (Killer – K), *нейтральні* (Neutral – N) та *чутливі* (Sensitive – S). При спільному культивуванні дріжджів - убивць та чутливих більша частина останніх гине. Дріжджі нейтральні не вбивають чутливі і не гинуть від дії убивць.

Дріжджі всіх трьох фенотипів були виявлені і серед ЧКД колекції НДІВіВ «Магарач», серед дріжджів у спонтанно зброджених суслах. При цьому визначення фенотипів колекційних дріжджів довело, що серед 454 рас біля 90% відносяться до фенотипу чутливі, тоді як в спонтанно зброджених суслах є дріжджі всіх трьох фенотипів, але більшість із них є убивці та нейтральні. На сьогоднішній день експериментально доведена можливість зміни фенотипів дріжджів при зберіганні.

Речовина, яку синтезують дріжджі-убивці, за хімічною природою - високомолекулярний білок-токсин з абсолютно специфічним спектром дії, який вражає чутливі дріжджі найбільше в період розмноження. Дію токсину на чутливі клітини вивчають давно, але досі немає кінцевої моделі, яка б розкривала всі зміни, що відбуваються під час дії токсина на чутливу дріжджову клітину.

Можна зробити висновок, що ЧКД, яка використовується як технологічна мікрофлора, повинна бути фенотипу кілер. В такому випадку є надія, що процес бродіння піде саме на ЧКД а не на епіфітній.

ЧКД при внесенні в нестерильне сусло протидіє диким дріжджам, але серед них обов’язково є раса з більшою бродильною активністю та швидкістю розмноження. Дріжджі цієї раси можуть витіснити внесену ЧКД.

В зв’язку з цим необхідно вміти ідентифікувати дріжджі. Методи ідентифікації можна розподілити на дві групи:

1) сучасні, новітні складні методи електрофорезу клітинних білків, ДНК, хромосом.
2) традиційні біохімічні та експрес-методи визначення продуктів обміну речовин, морфолого-фізіологічні характеристики та визначення фенотипів дріжджів.

Проводять ці дослідження шляхом визначення належності дріжджів до того чи іншого виду з використанням критеріїв класифікації винних дріжджів.Для контролю процесу бродіння рекомендують метод ідентифікації фенотипів дріжджів, який дозволяє проконтролювати наскільки ЧКД, яка була внесена в нестерильне сусло, оволоділа середовищем.

У якості тестерів (індикаторних культур) використовують раси дріжджів виду S.vini Берегово 4–7 (кілери) та Кахурі 7 (чутливі), які зберігаються в колекції НДІВіВ «Магарач».

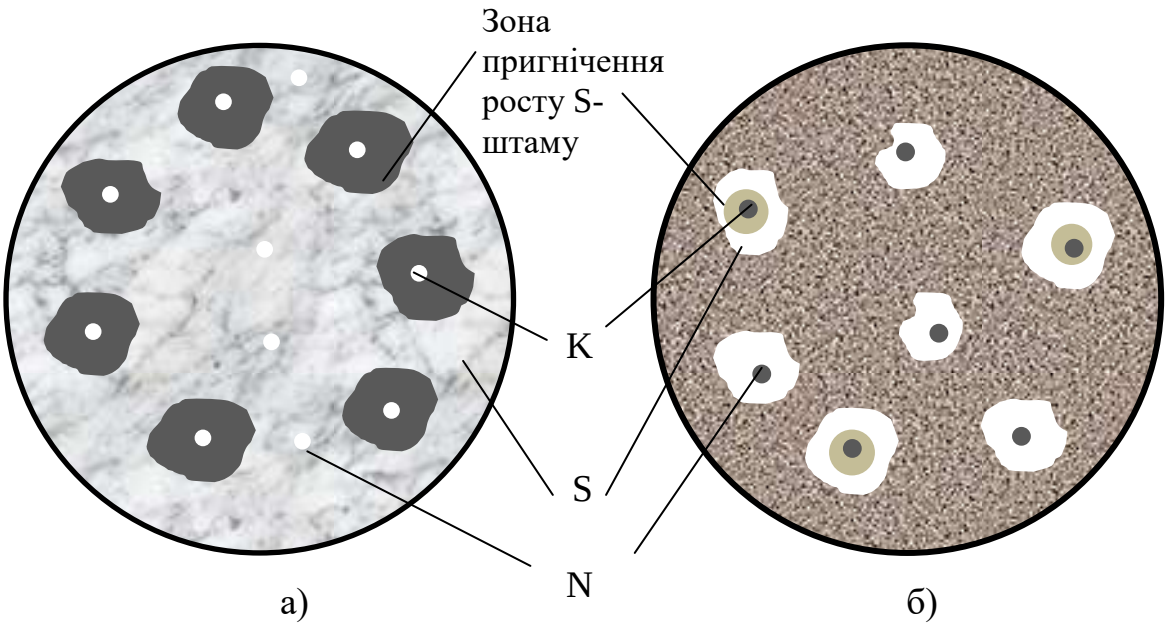


Рис 10. а) Колонії штамів, що досліджуються, на газоні чутливого штаму;
б) колонії штаму-кілера на газонах штамів, які досліджуються

Штами, на газонах яких кілер утворює зони пригнічення росту, є *чутливими* (рис. 10. а)).

Штами, навколо колоній яких утворюються зони пригнічення росту на газоні чутливих штамів, є *кілерами* (рис 10. б)).

Для того, щоб бродіння пройшло на ЧКД, необхідно дотримуватися таких вимог:

- освітлення сусла треба проводити таким чином, щоб кількість епіфітної мікрофлори значно зменшувалася;
- використовувати конкурентноспроможні раси дріжджів фенотипу кілер;
- дріжджову розводку вносити в сусло на стадії активного бродіння в достатній кількості;
- швидко перемішувати внесену дріжджову розводку зі всією масою сусла.

Необхідно пам’ятати, що зниження температури до 6-8^{o}C та підвищення температури до 36-37^{o}C призводять до втрати у кілерів здатності вбивати, але існують термотолерантні штами дріжджів-кілерів, які при 42^{o}C не втрачають своєї здатності.

Дріжджі-кілери викликають певні ризики при виробництві пива на підприємствах, які використовують чутливі штами дріжджів.

Багаточисельні дослідження довели, що при зброджуванні сусла *комплексом* дріжджів отримують кращі результати, ніж при зброджуванні однією расою (*синергічна дія*). Сумісне культивування *S.vini* та *Hanseniaspora apiculata* сприяє збільшенню спиртоутворювальної здатності і зменшенню синтезу летких кислот у порівнянні з вихідною расою. Отже, *H.apiculata* є бур’яном бродіння, але у співвідношенні 1:10 з винними дріжджами дає гарні результати.

Вивчення комплексних іспанських хересних дріжджів показало, що до їх складу входять дріжджі роду *Hansenula* – активні ефіроутворювачі. Присутність цих дріжджів прискорює утворення плівки в процесі хересування. Бродіння закінчується раніше, ніж при використанні тільки ЧКД основного виду.

В наш час у виноробстві використовують гібридні дріжджі, які отримують при схрещуванні ЧКД з дикими дріжджами. Такі дріжджі мають високу енергію бродіння, зберігають здатність зброджувати різні вуглеводи.

Гібридні культури починають і закінчують бродіння на один- два дні раніше, ніж материнські. Вони повністю зброджують вуглеводи, освітлення відбувається набагато швидше. Вина, які отримують за допомогою гібридних дріжджів, за хімічним складом та за органолептичними показниками кращі, ніж вина, отримані на материнських дріжджах.

МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПЛІСЕНЕВИХ ГРИБІВ - ШКІДНИКІВ ВИНОГРАДНИКІВ ТА ВИНОРОБСТВА

До міцеліальних (цвілевих) грибів відносяться мікроскопічні гриби-сапрофіти, що живляться органічними речовинами мертвих залишків і створюють на їх поверхні нальоти різного кольору. У вині міцеліальні гриби не розвиваються, оскільки спирт, що міститься в ньому, перешкоджає їх розмноженню. Проте вино, налите в тару із запахом цвілі або укупорене запліснявілими пробками, псується, тому що деякі гриби (*Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* і ін.) легко розмножуються на залишках сусла і вина, утворюють леткі речовини, які добре розчиняються у вині і надають їм пліснявілий тон. Активно розмножуються цвілеві гриби на погано вимитій, дерев'яній і залізобетонній тарі. Тому виноробницькі ємності спочатку слід ретельно мити водою, потім обкурювати газоподібним $S0_2$ або обполіскувати 0,1% розчином сірчистого ангідриду. Особливо шкодять міцеліальні гриби, розвиваючись на виноградниках. При цьому можуть піддаватися псуванню виноградна лоза, листя, грона.

У виноробстві знайшли широке застосування ферментні препарати, які отримують з деяких цвілевих грибів (переважно, р. *Aspergillus).* Ферментні препарати пектолітичної, протеолітичної, целюлолітичної і геміцелюлазної дії прискорюють відділення сусла від мезги і його освітлення, збільшують вихід сусла і інтенсифікують біохімічні процеси, що протікають при дозріванні вин.

Основні представники

а) *Botrytis cinerea* (виноградна або попеляста цвіль). Міцелій багатоклітинний, конідієносці ниткоподібні, деревоподібно розгалужені. На їх кінцях утворюється малопомітне здуття, від якого відходять тонкі стерігми з сіруватими конідіями, розташованими у вигляді грон. При дослідженні мікрофлори виноградного сусла конідії ботрітіса легко відрізнити від дріжджів за крупнішими розмірами (10-14)х(7-9) мкм. За практичним значенням *B. cinerea* займає серед цвілевих грибів, які розвиваються на виноградній гроні в період її дозрівання, одне з перших місць.

Зимує ботрітіс у формі склероціїв – щільних міцеліальних утворень розміром (2-4)х(1-2,5) мм, забарвлених в темний колір. Склероції утворюються восени на опалому листі, на різних частинах виноградного куща. За сприятливих умов проростання склероціїв відбувається або в конідіальну, або в сумчасту стадію (статеве розмноження).

Залежно від умов його розвитку він може впливати на якість вина як позитивно (благородна гнилизна), так і негативно (сіра гнилизна). Окрім прямого впливу на склад і якість вина його дія може бути ще непрямою, а саме: фунгіциди, які використовують проти сірої гнилизни, частково залишаючись на ягодах винограду до моменту їх збору, можуть надалі затримувати спиртове бродіння і негативно позначатися на смакових якостях вина (при дозах більше 2 мг/дм^3).

За несприятливих для виноробства умов (холодна дощова осінь, підвищена вологість повітря) *B. cinerea* швидко розмножується на ягодах винограду у вигляді сірого нальоту (сіра гнилизна). Спори гриба проникають у виноград через тріщини на ягоді. Спори проростають, утворюють міцелій. При дощовій погоді з пошкодженої ягоди вимиваються цукри і якість сировини різко знижується. Грибок вражає не тільки шкірку, але і проникає в м'якоть. Ботрітіс використовує цукор ягід, який ще не накопичився в достатній кількості, а надходження нових порцій цукру в ягоди з листя утруднене через ураження грибом плодоніжки ягід.

B. cinerea виробляє антибіотичну речовину – ботрітіцин, яка затримує розмноження і бродильну здатність дріжджів. Антибіотик інактивується сульфітацією сусла (~ 50 мг/дм^3) або тривалим нагріванням до 120°С.

У винограді, ураженому *B. cinerea,* утворюється багато оксидази (каталаза, глюкозооксидаза, аскорбіноксидаза, уреаза). Це призводить до того, що в білих столових винах згодом виникає зміна кольору на бурий і оксидазний кас, які пов’язані з ферментами цвілі.

Чим більше виноград уражений ботрітісом, тим більше зв'язаної і менше вільної сірчистої кислоти виходить при сульфітації сусла. Тому чим більший ступінь ураження винограду, тим більшу дозу $S0_2$ потрібно вводити в сусло. Так, якщо для інактивації оксидази в суслі з винограду із ступенем ураження ботрітісом ~10% достатня доза 150мг/дм^3, то для сусла з винограду, ураженого на 40%, необхідна вже доза сірчистого ангідриду 250мг/дм^3. При зброджуванні сусла, одержаного з уражених грибком ягід, у виноматеріалах утворюється в 3,5 рази більше піровиноградної кислоти, в 2 рази більше кетоглутарової кислоти і на 58% більше ацетальдегіду. Ці речовини легко зв'язують SO_2, тому для інактивації окиснювальних ферментів і запобігання побурення, оксидазного касу потрібна підвищена доза сульфітації.

Окиснювальні ферменти з сусла, одержаного з винограду, ураженого ботрітісом, можна, видалити шляхом обробки його бентонітом (3-5 г/дм^3) з поліакриламідом (2 мг/дм^3). Сусло і вино з винограду, ураженого на 20% грибом, після такої обробки мають добрий смак і забарвлення (зникають бурі тони).

Для видалення плісеневого тону і оксидазного побурення у винах без

застосування $S0_2$ рекомендується нагрівання до 55-60°С протягом 15хв, потім охолоджування і обробка активованим вугіллям (1 г/дм^3), діатомітом (1 г/дм^3), желатином (0,1 г/дм^3) і бентонітом (1 г/дм^3). Вина, що мають в ароматі і в смаку сильні пліснявілі тони і уражені оксидазним касом, можна виправити, витримуючи їх під хересною плівкою. Перед цим їх пастеризують при 70°С протягом 5хв.

Для виробництва вин з винограду, частково ураженого сірою гнилизною, існує технологія, яка добре зарекомендувала себе. Вона передбачає введення 5% SO_2, обробку препаратом пектофоєтидин ПІОХ, бентонітом і поліетиленоксидом.

За сприятливих погодних умов (сонячна, суха погода) ботрітіс, розвиваючись на ягодах, що досягли повної зрілості, викликає "благородне гниття" винограду. Грибок вражає тільки шкірку переважно білих сортів винограду. Вона буріє, стає пухкою і вода з ягід легко випаровується. Сік концентрується і цукристість різко зростає (майже в два рази). Ягоди зародзинюються, відбуваються глибокі біохімічні зміни їх складу. При "благородному гнитті" *B.cinerea* додає винам своєрідні тони букета, утворюється гліцерин, глюконова кислота, комплекс різних ферментів. Це дає можливість одержувати з такого винограду натуральні напівсолодкі вина високої якості. Умови для розвитку на винограді "благородної гнилизни" спостерігаються постійно тільки в певних районах Франції, Німеччини, Угорщини, в Криму. Грибок віддає перевагу сортам винограду, багатим азотистими речовинами.

У суслах з сильно ураженого *B.cinerea* винограду домінує раса дріжджів *Torulopsis stellata,* які асимілюють переважно фруктозу. Звичайні винні дріжджі дуже чутливі до присутності ботритису.

б) *Cladosporium cellare* (підвальна цвіль). Розвиваючись на твердій поверхні, молодий міцелій має спочатку білий колір, потім темніє до густо-чорного. Конідієносці слабо розгалужуються, конідії крупні одно- або двоклітинні. Форма і довжина конідій змінюється залежно від умов живлення, температури, вологості. У суслі міцелій гриба розростається у вигляді грудочки вати.

C.cellare може покривати стіни, стелі і різні предмети в старих підвалах. Цвіль спускається по стінах темно-зеленими довгими пасмами. Гриб добре росте на пляшках, пробках, залізних гратах, електропроводах, куди з пилом потрапляє невелика кількість органічних речовин. Міцелій гриба надзвичайно багатий різноманітними ферментами, що дозволяє йому використовувати як джерело вуглецю пари оцтової кислоти, спиртів і навіть целюлозу. Джерелом сірки можуть служити пари сірковуглецю, сірчистого ангідриду, сірководню, а джерелом азоту – аміак і частково азот повітря. Широкий набір ферментів, висока життєздатність і виняткова невибагливість гриба по відношенню до джерел живлення дозволяє йому розвиватися в таких місцях, які для інших цвілевих грибів виявляються непридатними.

На якість вина *C.cellare* впливу не робить, проте при розвитку в суслі здатний руйнувати винну і лимонну кислоти, внаслідок чого кислотність соку

сильно знижується.

Підвальна цвіль дуже чутлива до спирту: при 1,6% спирту розвиток гриба припиняється, а при 2% він гине.

в) *Sphaerulina intermixta.*. Часто зустрічається на фруктах, в бочках, чанах, на стінах винних підвалів. Утворює чорні слизові плями, які є міцелієм гриба з великою кількістю овальних клітин, що нагадують дріжджові. У рідких субстратах ці клітини звичайно слабо пов'язані з гіфами, легко відриваються, вільно плавають в рідині і розмножуються брунькуванням, подібно до дріжджів. За несприятливих умов гіфи і конідії можуть переходити у форму міцного міцелію (геми) з потовщеними стінками, багатими жиром. Потрапляючи в сусло, геми дають нитки, на яких зростає велика кількість дріжджоподібних конідій. На поверхні утворюється плівка з ниток, а вище, біля стінок посудини, знов з'являються міцні клітини – геми. Гриб може живитися парами спирту і розвиватися у вигляді слизового нальоту на стінках винного підвалу.

У вині цей гриб не розвивається, оскільки при концентрації спирту більше 2% він відмирає. Проте розвиваючись у виноградному суслі *S.intermixta* перетворює його на слизову масу із вмістом спирту до 2%. Гриб знижує цукристість сусла і утворює оцтову, молочну і янтарну кислоти.

г) *Mucor racemosus*. Відноситься до нижчих грибів. При зростанні міцелію в суслі викликає спиртове бродіння з утворенням від 2,5 до 7% спирту. Розмноження відбувається за допомогою спорангієспор. Крім того, розмноження може відбуватися також конідіє-дріжджоподібними утвореннями, так званими мукоровими дріжджами. Вони утворюються шляхом розпаду гіф на окремі короткі фрагменти при попаданні міцелію в рідке живильне середовище з недостатнім находженням повітря.

д) *Monilia*. Більшість представників цього роду розмножуються подібно до дріжджів – брунькуванням. *Monilia* вражає плоди з пошкодженим епідермісом. Спочатку з'являються бурі плями, під якими м'якоть плоду розм'якшується. Пізніше на плодах з'являються бородавки, які можуть мати концентричні кільця. Вони є органами плодоносіння гриба. Гриб може переходити в стадію спокою і в такому стані зимувати. Весною конідії розсіваються, викликаючи зараження інших плодів. *Monilla vini* надає вину "мишачий" тон, який усунути майже неможливо.

е) *Penicillium* і *Aspergillus*. У них багатоклітинний міцелій, розмноження здійснюється переважно конідієспорами, забарвленими в різні кольори і такими, що утворюються на конідієносця характерної форми. Плодові тіла у цих грибів утворюються рідко і мають вигляд дрібних кульок, усередині яких безладно розташовані сумки з спорами. *Penicillium* та *Aspergillus* можуть розвиватися на поверхні сусла, на бочках, на стінках підвалів і тому є небезпечними ворогами виноробства. Тара і виноматеріали, заражені цвіллю, мають неприємний плісеневий тон, який неможливо усунути. Аскоміцетова цвіль може проникати в бочкову клепку на глибину 2,5см.

ж) *Rhizopus nigricans*. Розвивається на стиглих ягодах, викликає появу чорних плям. Руйнує шкірку винограду, виділяє речовини, які надають винам

пліснявий запах і смак.

і) ***Fusarium***. Є збудником хвороби виноградників (паразитарний хлороз або фузаріоз). Призводить до потоншення лози, пожовтіння листя. Фузаріоз зменшує цукристість винограду. Сприяє розвитку фузаріозу холодна затяжна весна. Для боротьби з фузаріозом здійснюють обприскування 1% розчином бордоської рідини.

к) ***Uncinulla***. Росте на поверхні зелених тканин виноградного куща у вигляді сірого нальоту. Викликає захворювання винограду – борошниста роса. З метою боротьби із захворюванням виноградники обпилюють сумішшю сірки з вапном.

л) ***Plasmopara viticola***. Викликає захворювання винограду мільдю. На листі, ураженому мільдю, з'являються жовті "масляні" плями. З нижньої сторони листа плями покриваються білим борошнистим нальотом. При сильному розвитку захворювання листя повністю обсипається. Ферменти, що продукуються грибом, вражають клітковину ягід. Ягоди покриваються брудно-сірим нальотом. Для боротьби з мільдю використовують обробку різними хімічними препаратами (бордоська рідина, суміш динітророданбензолу з хлорокисом міді).

МОРФОЛОГІЧНІ, КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ОЦТОВОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Оцтовокислі бактерії (ОКБ) є дуже поширеними в природі мікроорганізмами. Вони зустрічаються на плодах, квітках, в напоях, які виробляються шляхом бродіння, в грунті. ОКБ містяться на спілому винограді, частіше на загнилих гронах, але і в меншій кількості, ніж дріжджі.

В морфологічному відношенні ОКБ – це одноклітинні організми, неспоротворні. Мають форму безбарвних коротких паличок – поодиноких, сполучених попарно, а найчастіше у вигляді ланцюжків. Форма клітин непостійна і залежить від виду бактерій, температури і складу середовища. Палички можуть бути прямі або злегка зігнуті, іноді еліпсоїдної форми, грамнегативні (Гр.$^-$).

При температурі 12-15ºС бактерії мають вигдяд коротких товстих паличок, при 15-33ºС – форму ланцюжків, а при 42-45ºС деякі клітини приймають форму довгих ниток із здуттям.

Оболонка клітин щільна, еластична, двошарова. Зовнішній шар її легко розбухає з виділенням особливої клейкої речовини, яка обволікає клітини, сприяє утворенню плівки.

Деякі види ОКБ рухомі, але проявляють цю властивість залежно від умов культивування. При електронно-мікроскопічному дослідженні виявляються джгутики. Джгутик відходить від одного з полюсів клітини, часто субполярний (тобто трохи збоку). Іноді спостерігається розщеплювання джгутика на 3-4 і тонші нитки. Зустрічається також і перитрихіальне розташування джгутиків.

За несприятливих умов розвитку ОКБ з'являються інволюційні форми: гіпертрофовані клітини – гіганти (довжина до 40 мкм), із здуттям, кулясті,

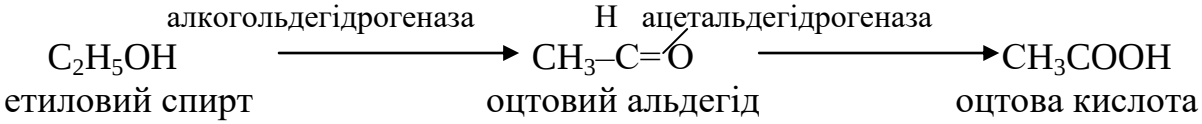
зігнуті і ін. Інволюційні форми ОКБ нерухомі.

До групи ОКБ відносяться два роди бактерій: *Acetobacter* і *Gluconobacter* .

Рід *Acetobacter* об'єднує п'ять видів, а рід *Gluconobacter* представлений лише одним видом (*G. oxydans)* .

ОКБ відносяться до облігатних аеробів, проте вони здатні виживати і навіть розмножуватися в анаеробних і напіванаеробних умовах (у вині, налитому в резервуари). ОКБ розмножуються надзвичайно швидко. Наприклад, декілька клітин УКБ, поміщених на поверхні вина, за, короткий час утворюють 300 млрд. клітин – шар в $1м^2$, а загальна маса їх складає 1г.

Характерною властивістю всіх ОКБ є здатність окиснювати етиловий спирт в оцтову кислоту при доступі повітря за схемою:



Сумарно оцтовокисле бродіння виражається наступним рівнянням:

$$C_2H_5OH + O_2 = CH_3COOH + H_2O + Q \qquad (489 кДд)$$

З 1г етанолу утворюється близько 1г оцтової кислоти.

ОКБ в результаті окиснення спирту накопичують в середовищі до 11-12 % оцтової кислоти, яка припиняє їх життєдіяльність. Більшість УКБ після окиснення всього спирту в середовищі здатна здійснювати переокиснення оцтової кислоти за рівнянням:

$$CH_3COOH + 2O_2 = 2CO_2 + 2H_2O$$

ОКБ досить спиртостійкі мікроорганізми (11-12 % спирту – гранична концентрація). ОКБ більше за інші бактерії пристосовані до кислого середовища. Максимальна швидкість росту відзначається при pH 5,4-5,8, проте деякі види розмножуються при pH 2,5-3,0. Температурний оптимум ОКБ лежить між 15 і 37ºС і різний для різних видів бактерій. За таких умов ОКБ швидко розмножуються, утворюючи ланцюжки. Температурний мінімум майже однаковий для всіх видів: 6-10ºС. Температурний максимум коливається в межах: 35-45ºС.

Характерною особливістю багатьох видів ОКБ є розмноження на поверхні живильного середовища – утворення плівки. Досягнувши достатньої товщини плівка опускається і починає рости в глибині середовища до тих пір, поки на поверхні не утворюється новий шар, що припиняє доступ O_2. У одних видів ОКБ плівка слизиста, у інших - суха. Особливістю плівки, що утворюють ОКБ, є її здатність до "тягучості"- вона заповзає на стінки скляного посуду.

ОКБ здатні синтезувати слизисті речовини (декстрани, левани), які можуть обумовлювати "тягучість" рідини.

На ОКБ негативно впливає сонячне світло. Проте після припинення опромінювання більшість клітин протягом 24год відновлюють свої функції.

У виноробстві мають значення наступні види ОКБ.

а) ***Acetobacter orleanense***. Клітинки паличкоподібні, частіше одиночні або сполучені в ланцюжки. Розміри клітин (0,3-0,4)х(1,6-2,4) мкм. На поверхні вина ці бактерії утворюють тонку плівку, яка не піднімається по стінках посудини. Клітини плівки міцно зв'язані, і тому вино під плівкою звичайно абсолютно прозоре. Плівка добре розвивається на поверхні рідини і нею не змочується. Гранична для бактерій концентрація спирту 10-12 % і оцтової кислоти до 9,3%. Оптимальна температура 25-30 ºС. При незначному вмісті кислоти і низькій температурі можуть окиснювати оцтову кислоту до CO_2 і води. Оскільки ці бактерії дуже продуктивні, їх застосовують для виробництва оцту.

б) ***Acetobacter vini aceti***. Клітини дрібні, у вигляді коротких паличок або круглясті, укорочені, овальної форми, розміром (0,3-0,4)х(0,8-2,0) мкм (рис. 11). Розташовуються одиночно або по дві-три клітини, ланцюжки утворюють рідко. Плівка ніжна, пухка, легко опускається в нижні шари вина і дає каламуть. Гранична концентрація спирту 9,5%. Утворюють до 7% оцтової кислоти. Нездатні до переокиснення. Оптимальна температура 28-33ºС, мінімум – 10ºС.

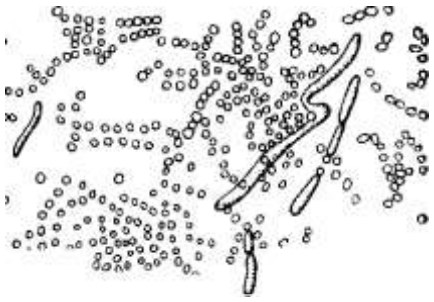


Рис. 11. *Acetobacter vini aceti*

в) ***Acetobacter ascendens***. Мають вид коротких паличок розміром (1,2-1,7)х(1,8-2,0) мкм. Клітини одиночні або частіше здвоєні у вигляді вісімки, рідко у вигляді довгих ланцюжків. На поверхні вина утворюють тонку, однорідну з голубуватим блиском плівку, що високо піднімається по стінках посудини. Плівка звичайно пухка, легко розривається, випадає на дно і викликає сильне помутніння вина.

Бактерії витримують до 12% спирту, утворюють до 89% оцтової кислоти. Оптимальна температура 31 ºС, мінімальна – 10 ºС. При невеликому вмісті оцтової кислоти продовжують її окиснення. Утворюють багато оцтовоетилового ефіру. При старінні надають оцту неприємного запаху, тому непридатні для його виготовлення.

г) ***Acetobacter xylinym***. Клітини паличкоподібні, короткі і довгі розміром (0,8-1,0)х(2,0-2,5) мкм. Зустрічаються також ниткоподібні форми, часто у вигляді спіралі.

На поверхні вина бактерії утворюють драглисто-слизисту плівку. При старінні плівка стає міцною, товстою, хрящеподібною. Занурюючись на дно, плівка утворює слизисту масу. Бактерії цього виду розвиваються на винах, які містять не більше 7-8 % спирту, і утворюють не більше 4,5% оцтової кислоти, яку можуть далі окиснювати до CO_2 і H_2O. Оптимальна температура 35-37ºС. При окисненні спирту утворюються побічні продукти з неприємним запахом.

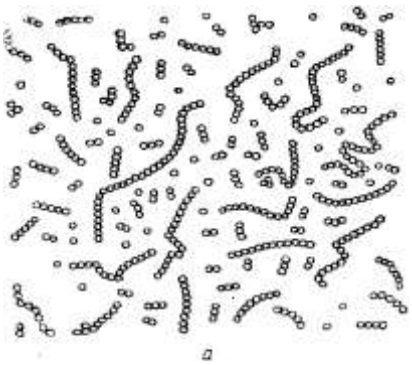


Рис. 12. *Bacterium viscosus vini*

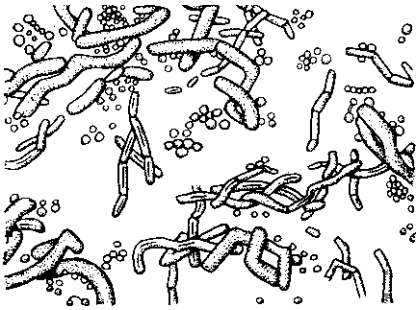


Рис. 13. *Bacterium amaracrylus*

Рис. 14. *Bacterium tartarophtorum*

д) *Bacterium viscosus vini*. Мають вигляд коротких паличок розміром (0,3-0,6)х(2-6) мкм (рис. 12). Вони є анаеробами: при відсутності повітря бурхливо розвиваються і викликають ослизнення білих вин. У хворих винах утворюють ланцюжки і мають вигляд намиста. Із залишкового цукру утворюють слиз.

е) *Bacterium amaracrylus*. Спороутворюючі аеробні палички розміром (0,75-1,5)х(2-8) мкм (рис. 13). Ці бактерії здатні розкладати гліцерин з утворенням гіркої речовини акролеїну. Є збудниками хвороби вина – згіркнення. Одночасно підвищується кислотність виноматеріалу. Акролеїн з'єднується з дубильними речовинами та барвниками вин з утворенням гірких речовин.

На початку хвороби вино втрачає блиск, але залишається прозорим. У смаку з'являються неприємні тони. При розвитку хвороби вино каламутніє, на дно пляшки випадає осад з барвних речовин, колір стає брудно-бурим з синьо-чорним відтінком. Смак вина гострий, гіркий, воно набуває різкого запаху летких кислот з присмаком бродіння (за рахунок вуглекислоти, що виділяється).

ж) *Bacterium tartarophtorum*. Клітини мають вигляд коротких паличок, іноді довгих або коротких ниток (рис. 14). Товщина клітин 0,8-1,0 мкм. Бактерії нерухомі, спор не утворюють, факультативні анаероби. Розкладають винну кислоту і її солі на оцтову кислоту і вуглекислий газ і одночасно розщеплюють гліцерин на оцтову, пропіонову і молочну кислоти, відновлюють фруктозу в маніт, а також енергійно розкладають яблучну кислоту, що приводить до захворювання вина.

Якщо ж процес скисання вина зайшов занадто далеко (більше 3 г/дм^3 летких кислот), то його слід перетворити на оцет або перегнати на спирт.

Роль оцтовокислих бактерій у виноробстві

ОКБ викликають одну з найбільш поширених і небезпечних хвороб вина - оцтове скисання. ОКБ можуть розвиватися у винах із вмістом спирту 14-15 %. На відкритій поверхні вина вони утворюють плівку, але відмінну на вигляд від плівки, що утворюється плівчастими дріжджами. Вона також білуватого

кольору, але масляниста, не пухка, іноді з голубуватим відтінком. До опущених у вино предметів не прилипає.

Частіше хворіють білі малокислотні вина. Червоні вина, особливо з високим вмістом дубильних і фенольних речовин, є стійкішими до захворювання.

Потрапивши у вино, ОКБ окиснюють спирт в оцтову кислоту, яка навіть в невеликій кількості, перетворюючись на оцтовоетиловий ефір, надає винам гострого неприємного запаху і смаку.

ОКБ потрапляють у вино з поверхні устаткування, ємностей. Іноді ОКБ швидко розвиваються на червоних винах, коли до мезги є доступ кисню.

Повільне бродіння, при якому поверхня середовища недостатньо захищена від доступу повітря вуглекислим газом, який виділяється під час бродіння, та підвищена температура сприяють розвитку ОКБ і прискорюють утворення оцтової кислоти, що гальмує роботу чистої культури дріжджів (ЧКД).

Дуже важливо, щоб спиртове бродіння наступало якнайшвидше і відбувалося сильне виділення CO_2. Так відбувається при внесенні сильної чистої культури дріжджів і при систематичному спостереженні за температурою бродіння.

Зброджені виноматеріали треба зберігати без доступу повітря при низькій температурі, що перешкоджає розвитку ОКБ. Необхідно підтримувати вміст вільного SO_2 у вині на рівні 25 мг/дм^3.

Профілактикою захворювання вин є наступні заходи:

- сортування та інспекція винограду (видалення хворих і пошкоджених кетягів);
- сульфітація сусла і мезги;
- використання низьких температур;
- застосування ЧДК;
- належний санітарний стан тари і устаткування;
- доливання ємностей;
- при виробництві червоних вин часте перемішування мезги, застосування спеціальних систем закритих чанів для того, щоб кисень не попадав до ємностей.

При виявленні у вині оцтового бродіння перш за все треба припинити цей процес. Найбільш надійним способом для цього є пастеризація вина при 60ºС протягом декількох хвилин. Ефективною є також фільтрація через пластинчастий фільтр. Потім можна проводити купаж виноматеріалу з його подальшою сульфітацією внесенням сірчистого ангідриду (80-100 мг/дм^3) і зберігати при низькій температурі в повних ємкостях. Неприємний смак хворого вина можна пом'якшити обробкою активованим вугіллям (50 -100 г на 10 дм^3).

Якщо ж процес скисання вина зайшов занадто далеко (більше 3 г/дм^3 летких кислот), то його слід перетворити на оцет або перегнати на спирт.

Проводять виділення ОКБ з вин з ознаками оцтового скисання. При цьому звертають увагу на запах оцтовоетилового ефіру і результати

мікроскопування (виявлення нерухомих коротких паличок, іноді з інволюційними формами).

Виділення проводять шляхом посіву окремих добре ізольованих колоній, що виросли на щільному поживному середовищі. Накопичувальну культуру готують на вині з суслом. Пробу вина (1см^3) висівають в середовище. Після 2-3 діб культивуванняпри температурі 28-30ºС візуально роблять висновок про розмноження культури – поява тонкої, гладкої, глянцевато-вологої або сухої плівки на поверхні середовища. Розсівання накопичувальної культури (розведень в стерильній воді) проводять на агаризоване сусло в чашках Петрі.

Через дві-три доби при температурі 30-35ºС зростають колонії дріжджів і між ними дрібні, плоскі, неправильної форми, білувато забарвлені, блискучі, вологі, слизисті колонії ОКБ. Окремі колонії переносять в пробірки із стерильним рідким поживним середовищем і витримують при 28-30 ºС. Про розвиток бактерій судять за утворенням плівки на поверхні поживного середовища. Ознаки плівки наступні: тонка, помірно міцна, незмочувана, повзуча по стінках пробірки. Чистоту культури ОКБ підтверджують мікроскопуванням. Перевіряють наявність рухливості. Зберігання культур ОКБ проводять на рідких або щільних поживних середовищах в холодильнику при температурі 5-10 ºС з пересіванням 1 раз на місяць.

Для ідентифікації ОКБ проводять пробу на каталазу. Аналіз ведуть на предметному склі при мікроскопуванні. На скло беруть краплю пероксиду водню і вносять петлею бактерійну масу. При мікроскопуванні з малим збільшенням у разі наявності каталази у культури спостерігається інтенсивне виділення бульбашок кисню.

МОРФОЛОГІЧНІ, КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА ФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Молочнокислі бактерії (МКБ) широко поширені в природі і їх можна виявити на підземних частинах виноградної рослини, навколо кореневої системи, на виноградних ягодах, особливо пошкоджених.

Присутність МКБ в молодих винах є звичайним явищем, якщо тільки виноград або сусло не піддавалися сильній сульфітації. МКБ зустрічаються на устаткуванні і у виробничих приміщеннях, проте серед них далеко не всі здатні розвиватися у вині: деякі не можуть розмножуватися при pH сусла або вина, але вони надалі можуть розвиватися у вичавках, в зонах з вищим pH; інші бактерії швидко пригнічуються спиртом, утвореним дріжджами. В результаті залишається лише невеликий відсоток бактерій винограду, які вижили і в подальшому викликають яблучно-молочне бродіння (ЯМБ), поступово пристосовуючись до умов вина.

МКБ мають форму коків і паличок. Їх розміри залежать від складу середовища і умов культивування. За сприятливих умов МКБ дають нове покоління через 15хв і менше, при несприятливих – необхідно 24год і більше. Розвиваючись у винах, коки звичайно мають вигляд поодиноких клітин розміром 0,3-0,5 мкм. Іноді вони сполучені попарно і мають вигляд коротких

паличок. Розміри паличкоподібних МКБ коливаються від 1,5 до 40 мкм. Як правило у винах клітини довші, іноді мають ниткоподібну форму (в хересних виноматеріалах). МКБ нерухомі, спори не утворюють, $Гр^+$, за типом дихання – мікроаерофіли або факультативні анаероби.

Залежно від продуктів бродіння МКБ підрозділяють на дві групи: гомоферментативні і гетероферментативні.

Гомоферментативні МКБ, збродживши цукор, утворюють майже виключно молочну кислоту за схемою:

$$C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CHOHCOOH + 64{,}4 \text{ кДЖ}$$

глюкоза молочна кислота

Гетероферментативні МКБ, розкладаючи цукор, утворюють окрім молочної кислоти ряд побічних продуктів за схемою:

$$2C_6H_{12}O_6 = CH_3CHOHCOOH + HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COOH +$$

глюкоза молочна кислота янтарна кислота

$$+ CH_3COOH + C_2H_5OH + CO_2 + H_2 + Q$$

оцтова кислота етиловий спирт

При гетероферментативному бродінні може накопичитися молочної кислоти до 40% від кількості зброженого цукру, янтарної кислоти – близько 20%, етилового спирту – 10%, оцтової кислоти – 10%, газів – близько 20%.

Гетероферментативні МКБ викликають молочнокисле бродіння в міцних, десертних і столових недоброджених винах. При цьому спостерігається зменшення вмісту цукру, збільшення титрованої кислотності (до 9 г/дм^3) і леткої (4 г/дм^3), виділення вуглекислого газу.

МКБ можуть також проводити у вині процес яблучно-молочного бродіння, який полягає в розкладанні яблучної кислоти до молочної за схемою:

$$HOOC\text{-}CH_2\text{-}CHOH\text{-}COOH = CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + CO_2$$

яблучна кислота молочна кислота

В результаті перетворення двоосновної яблучної кислоти в одноосновну молочну зменшується титрована кислотність, підвищується значення pH, виділяється вуглекислий газ.

У виноробстві широко поширена класифікація МКБ на підставі здатності збродживати пентози і лимонну кислоту. Зокрема, коки підрозділяють на гомоферментативні (*Micrococcus acidovorax, M.variococcus)* і гетероферментативні (*Leuconostoc gracile, L. oenos).*

Палички теж підрозділяють на гомоферментативні (*Lactobacillus plantarum, L. casei,* рід *Streptobacterium*) і гетероферментативні (*Lactobacillus fructivorans, L.desidiosus, L. hilgardii, L. brevis*).

МКБ володіють високою спиртостійкістю і можуть розвиватися при вмісті спирту 16-22%. Спирт у багатьох видів МКБ викликає морфологічні зміни, що виявляються в збільшенні розмірів клітин у довжину.

Оптимальною температурою для розвитку МКБ є 25ºС. Проте коки менш чутливі до температури, ніж паличкоподібні МКБ і можуть добре розвиватися при температурі 15-25°С.

МКБ дуже чутливі до $S0_2$, який гальмує їх зростання в набагато більшому ступені, ніж дріжджів.

Найбільшою кислотостійкістю володіють гетероферментативні коки, найменшою – гетероферментативні палички.

Характеристика основних видів МКБ

а) *Lactobacterium mannitopoeum*. Має форму паличок розміром (0,7-1,3)х(2-8) мкм (рис. 15). При розмноженні часто утворює ланцюжки. Оптимальна температура 26-34ºС. При температурі нижче за 10ºС розвивається украй слабо, зброджує глюкозу і галактозу з утворенням молочної і оцтової кислот, а фруктозу – з утворенням маніту; зброджує яблучну і лимонну кислоти на молочну і CO_2. При високій температурі бродіння утворює значну кількість маніту, є збудником хвороби вина - манітного бродіння. Бактерії *L. mannitopoeum* розвиваються під час спиртового бродіння і гальмують бродильну активність дріжджів.

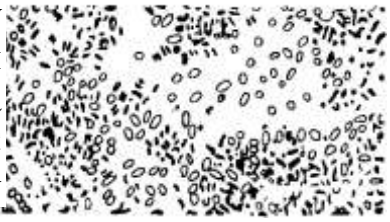


Рис. 15. *Lactobacterium mannitopoeum*

б) *Bacterium gracile*. Палички товщиною 0,5 і завдовжки 0,75-1,0 мкм, часто сполучені в ланцюжки, є гетероферментативними організмами. Розкладають глюкозу на молочну, оцтову кислоти і спирт. Енергійно зброджують яблучну кислоту, менше лимонну, не зброджують винну, янтарну і молочну кислоти. Іноді утворюють маніт. Ніколи не з'являються під час спиртового бродіння, а лише незабаром після його закінчення. Відносно температури маловимогливі, можуть розвиватися і викликати кислотопониження при 8-10ºС.

в) *Micrococcus malolacticus*. Дрібні коки діаметром близько 1мкм. При розмноженні клітини після поділу якийсь час залишаються об'єднаними, утворюючи диплококи і конгломерати. Енергійно перетворюють яблучну кислоту вина на молочну кислоту і CO_2, а цукор – в молочну кислоту і невелику кількість оцтової кислоти. Не утворюють маніт. В порівнянні з іншими МКБ менш кислотовитривалі. При високій температурі і підвищеному вмісті азотистих речовин надають вину молочнокислого присмаку.

г) *Micrococcus acidovorax і M. variococcus* у морфологічних і фізіологічних відношеннях близькі між собою. У вині зустрічаються в основному у вигляді поодиноких коків, іноді дипло- або тетракоків. Оптимальна температура 26,5ºС. У варіококуса клітини неоднакові за розмірами (0,75-1,5 мкм).

д) *Leuconostoc gracile*. Дрібні стрептококи, мають вид ланцюжків, що складаються з 4-10 яйцеподібних клітин. При зброджуванні глюкози утворює спирт, вуглекислий газ, оцтову кислоту; з фруктози – маніт. Витримує до 14% спирту в середовищі. За типом дихання – мікроаерофіл. Яблучну кислоту зброджує при низьких значеннях pH, завжди розкладає лимонну кислоту.

е) *Leuconostoc oenos*. У винах зустрічаються три штами, які відрізняються за морфологією. Дрібні стрептококи в ланцюжках до 15 клітин та великі коки. За типом дихання є факультативними анаеробами. Фізіологічні властивості дуже схожі з *L. gracile*.

ж) *Lactobacillus plantarum*. Маленькі короткі палички, окремі, диплобацили або стрептобацили. Тип дихання - факультативно-анаеробний.

При бродінні не утворює з глюкози вуглекислий газ, з фруктози – маніт. Оптимальна температура 25 °С. Утворює гліцерин і бутандіол.

з) *Lactobacillus casei*. Довгі, тонкі палички, розташовані у вигляді стрептобацил. Оптимальна температура 35ºС. При 45ºС розмноження відсутнє. Зустрічається в молодих червоних винах. За фізіологічними властивостями дуже близькі до *L. plantarum* .

и) *Lactobacillus hilgardii*. Зустрічається в бродячих суслах. Поодинокі палички завдовжки 2-10 мкм. З глюкози утворює вуглекислий газ, етанол і оцтову кислоту; з фруктози – маніт. Оптимальна температура 25ºС. Утворює гліцерин і бутандіол (до 500 мг/дм^3). Поріг рН використання цукру – 3,2, яблучної кислоти –3,4.

к) *Lactobacillus brevis*. Зустрічаються в червоних винах. Є тонкими паличками завдовжки від 2 до 6 мкм, поодинокі або у вигляді стрептобацил. Синтезує гліцерину в 5 разів більше, ніж *L. hilgardii,* а бутандіолу, навпаки, в 5 разів менше. Решта фізіологічних властивостей дуже схожа з *L. hilgardii.*

Роль МКБ у виникненні захворювань вин

МКБ викликають молочнокисле бродіння вин. При цьому зброджуються цукри з утворенням молочної і оцтової кислот, що приводить до захворювання вин. Молочнокислому бродінню піддаються всі типи вин, що містять в своєму складі певну кількість цукру, особливо малокислотні столові із залишковим цукром, міцні і десертні з будь-яким вмістом спирту. МКБ можуть використовувати для розвитку альдегіди, гліцерин, винну кислоту і інші компоненти. Тому особливо небезпечні вони для хересного виробництва.

Найактивніше процес скисання вина викликають гетероферментативні молочнокислі палички (*L. brevis, L. buchneri, L. fermenti*).

Найбільш небезпечним захворюванням цукровмісних вин є гетероферментативне бродіння, що супроводжується значним підвищенням вмісту летких кислот (до 4 г/дм^3) і накопиченням молочної кислоти. Захворюванню піддаються в основному малокислі вина.

Гомоферментативне бродіння цукру супроводжується значним збільшенням вмісту молочної кислоти і підвищенням кислотності без підвищення вмісту летких кислот. Воно може супроводжуватися виникненням неприємно кислого смаку і тонів "квашення". Причиною цих недоліків є не молочна кислота, а вторинні продукти, які утворюють гомоферментативні МКБ.

В окремих випадках в результаті молочнокислого бродіння може виникати "мишачий тон". Його поява є не тільки наслідком метаболізму МКБ, а є поєднанням біологічних і фізико-хімічних чинників (рН, присутність заліза).

Окремі види деяких МКБ можуть розкладати винну кислоту, що спостерігається в основному в малокислотних винах (рН3,6). При цьому утворюються оцтова кислота і CO_2. У разі розвитку гомоферментативних МКБ утворюються молочна кислота і CO_2. В результаті розкладання винної кислоти зменшується кислотність вина і погіршується смак.

Серед паличкоподібних і кулястих видів МКБ зрідка зустрічаються штами, які мають властивість розкладати гліцерин з утворенням оцтової,

молочної, пропіонової кислоти, CO_2 і різкопахнучого акролеїну, що надає гострі смакові якості.

Гетероферментативні МКБ здатні проводити розкладання фруктози з утворенням маніту. При цьому вино набуває неприємного кисло-солодкого смаку. Процес спостерігається в малокислотних винах, що містять цукор. Манітному зброджению не піддаються вина з високим вмістом спирту (>14%) і високою цукристістю. В результаті манітного бродіння вино каламутніє і набуває запаху гниючих фруктів.

Гетероферментативні коки можуть утворювати у вині віскозні полімерні вуглеводи, внаслідок чого виникає тягучість вина, його ослизнення, ожиріння.

Яблучно-молочне бродіння (ЯМБ)

Єдино корисним процесом, який викликають МКБ у вині, є ЯМБ, що приводить до кислотопониження у висококислотних винах. Розкладання інших складових частин, а також яблучної кислоти у винах з нормальною або низькою кислотністю небажане або навіть шкідливе. Абсолютно безпечним для якості вина може бути тільки такий процес ЯМБ, при якому бактерії перетворюють яблучну кислоту в молочну і не торкаються інших компонентів. Смакові якості вина значно поліпшуються, втрачається терпкий грубий смак, молоде вино стає м'яким, бархатистим, маслянистим, збагачується відтінками і винним букетом. В умовах України проведення ЯМБ корисне в червоних винах з підвищеною кислотністю.

Для проведення біологічного кислотопониження методом ЯМБ використовують гомоферментативні палички і гетероферментативні коки (р.*Leuconostoc)* .

Особливістю проведення ЯМБ є необхідність своєчасної зупинки бродіння, оскільки через відсутність яблучної кислоти бактерії почнуть споживати гліцерин, лимонну кислоту, азотовмісні речовини, при цьому утворюються леткі кислоти, які погіршують смак вина. Для припинення ЯМБ застосовують додаткову сульфітацію сірчистим ангідридом (100-150 мг/дм^3) з подальшим оклеюванням і фільтрацією.

Для дослідження МКБ проводять посіви матеріалу (сусло, вино) на натуральні поживні середовища. Можливий також посів на капустяне середовище, суміш солодового сусла з яблучним, дріжджовий автолізат.

Для створення елективних умов для культивування МКБ у всі рідкі поживні середовища перед посівом вводять спирт (0,95см^3 на 5см^3 середовища).

Для роздільного визначення оцтовокислих і молочнокислих бактерій використовують рідке або щільне поживне середовище, яке складається з дріжджової води з додаванням 10% дріжджового автолізату з pH 7 і з додаванням індикатора (бромкрезол пурпур і бромкрезол зелений 1:1). МКБ утворюють молочну і оцтову кислоти, внаслідок чого реакція середовища стає кислою і колір індикатора змінюється від синього на жовтий. Крім того проводять мікроскопування культуральної рідини і виявляють присутність МКБ .

При зростанні на щільному середовищі (1,5% солодовий СА*)* МКБ утворюють дрібні, плоскі колонії з блакитною опалесценцією не зовсім

правильної форми з нерівними краями. З типових колоній МКБ, які виросли в чашках, захоплюють петлею колонію і переносять в пробірку з рідким середовищем, поміщають в термостат при температурі 20-25ºС на 7-10 діб.

Коли середовище в пробірках злегка помутніє і в ньому при струшуванні буде видно прозорі шовковисті хвилі, а на дні – легкий білуватий осад, це означає, що бактерії розмножилися. Чистоту культури виділених МКБ перевіряють мікроскопічним контролем і посівом на діагностичне поживне середовище.

Для попереднього орієнтовного визначення МКБ роблять посів культури на поверхню агаризованого солодового сусла з 2% крейди. Навколо колоній МКБ виникає зона розчинення крейди в результаті утворення розчинного лактату кальцію.

Виділені культури МКБ зберігають у рідких поживних середовищах, в тому числі і на суміші (1:1) виноградного сусла з солодовим, таким, що містить 3% сухих речовин (температура 5-10ºС) з пересіванням один раз на місяць.

ДЖЕРЕЛА ІНФІКУВАННЯ. ХВОРОБИ ВИН ТА ПИВА

Хворобами вин та пива називають незворотні зміни їх корисних властивостей, які обумовлені біологічними факторами. Вино та пиво набувають неприємного смаку та запаху і часто стають зовсім непридатними до вживання.

Хвороби вина та пива у більшості випадків викликають бактерії та дріжджі і головним чином через невиконання операцій, які передбачені технологічними інструкціями.

Умови виробництва вин та пива далекі від стерильних. На устаткуванні, у скляних трубопроводах, у ємностях для зброджування сусла та зберігання завжди є живі мікроорганізми: це плісеневі гриби, дріжджі (у порожніх ємностях переважають плівчасті дріжджі родів *Pichia і Candida*), оцтовокислі бактерії і молочнокислі бактерії. Кількість мікроорганізмів залежить від санітарного стану устаткування та ємностей.

Вина та пиво, що надходять на розлив у пляшки, теж містять мікроорганізми. На нестерильних лініях в 1см³ вина виявляють від 10 до 500 живих дріжджових клітин, а саме дріжджі є основною причиною біологічних помутнінь столових вин.

У помутнілих винах виявляють дріжджі родів *Saccharomyces, Brettanomyces, Pichia, Hansenula, Candida*. Серед сахароміцетів найбільш часто виявляють S.oviformis, тому що вони найбільш спиртовитривалі. Буває досить присутності декількох живих дріжджових клітин в 1 см³ вина, яке розливають у пляшки з доступом кисню, щоб у ньому через деякий час виникло дріжджове помутніння.

Біологічне псування пива

У пиві з його типовою колоїдною системою рухомої рівноваги безперервно відбуваються різні окислювально-відновні процеси. Низька температура бродіння, наявність спиртів, відсутність кисню перешкоджають,

але не запобігають розвитку в пиві сторонньої мікрофлори. У ньому протягом 1год. легко розвиваються дріжджі в тому числі і дикі, МКБ та педіококи.

Дріжджове помутніння пива викликають і культурні, і дикі дріжджі. Помутніння, спричинені дикими дріжджами, зумовлюють хворобу пива і роблять його непридатним для споживання. Дріжджові клітини здатні проходити крізь фільтр або потрапляють у пиво з інших джерел як вторинна інфекція. В сприятливих умовах вони швидко розвиваються і утворюють муть, поверхневу плівку, з'являється неспецифічний аромат, можлива значна зміна смаку у зв'язку з продукуванням значної кількості оцтової кислоти та ефірів.

В сучасних умовах ультрафільтруванням готового пива досягають повного видалення мікрофлори. Ніякі інші засоби фільтрування і обробки не забезпечують його повного знепліднення.

Бактеріальне помутніння спричиняють МКБ, ОКБ, так звана пивна сарцина, деякі термофіли. Розвиток цієї мікрофлори призводить до повного псування пива. Спочатку утворюється муть у вигляді вуалі, як у погано профільтрованого пива. Вона не осаджується, погіршуються органолептичні характеристики пива, воно псується.

Шовковистий блиск муті пива свідчить про молочнокисле зараження. Через певний час помутніння зменшується, але випадає білий осад. При цьому швидко підвищується кислотність пива і смак його стає неприємним. Найбільш типовим збудником шовковистого помутніння є *Lactobacillus brevis* – гетероферментативні МКБ.

Захворювання пива здатні викликати і педіококи. Найчастіше при такому захворюванні пива виявляють *P.ramnosus*. Вони добре розмножуються на дріжджах і можуть існувати разом, прилипаючи до дріжджових клітин, оскільки не можуть самостійно синтезувати необхідні ростові речовини – тіамін та рибофлавін. Ця мікрофлора здатна викликати збільшення в'язкості пива і самостійно, і в сукупності з лейконостоками. Для запобігання зараженню пивною сарциною необхідно своєчасно замінювати технологічні дріжджі новими.

Спороутворювальні палички роду *Bacillus* у великій кількості присутні на зерні і в солоді. Вони виживають при кип'ятінні сусла, але в подальшому не розвиваються через низькі значення pH. Вони чутливі до хмелю.

Оцтовокислі бактерії характеризуються стійкістю до бактеріостатичної дії хмелю, кислот та етилового спирту, тому здатні розмножуватися в пиві та псувати його. Найчастіше їх виявляють в пиві, яке розливають з бочок, оскільки там створюються аеробні або мікроаерофільні умови розвитку для оцтовокислих бактерій. Ця мікрофлора надає пиву кислого смаку, викликає помутніння та ослизнення. Іноді утворюється на поверхні маслянista плівка. Концентрація спирту більше 6 % пригнічує розвиток цієї мікрофлори, але існують і толерантні до спирту штами, які витримують і 12–13 % етилового спирту.

Ентеробактеріальні контамінанти в пивоварінні називають термобактеріями. Цей термін не науковий. Більш коректно їх називати –

ентеробактеріями. В наш час уже відомо, що ці мікроорганізми здатні гальмувати або прискорювати процес бродіння і тому суттєво впливають на смак та аромат готового продукту.

Облігатні анаеробні палички – важлива група мікроорганізмів-шкідників пива, закупореного в пляшки. Ця мікрофлора продукує в фасованому пиві значну кількість оцтової та пропіонової кислот та ацетоін. Іноді пиво мутніє, з'являється запах тухлих яєць, оскільки підвищується концентрація сірководню (H_2S).

Біологічне псування вина

Цвіль вина

Викликають плівчасті дріжджі родів *Pichia, Hansenula, Candida*, які швидко покривають поверхню вина, якщо воно навіть найкоротший час залишається в ємності, не заповненій доверху. У виноробстві ця хвороба зустрічається найчастіше. Продукти обміну плівчастих дріжджів дуже змінюють склад та смак вина. Ця хвороба вражає найчастіше молоді вина, особливо червоні. Плівка борошнисто-біла, іноді жовтувато-рожева, спочатку тонка та гладенька, потім зморшкувата. Вона легко розривається та прилипає до будь-якого предмету, зануреного у вино.

При слабко розвинутій плівці простір над вином окурюють сирнистим ангідридом і через деякий час обережно доливають ємності з витісненням з неї плівки.

Вино під плівкою спочатку прозоре, але під час осідання плівки на дно каламутніє. Відчувається запах стоячої затхлої води.

Спирт у концентрації 12-13% гальмує розвиток плівчастих дріжджів. Оптимальна температура для них 28°С, мінімальна 4 °С, максимальна 34°С.

Плівчасті дріжджі сульфітостійкі (витримують 500 мг\дм³ загального диоксида сірки), оскільки вони відновлюють солі сірчистої кислоти в елементарну сірку або сірководень. Тому у винах з високою концентрацією SO_2, внаслідок розвитку плівчастих дріжджів утворюється сильний сірководневий тон.

Якщо вино помутнішало, його оклеюють (рибний клей, альбумін харчовий, казеїн технічний, танін), фільтрують або пастеризують, сульфітують.

Після лікування вино краще скупажувати із близьким по якості вином. Білі вина в таких випадках піддають вторинному зброджуванню з додаванням свіжого сусла, а червоні добре виправляються, якщо їх настоювати на меззі, яка вибродила, після спуска з неї вина.

Методи профілактики. Необхідною умовою для попередження розвитку плівчастих дріжджів є відстоювання сусла з сульфітацією при пониженій температурі, зброджування на ЧКД, своєчасна доливка для припинення доступу кисню. Необхідно дотримуватися всіх технологічних режимів, систематично проводити мікробіологічний контроль, зберігати вино при низькій температурі.

*Рекомендації***.**

- Якщо захворювання на початковій стадії і вино помутніло, його оклеюють, фільтрують, пастеризують при температурі 60-65^{o}С на протязі 5 хвилин, сульфітують.
- Після лікування вино краще скупажувати з близьким по якості вином, або залишити до слідуючого сезону виноробства. В таких випадках хворе біле вино вдруге збродженують з додаванням свіжого сусла, а червоні вина добре виправляються, якщо їх настоювати на меззі після бродіння та зняття з неї виноматеріалів.

Мишачий тон у вині

Про причини утворення мишачого тону у вині і дотепер немає єдиної думки. Одні причиною вважають гриби родів *Brettanomyces* та *Monilia* і деякі види молочнокислих бактерій. Інші - що це результат хімічних реакцій у винах, які містять велику кількість заліза. Деякі вчені вважають причиною ацетамід, який утворюється з аміаку. Однак додавання у вино ацетаміда не надає йому мишачого тону, тоді як додавання невеликих доз перекису водню викликає появу мишачого тону, а більші дози усувають його.

Це доводить, що речовина, яка викликає захворювання, є проміжним, а не кінцевим продуктом бродіння.

Роль мікроорганізмів у появі мишачого тону - непряма і зводиться вона до зміни pH вина, при якому легко проходить процес виникнення та накопичення речовин, які мають мишачий тон і є продуктами дезамінування. Це захворювання вин дуже поширене, важко лікується і вражає всі типи вин. Швидше всього захворюють слабоградусні та малокислотні вина, які зберігаються при підвищеній температурі. На початковій стадії захворювання з'являються неприємні смакові відтінки, які відчуваються через певний час після проковтування. При розвитку хвороби деякі вина каламутніють, випадає осад, мишачий тон збільшується, вино стає зовсім непридатним до вживання.

На початковій стадії захворювання застосовують багаторазові переливання хворого вина із провітрюванням і наступною сульфітацією, пастеризацією та фільтрацією. Іноді допомагає обробка холодом у потоці при температурі мінус (4- 8)^{o}С в залежності від міцності вина.

Від мишачого тону, який утворюється у винах під час розвитку мікроорганізмів, позбутися практично неможливо, тому що при цьому у винах відбуваються такі глибокі зміни, які лікуванням відновити неможливо.

Таке вино не придатне навіть для одержання коньячних спиртів, оскільки цей тон переходить в усі фракції відгону.

Рекомендації. Для лікування вин з мишачим присмаком на початковій стадії захворювання рекомендуються такі заходи:

- Багаторазова переливка хворого вина з провітрюванням та наступною суфітацією.
- Оклейка та фільтрація.
- Пастерізація з наступною оклейкою та фільтрацією.

– Фільтрація через активоване вугілля. Потрібно мати на увазі, що разом із зменшенням мишачого тону вугілля збіднює вино ароматичними речовинами та барвниками.
– Видалення із вина заліза шляхом обробки жовтою кров'яною сіллю.

Оцтове скисання

Це розповсюджене захворювання і молодих, і старих вин.Оцтовокислі бактерії, які викликають це захворювання, широко поширені в природі, перебувають в ґрунті, повітрі, на ягодах і фруктах. У тій або іншій кількості вони є в кожному здоровому вині.

ОКБ можуть розвиватися при вмісті спирту 14-15%, але дуже чутливі до високої кислотності вина, до диоксиду сірки, а також до температури. Розмножуються вони при температурі 26-35^{o}С з колосальною швидкістю, не вимогливі до поживних середовищ. На поверхні вин утворюють плівку - маслянисту, не пухку, з блакитним відтінком, до зануреного у вино предмета плівка не пристає.

Поступово плівка потовщується й частково осідає на дно, утворює слизувату масу, яку називають оцтовою маткою.

У винах Таджикістану зустрічаються ОКБ, які розвиваються у всій масі вина без утворення плівки. Оцтовокислі бактерії перетворюють спирт в оцтову кислоту, яка надає винам різкого, неприємного запаху і гострого смаку.

Утворена оцтова кислота, як більш важка, опускається вниз, а спирт піднімається й піддається окисненню. Оцтовокислі бактерії найчастіше вражають слабкоградусні (9–12 %), малокислотні, малоекстрактивні вина, молоді і старі. Оцтовокисле захворювання вражає найчастіше червоні вина, особливо у пляшках. Збудник гіркоти *Bact.amaracrylus* – аеробна споротворна паличка. Згіркнення пов'язане з розкладанням бактеріями гліцерину в акролеїн, який вступає в реакцію з поліфенолами. Продукти цих реакцій мають гіркий смак.

На початку захворювання вино втрачає блиск, стає каламутним. Потім з'являється гіркота та запах летких кислот, з'являються коричневі та синьо-чорні тони, барвники випадають в осад, гіркота посилюється.

Вино стає непридатним до вживання.

Головний стимулюючий фактор оцтового скисання – вільний доступ кисню!

Рекомендації:

– Надійний спосіб призупинити захворювання – пастеризація на протязі 5хвилин при 60-62^{o}С або фільтрація через знепліднюючий фільтр. Після цього проводять купажування, сульфітацію; зберігають при низькій температурі.
– Використовувати крейду для зменшеннях вмісту оцтової кислоти не доцільно, оскільки вона в першу чергу зв'язується з винною кислотою і осаджується у вигляді нерозчинного виннокислого кальцію, після чого в реакцію вступають нелеткі кислоти і в останню чергу - оцтова кислота.

- Для виправлення смаку рекомендується використовувати перебродження виноматеріалів на свіжій вижимці.
- Лікування вин з вмістом летких кислот не більше 3,0 г/дм^3 проводять шляхом культивування хересної плівки. Для цього хворе вино пастеризують, фільтрують, спиртують до 14-14,5%. На поверхню вина наносять плівку чистої культури хересних дріжджів, які разом з окисненням спирту руйнують оцтову та молочну кислоти.
- Якщо процес скисання зайшов далеко, то вино варто перетворити в оцет або перегнати на спирт.

Молочнокисле бродіння.

Молочнокислі бактерії зброджують цукор в низькокислотних винах, які містять 18–20% спирту, з утворенням молочної та оцтової кислот. У хворому вині зменшується вміст цукру, збільшується титрована кислотність, іноді виділяється CO_2.

Окремі види молочнокислих бактерій ростуть навіть при вмісті спирту 25 %. Молочнокислому бродінню піддаються всі типи вин. Молочнокислі бактерії викликають захворювання, яке пов'язане з використанням бактеріями яблучної, лимонної кислот і гліцерину. У шампанських винах молочнокислі бактерії розвиваються рідко, але при порушенні технологічного процесу резервуарної шампанізації продукти їх життєдіяльності пригнічують процес вторинного бродіння, а це значно знижує якість готового шампанського.

Велику шкоду молочнокислі бактерії наносять хересному виробництву. Під хересною плівкою вони розкладають альдегіди, яблучну та лимонну кислоти, виділяють CO_2 та утворюють на поверхні хересної плівки повітряні бульбашки, які призводять до відмирання хересних дріжджів. У виноматеріалів з'являється квашений тон, іноді мишачий присмак.

Молочнокислі бактерії розвиваються по всій товщі вина і можуть викликати захворювання у герметично закритих ємностях, оскільки вони-факультативні анаероби. Хворе вино стає тьмяним, втрачає прозорість і блиск, з'являються "шовковисті хвилі" – це скупчення паличкоподібних молочнокислих бактерій. У випадку подальшого розвитку захворювання, вино освітлюється, бактерії осідають, але при цьому воно настільки зіпсоване, що вже стає непридатним до вживання.

Рекомендації. Лікувати вина можна лише на самому початку захворювання з використанням наступних прийомів:

- Звільнення вин від бактеріального та іншого осаду шляхом сульфітації, оклейки, обробки адсорбентами (рибний клей, желатин, бентоніт), фільтрації та пастеризації при відносно високій температурі 70-72^{o}C.
- Якщо для хересування використовують висококислотні виноматеріали, які містять яблучну кислоту, то спочатку потрібно провести яблучно-молочне бродіння, звільнитися від

бактерій, провести пастеризацію та фільтрацію через знепліднюючі фільтри.

– Хімічний спосіб (нейтралізація вуглекислим кальцієм) пониження кислотності у відношенні до виноматеріалів використовувати недоречно, оскільки в першу чергу вуглекислий кальцій нейтралізує винну кислоту, тоді як яблучна кислота може служити субстратом для молочнокислих бактерій.
– Від мишачого тону у хворих винах позбутися практично неможливо. Таке вино вважають зіпсованим (див. захворювання вин «мишачий тон»).
– Для попередження розвитку молочнокислих бактерій в бутильованих винах необхідно своєчасно провести яблучно-молочне бродіння з подальшою обробкою, яка дозволить максимально вивести бактерії з виноматеріалів. Використовують високі дози сульфітації з введенням дозволених до використання антисептиків.

Турн - захворювання, яке викликають також молочнокислі бактерії, здатні розкладати винну кислоту та гліцерин і підвищувати кількість оцтової та молочної кислот. Захворюванню піддаються частіше червоні вина, які містять мало фенольних сполук і барвників, рідше – білі вина. Хворе вино каламутніє, змінює свій колір, аромат, набуває сильного запаху етилоцтового ефіру та гіркого смаку, а іноді з'являється мишачий присмак.

Методи профілактики та лікування такі ж, як при молочнокислому бродінні.

Манітне бродіння.

Це один із видів молочнокислого бродіння, яке виникає через розвиток паличкоподібних бактерій *Bact. mannitopoeum*. Із фруктози вони утворюють маніт та оцтову кислоту. Окрім фруктози вони можуть використовувати мальтозу, сахарозу, ксилозу, рафінозу. В залежності від джерела вуглецю та реакції середовища синтезується різна кількість молочної та оцтової кислот.

У винах із вмістом спирту більше 14 % та високою концентрацією цукрів манітне бродіння не починається. Оптимальна температура їх розвитку 26-34 ^{o}C.

Ця хвороба вражає в основному низькокислотні солодкі червоні вина південних районів, а також низькокислотні плодово-ягідні вина. Хворе вино каламутніє, в ароматі з'являються неприємні фруктові ноти, у смаку - кисло-солодкі тони.

Методи профілактики та лікування такі ж, як при молочнокислому бродінні.

Ожиріння або ослизнення вина

Викликають молочнокислі бактерії. Проявляється звичайно у молодих білих низькокислотних з малим вмістом спирту столових винах, бідних

дубильними речовинами та з вмістом надлишкового цукру. Червоні вина та вина з високим вмістом цукру хворіють дуже рідко.

Збудники – *Bact. viscosus vini, Leuconostoc mesenteroides*.

Деякі молочнокислі бактерії синтезують полісахариди, які суттєво підвищують в'язкість вин. Це захворювання вперше було описано Л. Пастером ще в 1866р. Вино стає в'язким, ллється повільно, безшумно. При подальшому розвитку захворювання вино може стати схожим на яєчний білок, але первинний букет вина зберігається.

Рекомендації. Для лікування використовують наступні прийоми:

- видаляють слизові речовини з використанням переливання з розбризкуванням та сильним провітрюванням;
- коли вино знову стає рідким, його сульфітують та оклеюють бентонітом та желатином;
- через 15 днів після освітлення вино фільтрують та пастеризують при 62^{o}С на протязі однієї хвилини;
- вина з надлишком цукру після лікування доброджують на чистих культурах дріжджів, оскільки цукор є сприятливим середовищем для вторинного захворювання.

Після лікування вино стає прозорим та має нормальний смак та аромат.

Згіркнення вина

Вражає найчастіше червоні, особливо пляшкові вина. Збудник гіркоти *Bact. amaracrylus* - аеробна споротворна паличка. Згіркнення пов'язане з розкладанням бактеріями гліцерину в акролеїн, який вступає в реакцію з поліфенолами, речовини, які утворюються спричиняють гіркий смак.

На початку захворювання вино втрачає блиск, стає каламутним. Потім з'являється гіркота й запах летких кислот. З'являються коричневі та синьо-чорні тони, барвники випадають в осад, гіркота посилюється.

Вино стає непридатним до вживання. Хворі вина лікуванню не піддаються, не піддаються перегонці оскільки гіркі речовини переходять у дистилят. Пастеризацію можна використовувати тільки після видалення гірких речовин, оскільки акролеїн під час нагрівання розчиняється.

Рекомендації.

- Хворе вино обробляють активованим вугіллям, але наряду з акролеїном вугілля виводить і барвники. Для відновлення кольору потрібно проводити купажування із забарвленим вином, підкислити лимонною кислотою та добавити танін.
- Рекомендують проводити перебродження хворого вина або настоювання його на свіжій мезі.

Таким чином, молочнокислі бактерії викликають глибокі біохімічні перетворення, які призводять до повного псування вина.

Лікування вин від захворювань, викликаних молочнокислими бактеріями, – процес трудомісткий, який потребує ретельної обробки вина та тривалого за ним спостереження.

Лікування: сульфітація, оклеювання та обробка адсорбентами (желатин, бентоніт), фільтрація, сульфітація або пастеризація.

Сірководень у вині.

Інколи вина мають неприємний запах сірководню і навіть меркаптану. В окремих випадках такі вина непридатні до вживання. На виникнення сірководню у вині впливає присутність в суслі елементарної сірки, амінокислот, які містять сірку, сульфатів та сульфітів. Встановлено також, що деякі раси дріжджів в процесі спиртового бродіння можуть утворювати у вині сірчистий ангідрид та сірководень і сприяють цьому високі температури бродіння.

Головною причиною розвитку сірководневого запаху є тривала витримка молодих вин на дріжджовому осаді, коли живі дріжджові клітини знаходяться в осаді, який містить сполуки сірки.

Рекоменації.

- Дегустувати молоді вина один-два раза в тиждень до повного освітлення. Зразки потрібно відбирати на дні резервуару. При найменших слідах сірководневого запаху необхідно зняти з дріжджового осаду та провітрити. Іноді рекомендують продувати вуглекислим газом.
- Незначні концентрації сірководню у вині можуть бути усунені за допомогою комбінування сульфітації та провітрювання. При цьому сірководень окиснюється до води та елементарної сірки. Така обробка має відбуватися після повного вибродження, оскільки при відновленні спиртового та яблучно-молочного бродіння елементарна сірка знову перетворюється на сірководень.
- Для попередження появи у вині сірководневого тону необхідно спиртове бродіння проводити при низькій температурі та використовувати чисті культури дріжджів.

Біологічне помутніння вин

Головний процес, який лежить в основі виробництва вин – біотехнологічний і його можна розглядати як результат складної метаболічної активності мікроорганізмів. Тому необхідно контролювати життєдіяльність мікроорганізмів з метою діагностики біохімічних змін, які погіршують якість вин.

Одним із необхідних показників якості вин є стійка прозорість, яка не змінюється під час витримки, зберігання, розливу та транспортування.

Біологічне помутніння пов’язане не тільки з наявністю у вині дріжджових та бактеріальних клітин але і з станом вина і з умовами його зберігання. У виробництві вин та в торговій мережі часто спостерігається таке явище, коли абсолютно прозоре вино втрачає блиск, тускніє, мутніє а на дно бутилки випадає осад. Встановлено, що 90% осадів всіх білих та червоних вин складаються із дріжджових клітин. В деяких осадах крім дріжджів знаходять молочнокислі та оцтовокислі бактерії.

Дріжджове помутніння - викликають присутні дріжджі, наявність яких обумовлена або вторинною інфекцією (з виробничого обладнання при технологічних операціях) або залишковою первинною мікрофлорою сусла.

Сприятливими умовами для розвитку дріжджів є наявність залишкового незброженого цукру, кисню, яким вина збагачуються при технологічних операціях (доливання, відкрите переливання, фільтрація, розлив вина у пляшки й т.д.).

Встановлено, що у відсутності достатньої кількості кисню дріжджі не розвиваються навіть при наявності значної кількості цукру. Збагачення вина киснем сприяє пожвавленню дріжджів, які знаходяться у вині в пригніченому стані та переходу деяких видів, особливо плівчастих, в окисну стадію (окисляють спирт і кислоти).

У більшості випадків помутніння викликають плівчасті дріжджі *Candida mycoderma, p. Pichia, p.Hansenula, p.Brettanomyces,* рідше *S.oviformis, S. vini.*

Установлено, що дріжджі *S. vini* накопичують 13-14% спирту, а подальше доброжування проводять *S.oviformis* до утворення спирту понад 18%. Саме ці дріжджі здатні залишатися у вині роками в життєздатному стані і є причиною поновлення бродіння та появи каламуті.

Бактеріальне помутніння вин. Бактерії - кислотопонижувачі (молочнокислі бактерії) можуть викликати помутніння столових пляшкових вин. Біологічне кислотопониження не повинно проходити спонтанно та стихійно. Цей процес необхідно регулювати, і тоді він буде відбуватися там, де і потрібно.

У винах, які зберігаються при підвищеній температурі, молочнокислі бактерії швидко розмножуються й здійснюють яблучно-молочне бродіння, тим самим викликають кислотопониження. В неконтрольованих ситуаціях ці молочнокислі бактерії викликають помутніння вин.

У кріплених винах клітини молочнокислі бактерії подовжуються, тому що спирт затримує процес поділу, і утворюють осад. Підвищена кількість спирту затримує біохімічну діяльність мікроорганізмів, тому навіть при явному помутнінні глибоких хімічних змін у винах не спостерігається.

У портвейнах та вермутах молочнокислі бактерії утворюють не тільки бактеріальний осад, але й викликають процес молочнокислого скисання.

Рекомендації.

- Проведення повного вибродження;
- Всі технологічні прийоми (доливання, переливання, фільтрація...) проводити без доступу кисню;
- Захист від вторинної дріжджової інфекції;
- Створення оптимальних температурних умов зберігання;
- Застосування холодної стерилізації та сульфітації.

МЕТОДИ ПРИГНІЧЕННЯ РОЗВИТКУ МІКРООРГАНІЗМІВ

Інгібірування мікроорганізмів – часткове або повне пригнічення їх життєдіяльності – необхідне на різних етапах виготовлення вин. Так, якщо при виробництві соків необхідно повністю ліквідувати мікрофлору, то у виноробстві треба затримати розвиток дріжджів-бур'янів бродіння, але без

істотної затримки дії технологічних дріжджів. Неможна допускати розвиток у вині мікроорганізмів, які викликають його захворювання.

Існують фізичні та хімічні методи інгібірування.

Фізичні методи

Обробка холодом.

Низька температура пригнічує життєдіяльність мікроорганізмів, але не вбиває їх. Тому дія холодом лише тимчасово призупиняє розвиток мікроорганізмів на відміну від дії теплом. Обробка холодом застосовується для зупинки спиртового бродіння при виробництві напівсолодких вин. Вина, які зберігаються при низькій температурі, менше піддаються захворюванням.

Оклеювання.

Винні солі, дубильні речовини, барвники, білкові та пектинові речовини коагулюють і випадають в осад, захоплюючи за собою мікрофлору – відбувається так зване оклеювання вина.

Обробка теплом – пастеризація - застосовується для покращення смакових якостей та прискорення дозрівання, головним чином для вин з невеликим вмістом спирту та кислот, і схильних до бактеріальних захворювань.

Пастеризацію ведуть при температурі 50-70^{o}С на протязі 1-2 хв, а спирт, який міститься у вині, є природним інгібітором. Чим більше у вині спирту та кислот, тим нижча температура пастеризації та менший час обробки.

Опромінення, актинізація або холодна стерилізація. Ультрафіолетові, інфрачервоні хвилі та гама-промені вбивають мікроорганізми. Летальна доза залежить від довжини хвилі, виду мікроорганізму, інтенсивності та тривалості опромінення, концентрації мікроорганізмів, щільності середовища та його хімічного складу.

Освітлення (відстоювання, оклеювання, фільтрація, центрифугування) супроводжується зменшенням кількості мікроорганізмів, тому що вони відділяються разом з осадом, а отже відбувається уповільнення та ослаблення їх дії. При фільтрації через знепліднюючі фільтри, мікрофлору можна видалити повністю.

Хімічні методи.

Забезпечення мікробіологічної стабільності вин за допомогою хімічних засобів - найбільш проста технологічна операція. Із всіх консервантів тільки діоксид сірки може бути рекомендований для таких цілей, але він забезпечує стабільність у дозах, відчутних на смак при вживанні вина.

Знайти гідну заміну діоксиду сірки, яка б об’єднала у собі консервуючі та антиоксидантні властивості, дотепер не вдалося, тому що новий антисептик повинен задовольняти багатьом вимогам:

– має бути нешкідливим для людини при вживанні вин у значних кількостях за короткий час;

– не накопичуватися в організмі, та не ставати токсичним;

– не викликати алергію;

– не впливати на нормальну бактеріальну мікрофлору людини;

– не мати помітного впливу на смак та букет вин;

– легко визначатися якісно та кількісно;

– бажано мати антиоксидантні властивості.

Одні і тіж методи інгібірування та дози інгібіторів по-різному діють на мікроорганізми.

Дозування інгібітору залежить від мети даного технологічного прийому (повне або часткове пригнічення мікрофлори), від складу середовища (вміст спирту, цукру, азотистих речовин, pH і т.д.) та від концентрації мікроорганізмів у середовищі. Можливе комбінування декількох інгібіторів, і у цьому випадку доза кожного може бути знижена, а це дуже важливо, тому що будь-який інгібітор у значній дозі впливає на органолептичні показники. Комбінаціями інгібіторів досягають стійкого ефекту стабілізації, особливо напівсолодких вин. У виноробстві в наш час дозволено застосовувати два консерванти: діоксид сірки та сорбіновую кислоту, які в дозволених дозах нажаль не забезпечують тривалої біологічної стабільності вин.

Інгібітори підбирають так, щоб вони доповнювали один одного. Наприклад:

Сорбінова кислота затримує розвиток дріжджів і не впливає на бактерії.

Сірчиста кислота – навпаки, пригнічує розвиток бактерій і не впливає на дріжджі.

Оптимальними дозами є 200 мг/дм^3 сорбінової кислоти разом з 200мг/дм^3 діоксида сірки.

Аллілгірчична олія (АГО) – рідина з різким запахом. Основний компонент – фітонцид гірчиці. Має фунгіцидну та бактеріостатичну дію до 6 місяців. При неправильному зберіганні або передозуванні у вин з'являється часниковий тон. АГО дозволена органами охорони здоров'я України та досить широко застосовується винзаводами.

Юглон і плюмбагін – консерванти рослинного походження. Застосовуються для пригнічення розвитку дріжджів, МКБ, УКБ, але дозволені дози не забезпечують біологічної стабільності вин.

Діетиловий ефір піровугільної кислоти (Піреф). Пригнічує розвиток дріжджів і бактерій, не впливає на плісеневі гриби. Недоліком є утворення канцерогенної речовини (уретану). У країнах СНД він заборонений.

Токсичність *нітрофурілакрилової кислоти* близька до диоксиду сірки, але дози, які застосовуються, значно менші, ніж діоксиду сірки. Після появи в пресі відомостей про канцерогенність фурілової кислоти вона була заборонена для застосування у виноробстві, хоча і давала гарні результати по стабілізації.

Лізин-екс пригнічує розвиток дріжджів і бактерій. Ця речовина виготовляється на основі амінокислоти лізина. Вона не токсична і не мутагенна. Вивчається його вплив на організм людини.

Важливість проблеми мікробіологічної стабілізації вин після розливу без значущої зміни для їх якості змушує вчених продовжувати пошук альтернативних способів пригнічення розвитку мікроорганізмів у вині та пиві.

Лабораторна робота 1
ЗАВДАННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО КОНТРОЛЮ

Завдання мікробіологічного моніторингу є контроль за діяльністю винних дріжджів, своєчасне виявлення мікроорганізмів, які викликають хвороби вин, знижують їх стабільність при зберіганні, псують сировину та допоміжні матеріали.

Мікробіологічний контроль у виробництві проводиться завідувачами лабораторій, фахівцями-мікробіологами з вищою освітою у відповідності з «Інструкціями з мікробіологічного контролю виноробного виробництва» (ІК 10-04-05-40-89). Вони виконують наступні завдання:

– заготовлюють чисті культури дріжджів у лабораторії й забезпечують ними виробництво;

– забезпечують контроль за дотриманням мікробіологічного режиму на всіх стадіях виробництва, вчасно виявляють відхилення від норми й дають вказівки для усунення відхилень;

– готують поживні середовища для проведення лабораторних аналізів;

– проводять мікробіологічний контроль виноматеріалів, тари, обладнання та цехів;

– відповідають за санітарний стан усього виробництва і мікробіологічну стабільність вин.

Результати мікробіологічних досліджень фіксуються в спеціальних журналах.

Мікробіологічний контроль охоплює весь технологічний процес виробництва. Відповідно до інструкцій на заводах передбачені такі місця відбору проб:

- основна сировина – виноград, інші плоди і ягоди;
- допоміжна сировина й матеріали – вакуум-сусло, бекмес, цукор, матеріали для оклеювання та ін.;
- фільтраційна маса після запарювання азбесту й розмішування з вином перед подачею на фільтр (один раз на 10 днів);
- сусло до і після відстою;
- дріжджове розведення (проби відбирають щоразу при подачі розведень у виробництво);
- бродильне сусло (контролюється кожна однорідна партія щодня до зняття з дріжджів);
- вино (контроль проводять перед першим переливанням, під час перекачування в підвал, при витримуванні в бочках, при кожному переливанні);
- вино при відправці та отримуванні;
- бути, цистерни, чани (контролюються щоразу після промивання);
- насоси, шланги, розливальні машини після промивання (один раз на 10 днів), бочки (вибірково один раз на тиждень). Визначається наявність мікроорганізмів в останніх змивних водах;

- пляшки й пробки – вибірково один раз на тиждень. Визначають наявність мікроорганізмів на внутрішній поверхні пляшки й поверхні пробки;
- повітря у виробничих приміщеннях (один раз в 10 днів).

Методи мікробіологічного контролю

На початковому етапі проводять відбір середньої проби. Мікрофлора середньої проби повинна повністю збігатися з мікрофлорою аналізованого об'єкта. Зразки відбирають за допомогою стерильних піпеток, пінцетів у стерильний посуд, уникаючи можливості випадкового забруднення мікроорганізмами іззовні. При кількісних і фізіологічних аналізах велике значення має швидкість відбору проб і дослідження. Залежно від цілей дослідження й характеру зразка методи відбору проби на аналіз можуть бути наступними:

- якщо виноматеріали являють собою однорідний продукт, то відбирають пробу, у протилежному випадку зразок ретельно перемішують і тоді відбирають пробу;
- якщо не допускається перемішування виноматеріалів, тоді відбирають три зразки – із дна, із середньої частини та з поверхні. Потім їх перемішують і розглядають як середній зразок;
- якщо виноматеріали на поверхні мають плівку, на дні – осад і прозора середня частина, то перемішувати не можна, а відбір проб проводять окремо з кожної частини контрольованого об'єкта.

Після відбору проб проводять мікробіологічний контроль. Його можна здійснити двома методами: мікроскопуванням і посівом.

Мікроскопування проводять як просте, так і за допомогою лічильних камер. При мікроскопуванні визначають загальне бактеріальне число (ЗБЧ) у полі зору або в одиниці об'єму рідини. Оцінюють фізіологічний стан і груповий склад мікрофлори. Мікроскопічне дослідження проводять як з попереднім центрифугуванням об'єкта, так і без нього. Сильно інфіковані об'єкти (сусло до й після відстою, виноматеріали, які бродять) перед мікроскопуванням не центрифугують. З попереднім центрифугуванням мікроскопують виноматеріали після обробки й фільтрації, готове вино, змивні води. Мікроскопію проводять у препараті «роздавлена» крапля, об'єктив – 40х, окуляр – 10х.

Посів на поживні середовища здійснюють з метою визначення живих мікроорганізмів і більш точної характеристики окремих груп мікроорганізмів. Після культивування описують колонії, а потім мікроскопують приготовлені з них препарати-мазки.

Лабораторна робота 2
ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА ТА ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

Універсальні поживні середовища

Їх використовують для культивування декількох видів мікроорганізмів.

Вино з цукром. У біле сухе вино об'ємом 100 $см^3$ додають 8-10 % цукру. Після його розчинення середовище фільтрують і розливають по пробірках. Середовище використовують для посіву дріжджів і оцтовокислих бактерій.

Дріжджова вода. Свіжі пресовані масою 70-100 г або сухі дріжджі масою 7-10г розбавляють в дистильованій воді об'ємом 1$дм^3$ і кип'ятять 30хв. Після відстоювання на холоді у високому циліндрі рідину декантують і фільтрують. До фільтрату додають воду об'ємом 1 $дм^3$, ще раз кип'ятять 30хв і знову фільтрують. Для кращого просвітлення рідини можна додати до кип'ятку збитий з водою яєчний білок. У дріжджову воду вносять необхідні речовини (вуглеводи, солі), доводять pH до потрібного значення і стерилізують. Середовище використовують для вирощування дріжджів і молочнокислих бактерій.

Автолізат дріжджів. Готують з пресованих хлібопекарських дріжджів масою 1кг або відмитих з осаду винних дріжджів, розтираючи з водопровідною кип'яченою водою об'ємом 1$дм^3$. Гомогенну масу ставлять в термостат, заздалегідь додавши декілька крапель толуолу, і витримують при помішуванні 48-72год при 40-50°С. Після закінчення процесу автолізу дріжджів масу стерилізують в автоклаві 30хв при 111^0С. Масу після охолодження фільтрують через паперову масу на воронці Бюхнера. Прозорий фільтрат містить 0,9% цукру.

Для приготування середовища автолізат розбавляють водою 1:10 з додаванням 1-2 % цукру. Прозорий автолізат стерилізують при 121°С протягом 20хв. Середовище призначене для вирощування дріжджів і молочнокислих бактерій.

Солодове сусло. Пивне сусло, що не хмелить, фільтрують через паперовий фільтр для видалення осаду білкових речовин. Вміст сухих речовин (%) визначають цукрометром. Шляхом розведення водопровідною водою готують сусло з різним вмістом сухих речовин: для вирощування грибів 2-4 %, дріжджів 6-8 %, молочнокислих бактерій 2-5 %.

Поживні середовища для вирощування дріжджів

Виноградне сусло. Сусло поміщають в колбу і нагрівають до кипіння в кип'ятильнику Коха. Після охолодження його фільтрують від білкових речовин, які випали в осад, через паперовий складчастий фільтр і розливають в пробірки по 5 $см^3$, дбаючи про те, щоб не змочити шийки.

Синтетичне середовище Рідер. До складу середовища входять (г/$дм^3$): сульфат амонію 3,0, сульфат магнію 0,7, нітрат кальцію 0,04, хлорид натрію 0,5, дегідрофосфат калію 1,0, гідрофосфат калію 0,1. Початкова величина pH середовища 6,6. З складу середовища може бути виключений нітрат кальцію, який не використовується дріжджами. Для дослідів із розмноження в середовище додається 2% цукру, для дослідів з бродіння – 5-10 %.

Повне синтетичне середовище містить кристалічні вітаміни (мкг/мл): інозит 5,0, біотин 0,991, пантотенову кислоту 0,25, тіамін 1,0, піридоксин 0,25, нікотинову кислоту 0,5.

Стерилізують середовище в автоклаві при 121°С 20хв, призначене воно

для вирощування дріжджів.

Середа Городкової. До складу середовища входять (г/л): пептон 10, кухонна сіль 5,0, глюкоза 2,5, агар 20. Середовище нейтралізують питною содою до pH 7,3, кип'ятять, до розплавлення агару, фільтрують, розливають в пробірки. Стерилізують в автоклаві при 112 °С протягом 20 хв. Середовище призначене для виявлення аскоспор у дріжджів.

Поживні середовища для молочнокислих бактерій

Капустяне середовище. Подрібнену капусту масою 200г поміщають в каструлю, заливають водою об'ємом 1 дм^3, кип'ятять протягом 10хв, потім віджимають через подвійний шар марлі, одержану рідину фільтрують і в 2 рази розводять водою. До відвару додають 2% глюкози і 1% пептону. Середовище розливають в пробірки високим шаром, по 8-10 см^3 .

Суміш солодового сусла з яблучним. До складу середовища входять солодове сусло з 5 % сухих речовин і яблучне сусло в співвідношенні 1:1. Середовище стерилізують текучою парою 3 дні підряд по 30 хв.

Елективне середовище з етанолом. У всі стерильні рідкі живильні середовища, призначені для висіву молочнокислих бактерій з сусла і вина, перед посівом вводять етиловий спирт (0,95 см^3 спирту і 5,95 см^3 середовища).

Виноградне сусло розбавлене. Сусло розбавляють водою для вмісту цукру 5 %, додають 1 % автолізату дріжджів і доводять pH до 5-6 додаванням розчину лугу (NaOH) = 1 моль/см^3).

Поживні середовища для вирощування оцтовокислих бактерій

Вино з суслом. Середовище складається з виноградного сусла, сухого вина та водопровідної води в рівних частинах. Середовище фільтрують і розливають в пробірки.

Елективне середовище з антибіотиками. У поживному середовищі, що містить 20 од/см^3 мономіцину, при висіві проби досліджуваного вина розвиваються тільки оцтовокислі бактерії, а молочнокислі бактерії не розвиваються.

Лабораторна робота 3
ВИЗНАЧЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ ДРІЖДЖІВ

Мета заняття. Вивчити фізіологічні стадії розвитку винних дріжджів. Навчитися за допомогою мікроскопування визначити стадію фізіологічного стану дріжджів. Освоїти метод забарвлення спор дріжджів.

Завдання. Повторити морфологію винних дріжджів і методику їх мікроскопічного дослідження.

Устаткування і матеріали. Біологічний мікроскоп, розчин метиленового синього, розчин Люголю, зразки дріжджів на різних фізіологічних стадіях розвитку.

В процесі бродіння сусла дріжджі послідовно проходять 6 стадій

розвитку:

1. Брунькування (стадія розмноження) (рис. 16).

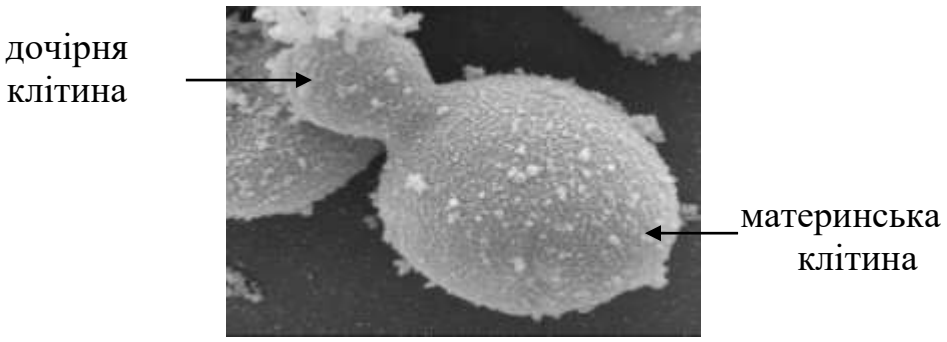


Рис. 16. Брунькування дріжджів

Дочірня клітина менша материнської, від якої вона відбрунькувалася, має однорідну плазму і тонку оболонку, в клітині немає глікогену, тому йодом (розчин Люголя) вона забарвлюється в жовтий колір (відсутня характерна реакція на крохмаль). Після стадії розмноження наступає стадія бродіння.

2.Бродіння. Дріжджі переважно одиночні, цитоплазма зерниста, вакуолі дрібні. У клітинах багато глікогену і жиру, йодом клітини забарвлюються в червоно-бурий колір (реакція на крохмаль).

3.Голодування. Стадія починається після зброджування цукру. Дріжджі осідають на дно рідини і починають витрачати глікоген, тому йодом клітини забарвлюються в жовтий колір.

При тривалому зберіганні в осаді без доступу кисню повітря клітини починають відмирати.

4.Відмирання. Клітини деформуються, цитоплазма відстає від оболонки. Оболонка мертвих клітин легко пропускає барвник, тому 1:10000 розчином метиленової сині вони забарвлюються в синій колір.

5. Автоліз (розкладання клітин).

Описані п'ять стадій послідовно змінюють одна одну. За певних умов спостерігаються ще дві стадії розвитку.

6.Стадія спокою (клітини в стані спокою). Наступає, якщо дріжджі довго знаходяться в осаді при доступі кисню повітря. У цій стадії дріжджі живляться органічними кислотами. Вони мають жир, глікоген, щільну оболонку. У стадії спокою дріжджі стійкі до зовнішніх несприятливих умов.

7.Стадія спороутворення наступає при різкому переході від хорошого живлення до голодування за умови достатньої вологості і наявності кисню повітря. У клітинах утворюються дві, чотири або вісім спор. До несприятливих умов спори стійкіші, ніж вегетативна клітина.

Для визначення спороутворення дріжджі вирощують на середовищі Городкової. Потім мікроскопують в препараті "роздавлена крапля" і проводять забарвлення спор.

Метод забарвлення спор дріжджів: фіксований мазок забарвлюють карболовим фуксином Циля протягом 5-10хв при підігріванні (до появи пари), потім барвник змивають водою і мазок знебарвлюється протягом 1 хвилини солянокислим спиртом), змивають водою і забарвлюють метиленовим синім 3-

5хв при нагріванні. Клітини забарвлюються в синій колір, спори – в червоний.

Порядок виконання роботи

Готують три пробірки із зависсю дріжджів. В одну з них додають розчин метиленового синього, в другу – розчин Люголю, третя містить вихідну завись.

З кожної пробірки готують препарат у лічильній камері Горяєва: наносять дві-три краплини дріжджової завісі, накривають покривним склом і залишають препарати у спокої, доки дріжджі не осядуть на дно камери.

У препараті з вихідної завісі підраховують загальну кількість клітин, кількість клітин, що брунькуються та розраховують їх кількість (%) від загальної.

В препараті з додаванням метиленового синього розраховують кількість живих (незабарвлених) та мертвих (забарвлених) клітин.

В препараті з додаванням розчину Люголю підраховують кількість вгодованих клітин, які містять в собі жовті або коричневі утворення з глікогену.

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити результати забарвлення дріжджів на різних фізіологічних стадіях розвитку розчином Люголю, метиленовим синім, фуксином Циля. Зробити необхідні зарисовки морфології і відзначити у висновках характерні відмінності кожної фізіологічної стадії.

Контрольні питання

1. Які стадії фізіологічного розвитку проходять дріжджові клітини під час бродіння?
2. За яких умов спостерігаються стадії спокою і спороутворення?
3. Як визначають фізіологічний стан дріжджів?

Лабораторна робота 4
МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ВИНОГРАДУ ТА ІНШОЇ ПЛОДОВО-ЯГІДНОЇ СИРОВИНИ

Мета заняття. Ознайомитися з методом мікробіологічного контролю винограду, іншої плодово-ягідної сировини, яка застосовується у виноробстві. Одержати поняття про зв'язок прийомів переробки сировини з оцінкою її якості.

Завдання. Знати принцип роботи центрифуги і її призначення. Повторити методику приготування препарату "роздавлена крапля" і спосіб його мікроскопування, а також видовий склад мікрофлори виноградної ягоди.

Устаткування і матеріали. Лабораторна центрифуга, колби місткістю 50 $см^3$; центрифужні пробірки, пінцети, ложки, предметні і покривні стекла, біологічний мікроскоп, стерильна водопровідна вода, мікробіологічні петлі, виноградні ягоди або інша плодово-ягідна сировина для виноробства, лічильні камери.

Заходи безпеки. При роботі з центрифугою слід користуватися тільки спеціальними пробірками. Рівень рідини в пробірках повинен бути однаковий, а установлювати їх слід в барабан симетрично. Під час обертання кришка

приладу повинна бути закрита і до повної зупинки центрифуги до неї не слід торкатися. Залишати працюючу центрифугу без нагляду не можна. У разі сильної вібрації приладу слід повідомити викладача і відключити центрифугу від мережі.

Порядок виконання лабораторної роботи

Контролюють кожну партію сировини. Визначають якість винограду, від чого залежать подальші прийоми обробки (сортування, дози сульфітації та ін.).

Для мікробіологічного контролю від партії відбирають 50 ягід або 5-10 штук крупних плодів. Відбір проводять стерильною ложкою або пінцетом з різних місць партії. Відібрані ягоди поміщають в колбу із стерильною водопровідною водою об'ємом 50см^3, збовтують 5хв. Змивну воду в об'ємі 10см^3 центрифугують 10хв при 50с$^{-1}$. Осад мікроскопують в препаратах "роздавлена крапля" і розраховують кількість клітин в 1см^3, користуючись лічильноюкамерою.

При виявленні однієї дріжджової клітини або спори цвілі в 3-5 полях зору вважають, що виноград – в хорошому мікробіологічному стані, при виявленні в кожному полі зору до трьох мікроорганізмів – в задовільному стані, якщо ж в кожному полі зору понад трьох мікроорганізмів – в поганому мікробіологічному стані.

При поганому мікробіологічному стані винограду мікробіолог рекомендує підвищені дози сульфітації (до 200 мг/дм^3) при відстоюванні сусла.

Мікробіологічний аналіз вимагає витрат часу, тоді як виноград за інструкцією потрібно переробити не більше ніж через чотири години з моменту збору. Тому контроль проводять за зовнішніми ознаками. Оглядом орієнтовно визначають відсоток дозрілих, пошкоджених, забруднених і цвілих ягід. Результати вносять в журнал.

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

В протоколі слід зазначити результати мікроскопування, зробити зарисовки морфології виявлених в змивах з ягід мікроорганізмів, підраховують кількість мікроорганізмів в 1 см^3 змиву. Зробити висновок про їх групову приналежність і рекомендації щодо прийомів переробки сировини.

Контрольні питання

1.З якою метою проводять мікробіологічні дослідження винограду і іншої плодово-ягідної сировини ?

2.Чому одночасно з мікробіологічним контролем проводиться також огляд сировини за зовнішніми ознаками ?

3.Як оцінюють якість виноградної сировини залежно від якісного і кількісного складу мікрофлори ?

4.Які прийоми переробки призначає технолог, якщо виноград містить пліснявілі ягоди ?

5.З якою метою проводиться центрифугування змивів з сировини?

Лабораторна робота 5-6
ВИДІЛЕННЯ ЧИСТОЇ КУЛЬТУРИ ДРІЖДЖІВ

Мета заняття. Ознайомитися з принципом виділення чистої культури дріжджів з однієї клітини та методом розсіву на агаризованому середовищі.

Завдання. Заздалегідь повторити тему «Виділення чистої культури мікроорганізмів».

Устаткування і матеріали: біологічний мікроскоп, мікробіологічні петлі, чашки Петрі, пробірки, предметні і покривні стекла, пінцети, пір'я, сусло, вазелін або парафін, термостат.

Чистою культурою (ЧК) називають популяцію мікроорганізмів, що складається з клітин одного виду. Прикладом чистої культури є популяція мікроорганізмів, що виросла при посіві однієї клітини.

Виділення чистих культур необхідне для правильного уявлення про їх морфолого-культуральні, фізіологічні властивості, для визначення видової приналежності мікроорганізмів, а також для технологічних цілей (виробництво різних видів вин, пива, кисломолочних продуктів та ін.).

Виділення ЧК проводять в три етапи:

1) одержують накопичувальну культуру.

2) виділяють ЧК з накопичувальної.

3) визначають чистоту виділеної культури.

Етап отримання накопичувальної культури не обов'язковий в тому випадку, якщо в джерелі виділення передбачається висока чисельність виду мікроорганізмів, які нас цікавлять.

Для отримання накопичувальної культури (культура, в якій переважає певна група мікроорганізмів) створюють умови, котрі сприяють переважному розвитку тих мікроорганізмів, які потрібно виділити. Такі умови називають вибірковими (елективними).

Виділення чистої культури проводять з одержаної накопичувальної культури або безпосередньо з досліджуваного матеріалу.

Принципово методи виділення ЧК можуть бути розділені на 2 групи:

- Методи механічного відокремлення мікроорганізмів.
- Методи, засновані на використанні біологічних особливостей мікроорганізмів.

Для виділення чистої культури дріжджів існує класичний використовують ***метод Ліндера***, що відноситься до першої групи методів.

Заздалегідь готують в стерильних пробірках ряд послідовних розведень винних дріжджів в стерильному суслі з таким розрахунком, щоб в невеликій краплі були одиничні клітини. Потім в стерильні чашки Петрі на поверхню стерильного покривного скла стерильним пером наносять ряд дрібних крапель з послідовних розведень дріжджів у стерильному суслі. Скло перевертають і поміщають над лункою стерильного предметного скла. Краї покривного скла замазують розплавленим парафіном або змащують вазеліном, щоб не відбувалося випаровування. При мікроскопуванні препарату "висяча крапля" відзначають краплі, що містять по одній клітинці. Препарати поміщають в

термостат при температурі 25-28 °С. Через 12-24год знову проглядають краплі і відзначають ті, де утворилася одна колонія. Цю краплю обережно знімають (стерильною маленькою смужкою фільтрувального паперу, затиснутого стерильним пінцетом, і вносять її в пробірку із стерильним суслом.

Виділення дріжджів з однієї клітини можна проводити також і за допомогою мікроманіпулятора – спеціального приладу до мікроскопа, який забезпечено набором мікроінструментів. При цьому можна проводити захоплення однієї клітини дріжджів спеціальною мікроскопічною піпеткою або голкою.

До групи механічних методів відокремлення мікроорганізмів відноситься також ***метод розсіву*** вихідної суміші по поверхні щільного поживного середовища, існує багато прийомів такого посіву.

Наприклад, можна, захопивши стерильною петлею дрібну краплинку вихідної суміші, зробити декілька штрихів нею по поверхні середовища, потім, повернувши чашку тою ж петлею зробити ще декілька штрихів і так повторити ще два-три рази. Це дозволяє роз'єднати угрупування клітин і одержати колонію, утворену лише однією клітиною.

Якщо передбачається велика концентрація клітин у вихідній зависі, можна тою ж петлею, не набираючи матеріал, зробити кілька штрихів на новій чашці Петрі з середовищем і т.д. На кожній наступній чашці число колоній буде зменшуватись, колонії будуть більшими за розміром та добре видимими. Цей прийом називають методом виснаження штриха.

Для економії середовищ і посуду можна зробити кілька штрихів однією петлею по секторах однієї чашки. Якщо перший штрих дає суцільний ріст мікроорганізмів то в подальших з'являться відокремлені колонії.

Останній етап роботи (визначення чистоти виділеної культури) здійснюють декількома способами: візуально, мікроскопічним контролем і висівом на ряд поживних середовищ.

Візуально перевіряють характер розмноження виділеної ЧК на твердому поживному середовищі. ЧК утворює однорідні за морфологією, консистенцією і пігментацією колонії.

Для мікроскопічного контролю готують фіксований мазок, забарвлюють метиленовим синім або фуксином і досліджують його імерсійною системою. ЧК повинна бути морфологічно однорідна, допустиме лише незначне варіювання розмірів клітини.

Порядок виконання лабораторної роботи

Готують стерильні чашки Петрі із товстим шаром (5-8мм) поживного середовища і пробірку з зависсю мікроорганізмів, з якої потрібно виділити чисту культуру дріжджів.

Стерильною петлею беруть краплину завісі і наносять її на поживне середовище біля краю чашки. Потім петлею роблять штрихи по поверхні середовища, спочатку розташовуючи їх густо а потім все рідше. Коли штрихи зроблені по всій поверхні середовища, чашку обертають на 90^0 і знову роблять штрихи, але нової завісі не набирають.

Якщо краплина вийшла досить великою, дозволяється після нанесення її

на середовище профламбувати петлю і після охолодження робити розсів штрихом, як написано вище.

Після культивування посівів протягом двох-трьох діб обирають добре відокремлену колонію культури, що виділяють, відсівають її в пробірку з відповідним середовищем, а залишок колонії мікроскопують.

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити морфологію одиничної клітини, яка спостерігається в препараті. Описати характер колонії, що виросла, результати перевірки чистоти виділеної культури дріжджів і зробити висновок про результати роботи.

Контрольні питання

1. Яку культуру називають чистою?
2. Які основні етапи виділення чистої культури?
3. Як визначають чистоту виділеної культури?

Лабораторна робота 7
МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ОБЛАДНАННЯ І ЄМНОСТЕЙ

Мета заняття. Ознайомитися з методами мікробіологічного контролю устаткування і ємностей. Навчитися оцінювати якість миття за шкалою Саєнко.

Завдання. Заздалегідь ознайомитися з необхідними джерелами літератури.

Устаткування і матеріали. Біологічний мікроскоп, предметні і покривні стекла, мікробіологічні петлі, стерильні ватяні тампони.

Порядок виконання лабораторної роботи

Для оцінки якості миття визначають такі показники:

а) зовнішній огляд (установлюють наявність механічних забруднень або стороннього запаху),

б) прозорість і забарвлення змивної води;

в) наявність мікроорганізмів в останній порції змивної води або мазках з поверхні контрольованого об'єкта.

Результати оцінки миття:

а) при зовнішньому огляді внутрішню поверхню ємкостей, устаткування освітлюють електричною лампою, при цьому особливо звертають увагу на упори в бутах і кутах цистерн, оскільки їх важко обробляти. При хорошому митті на внутрішніх поверхнях не повинно бути механічних частинок;

б)остання промивна вода повинна бути абсолютно прозорою і безбарвною; змивну воду мікроскопують після центрифугування (10хв, 25 $с^{-1}$);

в) мазки з контрольованої поверхні беруть на площі 10х10 см злегка подовженим тампоном за допомогою пінцета або дроту. Віджату краплю змивної води з тампона поміщають на предметне скло, мікроскопують і результати контролю якості миття устаткування і ємностей оцінюють за шкалою Саєнко (табл. 1).

Таблиця1.- Шкала оцінки якості миття (шкала Саєнко)

Зовнішній вигляд останньої змивної води	Вміст клітин в полі зору			Оцінка
	Дріжджів	Бактерій	Плісеневих грибів	
Прозора, не забарвлена	0	0	0	Добре
Прозора, не забарвлена	Одиничні відмерлі або пригнічені	0	0	Задовільно
Прозора, не забарвлена	Одиничні, в доброму стані	0	0	Погано
Прозора, не забарвлена	0	Одиничні ОКБ або МКБ	0	Погано
Прозора, не забарвлена	0	0	Одиничні спори	Погано
Мутна або забарвлена	0	0	0	Погано

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити результати мікроскопування. Зробити зарисовки морфології мікроорганізмів, виявлених в змивах. Записати висновки про чистоту устаткування і ємностей.

Контрольні питання

1.З якою метою проводять мікробіологічний контроль устаткування і ємностей?

2.Яким чином оцінюють результати мікроскопування змивної води або мазка?

Лабораторна робота 8-9
МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ДОПОМІЖНИХ МАТЕРІАЛІВ (АЗБЕСТ, КЛЕЙ, ЦУКОР, ЖЕЛАТИН, ПРОБКИ, ПЛЯШКИ)

Мета заняття. Ознайомитися з методом мікробіологічного контролю азбесту, клею, желатину, пробок, пляшок, цукру. Після проведення аналізу зробити висновок про якість миття пляшок, допоміжних матеріалів і чистоту цукру, оклеюючих матеріалів.

Завдання. Заздалегідь ознайомитися з джерелами літератури

Устаткування і матеріали. Лабораторна центрифуга, колби, ємністю 50см^3, центрифужні пробірки, предметні і покривні стекла, біологічний мікроскоп, стерильна водопровідна вода, мікробіологічні петлі, допоміжні матеріали.

Порядок виконання лабораторної роботи

Про чистоту допоміжних матеріалів судять по відсутності мікробів, шкідливих для виноробства. Об'єкти контролю: азбест, клей, желатин, цукор. Контролюється кожна партія.

Контроль азбесту, клею, желатину. У стерильну колбу з водопровідною стерильною водою об'ємом 50 $см^3$ відважують, дотримуючись стерильності, азбест масою 1г, клею або желатину. Енергійно струшують колбу протягом 5хв, потім стерильною піпеткою з колби відбирають 1 $см^3$ і роблять посів у агаризоване вино з цукром, 10$см^3$ змивної води з колби центрифугують протягом 10хв при 25$с^{-1}$, потім мікроскопують.

Оклеюючі матеріали не повинні містити плівчастих дріжджів і бактерій - збудників хвороб вина (табл.2).

Контроль пробок проводять вибірково один раз на тиждень. В стерильну водопровідну воду об'ємом 50 $см^3$ поміщають 3 пробки, збовтують 5хв, 1$см^3$ змивної води після збовтування висівають в агаризоване вино з цукром. Посіви культивують 3-5 діб при температурі 25°С. Підраховують кількість мікроорганізмів на чашці, отриманий результат ділять на 3 (3 пробки), тобто визначають кількість мікроорганізмів на одній пробці. Одночасно з посівом 10$см^3$ змивної води центрифугують 10хв при 25 $с^{-1}$, потім мікроскопують.

Таблиця 2 – Шкала мікробіологічної оцінки матеріалів для оклеювання

Об'єкт контролю	Мікроорганізми у полі зору	Зовнішній вигляд змивної води	Наявність у змивній воді (КУО/$см^3$)			Оцінка якості	Рекомендації
			Дріжджів	Бактерій	Плісеневих грибів		
Азбест	Відсутні	Без кольору і запаху	0	0	0	Задовільно	–
Клей	Відсутні	Без кольору і запаху	0	0	0	Задовільно	–
Желатин	Є мікроорганізми	Без кольору і запаху	1	1	1	Незадовільно	Посилити термічну обробку

Контроль пляшок. У дві пляшки заливають стерильну воду об'ємом 50$см^3$, проводять змив. Змивну воду центрифугують протягом 10хв при 25$с^{-1}$ і осад мікроскопують, або проводять посів у щільні середовища.

Оцінку якості обробки пробок і пляшок проводять за нижченаведеною шкалою.

Таблиця 3 – Шкала оцінки миття пробок і пляшок

Наявність мікроорганізмів в осаді	Зовнішній вигляд змивної води	Наявність у змивній воді			Оцінка якості	Рекомендації
		Дріжджів	Бактерій	Плісеневих грибів		
Відсутні	Прозора, не забарвлена	0	0	1	Задовільно	–
Є	Прозора, не забарвлена	1	0	0	Незадо-вільно	Перевірити режим машини
Є	Прозора, не забарвлена	0	1	0	Незадо-вільно	Теж саме
Відсутні	Мутна або забарвлена	0	0	0	Незадо-вільно	Теж саме

Контроль цукру. Контролюють кожну партію. Під час надходження проводять зовнішній огляд партії на сухість, сипучість, запах. Для мікробіологічного контролю з партії відбирають 5 проб масою по 200г. Аналіз всіх проб проводять паралельно. З відібраної проби готують 10% цукровий розчин. З цього розчину 1см^3 висівають глибинним посівом в кислий СА (рН4,5). Вирощують 48 годин при 28-30°С.

Норми мікробної забрудненості на 10г цукру: дріжджів – не більше 50 клітин, плісеневих грибів – не більше 30 клітин, слизотворних бактерій – не більше 200 клітин. Цукор не повинен містити мікроорганізмів – збудників хвороб вина.

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити результати мікроскопування матеріалів для оклеювання, цукру, змивної води з пробірок і пляшок. Необхідно зробити висновок про мікробіологічний стан допоміжних матеріалів.

Контрольні питання

1. З якою метою проводять контроль допоміжних матеріалів?
2. Якими методами проводять контроль допоміжних матеріалів?
3. Які критерії оцінки стану допоміжних матеріалів?

Лабораторна робота 10
МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ СУСЛА ТА МЕЗГИ

Мета заняття. Ознайомитися з методом мікробіологічного контролю сусла і мезги. Одержати поняття про критерії оцінки стану сусла та практичні рекомендації для правильного режиму сульфітації.

Завдання. Заздалегідь ознайомитися з відповідними джерелами літератури. Повторити морфологію культурних і диких видів дріжджів, плісеневих грибів, оцтово- і молочнокислих бактерій.

Устаткування і матеріали. Біологічний мікроскоп, предметні і покривні стекла, стерильна водопровідна вода, мікробіологічні петлі, колби, виноградне

сусло, мезга.

Порядок виконання лабораторної роботи

Проби відбирають в пресовому відділенні від кожної партії. Контроль проводять мікроскопією в препараті "роздавлена крапля", проглядають не менше десяти полів зору.

У суслі до відстоювання визначають співвідношення між культурними і дикими дріжджами, виявляють наявність сторонніх мікроорганізмів (бактерії і плісеневі гриби). Метою контролю є вибір умов відстоювання. Результати вносять в таблицю 4.

Таблиця 4. - Мікробіологічна оцінка стану сусла

Номер поля зору	Кількість мікроорганізмів в полі зору			
	Загальне число	Культурних дріжджів	Диких дріжджів	Сторонніх
1. 2. . . . 10				
Середня кількість в одному полі зору	Приймається за100%			

Аналогічно контролюють сусло після відстоювання.

Метою контролю є перевірка правильності ведення відстоювання. Засульфітоване сусло, що добре відстоялося, не повинно містити диких дріжджів або сторонніх мікроорганізмів. Особливо ретельно слід проводити відстоювання сусла для приготування шампанських і червоних виноматеріалів.

При прямому мікроскопуванні сусла після відстоювання в ньому повинно міститися не більше однієї-двох клітин мікроорганізмів в 10 полях зору. Таким же методом досліджують мезгу червоного винограду перед перекачуванням її в бродильний чан.

Концентрація $S0_2$, що вноситься, повинна бути такою, щоб до моменту внесення чистої культури дріжджів у суслі залишалося не менше 100 мг/дм^3 загального SO_2 і 30 мг/дм^3 вільного. У мезгу червоного винограду слід вносити $S0_2$ в межах 250 мг/ дм^3.

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити результати мікроскопування, визначити морфологію мікроорганізмів і їх середню кількість в одному полі зору. Зробити висновки про правильність сульфітації сусла.

Контрольні питання

1. З якою метою проводять мікробіологічні дослідження сусла і мезги?
2. В чому суть методу дослідження?

Лабораторна робота 11
МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ПОВІТРЯ ЦЕХІВ ВИНОРОБНИХ ПІДПРИЄМСТВ

Мета заняття. Познайомитися з методами мікробіологічного дослідження повітря цехів, вимогами до мікробіологічної чистоти повітряного середовища. Навчити студентів практично визначати забрудненість повітря небезпечними для виноробства мікроорганізмами.

Завдання. Ознайомитися з літературними джерелами

Устаткування і матеріали. Чашки Петрі, щільне поживне середовище – агаризоване вино, спиртівки, апарат Кротова.

Повітряне середовище виноробних цехів може мати істотний вплив на якість продукції. В повітрі винних цехів можуть бути присутніми різні види "диких" дріжджів, цвілевих грибів, молочно- і оцтовокислих бактерій, які інфікують виноматеріали і викликають в них небажані процеси (повторне забродження, скисання, появу різних пороків).

Тому у виноробстві необхідно не рідше одного разу на місяць проводити мікробіологічний контроль повітря.

Для дослідження мікрофлори приміщень можна користуватися седиментаційним методом Коха і методом Кротова. Останній метод дозволяє уловлювати мікрофлору повітря за допомогою спеціального приладу, сконструйованого Ю.А. Кротовим. Цей метод дозволяє одержувати точніші результати.

Проте на практиці дуже зручно використовувати метод Коха, який більш простий і не вимагає спеціального устаткування. Метод описано в «Інструкції з мікробіологічного контролю Радянського шампанського» (ІК 10-04-05-11-87) та «Інструкції з мікробіологічного контролю виноробного виробництва» (ІК 10-04-05-40-89). Метод Коха дає можливість одержати дані не про вміст абсолютно всіх мікроорганізмів у повітрі, а лише про таких, що осідають з пилом. За допомогою методу Коха визначається всього лише 35-60 % мікроорганізмів повітря.

Методика визначення за Кохом полягає в тому, що чашки Петрі із стерильним поживним середовищем (агаризоване вино) залишають на деякий час відкритими. Час експозиції вибирають від 5 до 30хв залежно від передбачуваного ступеня забруднення повітря. Чим чистіше повітря, тим коротший час експозиції.

Посіви культивують в термостаті за температури 25°С протягом трьох-п’яти діб. Потім підраховують колонії, що виросли, і проводять розрахунок загального мікробного забруднення повітря за формулою Омелянського:

$$X = \frac{a \cdot 100 \cdot 5 \cdot 100}{F \cdot \tau} \quad \text{КУО/м}^3 \qquad (1)$$

τ - час експозиції, хвилини;

F- площа чашки Петрі, см^2;

а - кількість колоній на чашці Петрі;

100 – для перерахунку площі чашки на 100см^2;

100 – для обчислювання числа мікроорганізмів в 1000дм^3, тобто в 1м^3.

Мікроорганізмів у повітрі виноробних цехів повинно бути не більше, ніж в зовнішньому повітрі. Проте при цьому не повинні бути присутніми мікроорганізми, що є специфічними шкідниками виробництва (плівчасті дріжджі, гриби *Mucor, Aspergillus, Penicillium, Botrytis cinerea, Sphaerulina intermixta,* молочно- і оцтовокислі бактерії). Тому мікробіологічний матеріал на чашках Петрі використовують також для вивчення видового складу мікрофлори.

У випадку, якщо мікробіологічний аналіз повітря виявився незадовільним, проводять обробку цеху сірчистим ангідридом, здійснюють санітарне прибирання, побілку стін і стель з додаванням мідного купоросу.

Порядок виконання лабораторної роботи

Проводять посів повітря на агаризоване вино, роблять облік колоній, що виросли, вивчають груповий склад мікрофлори мікроскопуванням колоній міцеліальних грибів з об'єктивом 8х, а дріжджів - у фіксованих мазках з об’єктивом 90х.

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити результати обліку посівів повітря, зробити висновок про його мікробіологічну чистоту. Зробити зарисовки морфології мікроорганізмів, що виросли в колоніях на чашці Петрі, відзначити культуральні властивості. Необхідно провести орієнтовну ідентифікацію мікроорганізмів, що вивчаються, і відзначити наявність специфічних шкідників виробництва.

Контрольні питання

1.Якими методами можна контролювати мікробіологічну чистоту повітря цехів виноробних підприємств?

2.Які вимоги ставляться до чистоти повітря цехів у виноробстві?

3.Присутність яких мікроорганізмів в повітрі є найбільш небезпечним на виноробних підприємствах?

4. За якими морфологічними ознаками розрізняють культурні та дикі дріжджі?

Лабораторна робота 12
ПРИГОТУВАННЯ ТА КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЧОГО РОЗВЕДЕННЯ ДРІЖДЖІВ

Мета заняття. Засвоїти принцип приготування дріжджового розведення, навчитися готувати сусло для дріжджового розведення, практично визначити в даному завданні стан і кількість дріжджів у дріжджовому розведенні. Ознайомитися з будовою лічильної камери Розенталя, принципом підрахунку дріжджових клітин.

Завдання. Заздалегідь ознайомитися з джерелами літератури.

Устаткування і матеріали. Біологічний мікроскоп, пробірки, колби, лічильні камери Розенталя, покривні стекла, мікробіологічні петлі, розчин метиленового синього, сусло, розведення винних дріжджів.

Порядок виконання лабораторної роботи

Завдання І. Приготування розведення чистої культури дріжджів.

Сусло для приготування лабораторного дріжджового розведення одержують наступний чином. Свіжевіджате сусло фільтрують через папір в колбу, нагрівають до кипіння, потім охолоджують, фільтрують через подвійний паперовий фільтр і розливають в пробірки, колби, балони – на 2/3 їх місткості. Наливати сусло в ємність треба через лійку, оскільки якщо шийка місткості намокне, то до стінок його прилипатимуть ватяні пробки. Посуд з середовищем закривають ватяною пробкою, яку загортають папером. Стерилізують в кип'ятильнику Коха 20-30хв або на водяній бані на протязі 30хв, рахуючи з початку кипіння води в бані.

Сусло для приготування виробничого дріжджового розведення можна одержати, заповнюючи підготовлені бочки гарячим суслом, що має температуру 70-80ºС (безпосередньо з пастеризатора). Якщо немає пастеризатора, то свіже сусло заливають в бочки на 2/3 місткості, стерилізують гострою парою і кип'ятять 20хв. Після закінчення нагрівання бочки закривають прошпареним шпунтом, обгорнутим тонким шаром стерильної вати. Посів проводять після повного охолодження середовища. Бочки для приготування розведення повинні бути чистими, цілими, добре пропареними.

Приготування розведення ЧКД полягає в поступовому накопиченні маси активних дріжджів, достатньої для зброджування необхідного об'єму сусла. З пробірки з агаризованим суслом дріжджі стерильно пересівають в пробірку із стерильним рідким суслом, а після бурхливого зброджування пересівають в наступну пробірку. Потім послідовно роблять пересіви у всезростаючі об'єми стерильного сусла: 200см^3, 1дм^3, 10дм^3, 30дм^3 і т.д. Кожне подальше пересівання проводять після досягнення бурхливого бродіння в попередній місткості. Температуру потрібно підтримівати оптимальною для даних дріжджів.

Для приготування нового розведення частину готового виробничого розведення залишають в матковій бочці і доливають стерилізованим і охолодженим суслом у співвідношенні 1:9. Заброджує нове розведення через 24-48 годин.

У сусло, що підлягає зброджуванню, дріжджове розведення вносять в співвідношенні 2:48-1:49 до зброджуваного сусла.

Заводи виписують ЧКД із спеціальних інститутів або лабораторій. Дріжджі висилають на щільному скошеному живильному середовищі, найчастіше на сусло-агарі в пробірках або флаконах, закритих ватяними пробками і обв'язаних пергаментним папером. У пробірках дріжджі ростуть на поверхні СА у вигляді білуватого нальоту. Молода культура росте рівномірно, в старій культурі розмноження в центрі товсте, складчасте, по краях рівне, біле. Зберігати чисті культури дріжджів на СА можна до 30 днів, рахуючи з для пересівання. Зберігають їх в сухому місці за температури не вище 15°С. Чисті культури в рідкому суслі можна зберігати до трьох місяців. В період лабораторної підготовки культури слід пересівати не рідше одного разу в десять днів. Перед приготуванням розведення перевіряють чистоту культури

мікроскопією і за характером росту на СА.

Колонії плівчастих дріжджів в порівнянні з колоніями винних дріжджів звичайно плоскіші, матові, з менш щільним зчепленням клітин біля краю колонії.

При мікроскопії плівчасті дріжджі мають паличкоподібну, циліндричну, ковбасоподібну, круглу форму. Клітини часто утворюють несправжній міцелій, спори в клітинах не виявляються.

Завдання 2. Контроль дріжджового розведення

Готове дріжджове розведення обов'язково контролюють мікроскопуванням. Визначають у відсотках співвідношення живих, мертвих, таких, що брунькуються, угодованих дріжджів. У розведенні ЧКД не повинно бути сторонніх мікроорганізмів. Підраховують кількість клітин в 1см^3 розведення.

Активне дріжджове розведення повинно містити близько 150 млн. клітин в 1см^3; 50-60 % дріжджів, що брунькуються; 60-80 % угодованих (у стадії бродіння); не більше 5% мертвих клітин. У активному бактерійному розведенні повинно бути 50-70 млн. клітин бактерій в 1см^3. У виноматеріал і вино вносять 5-10% дріжджового розведення.

Для визначення концентрації (числа клітин) дріжджів в 1см^3 бродячого сусла або дріжджового розведення застосовується лічильні камери Розенталя, Тома-Цейса, Горяєва, Бюргера, Предтеченського.

Будова камери. Камера Розенталя є товстим предметним склом, на якому відшліфовані три площини. Середня площина на 0,2мм нижча, ніж бічні (0,2мм – це висота камери). Крім того, вона розділена додатковим прорізом на дві однакові половинки у вигляді правильних квадратів. На кожному з квадратів алмазом нанесена сітка, яка розділена вертикальними і горизонтальними лініями на квадрати. Кожен квадрат має по 16 малих квадратів. Сторона малого квадрата дорівнює 1/4 мм.

Принцип підрахунку. У досліджувану пробу дріжджового розведення додають рівне співвідношення (1:1) розчину сірчаної кислоти (H_2SO_4) = 100 г/дм^3 і ретельно перемішують для роз'єднання скупчення клітин. Краплі на сітку наносять сухою скляною паличкою, покривають покривним склом. В кожному препараті лічильної камери, наприклад Тома-Цейсса, підраховують клітини в 5 великих квадратах – по кутам камери та в центрі. Густі суспензії потрібно розвести водою з таким розрахунком, щоб кількість клітин в одному великому квадраті була не більше 30. Для того, щоб результат був достовірним, необхідно підрахувати не менше 600 мікроорганізмів.

Для того щоб визначити кількість клітин в 1 см^3 досліджуваного матеріалу, потрібно середню суму в 5 великих квадратах помножити на 50000. Зручно користуватися формулою:

$$X = a \cdot 50000 \cdot б, \qquad (2)$$

де а – сума клітин 5 великих квадратів;

б – розведення первинної суспензії мікроорганізмів;

50000 – коефіцієнт перерахунку об’єму п’яти великих квадратів на 1 см^3.

Отриманні результати виражають в млн./см^3.

При диференційованому підрахунку дріжджів, які брунькуються, живих і мертвих клітин на сітку наносять краплю суспензії без сірчаної кислоти і додають краплю водного розчину метиленового синього, перемішують, накривають покривним склом і притирають його. Через 5хв після приготування препарату підраховують окремо кількість дріжджів, які брунькуються, а також мертвих клітин (забарвлених в синій колір). При оцінці результатів слід враховувати розведення барвником вдвоє.

Слід також врахувати, що при мікроскопії не можна користуватися великими збільшеннями, оскільки для сильних об'єктивів відстань фронтальної лінзи при установці на фокусі завжди значно менша висоти шару рідини в камері разом із товщиною покривного скла. Тому не можна побачити клітини, які лежать на дні камери. Мікроскопують із збільшенням у 80 разів (об'єктив 8х, окуляр 10х).

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити методику, за якою на занятті проводили приготування розведення ЧКД, результати мікроскопування і підрахунку за допомогою камери Розенталя. У висновках вказати загальну кількість клітин в 1см^3 одержаного дріжджового розведення, відсотковий вміст дріжджових клітин, що брунькуються, угодованих і мертвих.

Контрольні питання

1. Яку культуру мікроорганізмів називають чистою?
2. Чому у виноробстві слід використовувати для зброджування сусла чисту культуру дріжджів ?
3. До чого зводиться принцип отримання активного дріжджового розведення для виробничих цілей?
4. Яким чином проводиться оцінка якості дріжджового розведення і які параметри служать критерієм для оцінки?

Лабораторна робота 13
МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ЗА ПРОЦЕСОМ БРОДІННЯ

Мета заняття. Ознайомитися з нормами мікробіологічного контролю за процесом бродіння і моніторингу показників стану дріжджових клітин і середовища. Навчитися оцінювати стан бродячого сусла і давати правильні рекомендації з метою усунення відхилень в ході бродіння.

Завдання. Заздалегідь ознайомитися з джерелами літератури. Повторити хімізм процесу спиртового бродіння.

Устаткування і матеріали. Біологічний мікроскоп, мікробіологічні петлі, колби, сусло і дріжджі, ареометри, термометри.

Порядок виконання лабораторної роботи

Відбирають середню пробу в кожній бродильній ємності. Контроль проводять на різних стадіях бродіння. Мета – усунення недоліків в ході спиртового бродіння. Навіть при нормальному ході бродіння контролюють кожну однорідну партію.

Про хід бродіння судять по виділенню $C0_2$, зменшенню питомої ваги цукрів, підвищенню температури сусла. Вимірювання проводять на початку заброджування і надалі під час бродіння два-три рази до зняття з дріжджів. Результати відзначають на графіку. Графік викреслюють для кожної партії при бродінні в бочках і для кожної великої ємності.

При уповільненні ходу бродіння з метою з'ясування причин визначають вміст $S0_2$ і фізіологічний стан дріжджів: відсоток дріжджів з глікогеном і тих, що брунькуються, відсоток мертвих клітин, наявність диких дріжджів і бактерій. Підраховують кількість дріжджів в 1 $см^3$ бродячого сусла, перевіряють бродильну енергію ЧКД і дають рекомендації. При цьому кількість мертвих клітин, диких дріжджів і бактерій повинна бути мінімальною (до 1%).

Щоб уникнути відхилень в ході бродіння, краще зброджувати виноградне сусло за температури 16-20ºС. Температура бродіння вище за 30ºС знижує життєздатність дріжджів, вони відмирають і автолізуються, бродіння сповільнюється, вина залишаються із значною кількістю незбродженого цукру, що сприяє розвитку молочно- і оцтовокислих бактерій. Температура бродіння підтримується за допомогою холодильних установок або теплообмінників.

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити на графіку хід бродіння за зменшенням питомої ваги цукру, а також зміною температури. За допомогою мікроскопування на початку, в середині і кінці ходу бродіння визначити фізіологічний стан дріжджів (відсотковий вміст клітин з глікогеном, тих, що брунькуються, мертвих), наявність диких дріжджів і бактерій, а також число дріжджових клітин в 1 $см^3$. Зробити висновок про хід бродіння і необхідні рекомендації.

Контрольні питання

1.Які зміни відбуваються при бродінні сусла?

2.Яким чином оцінюють фізіологічний стан дріжджів в процесі бродіння?

Лабораторна робота 14
ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ СТІЙКОСТІ ВИНОМАТЕРІАЛІВ І ВИН

Мета заняття. Ознайомитися з порядком відбору середньої проби, та з методами випробування вин на можливість помутніння, які викликають оцтово- і молочнокислі бактерії. Ознайомитися з критеріями мікробіологічного стану вина.

Завдання. Заздалегідь ознайомитися з джерелом літератури.

Устаткування і матеріали. Біологічний мікроскоп, мікробіологічні петлі, колби, пробірки, зразки виноматеріалів, спирт-ректифікат, поживні середовища (сусло-агар, виноградне сусло).

Порядок виконання лабораторної роботи

Пробу відбирають стерильно від однорідної партії вина, а у разі потреби - з кожної ємності. Якщо вино довго залишалося на відпочинку, проби

відбирають з товщі вина і обов'язково з осаду. Стерильною піпеткою з середньої проби відбирають вино об'ємом 10 $см^3$ і центрифугують 10хв при 25 $с^{-1}$. Осад після центрифугування мікроскопують.

В оброблених винах допускається наявність однієї-двох клітин мікроорганізмів в полях зору препарату. За наявності мікроорганізмів в кожному полі зору вино вважають інфікованим і піддають подальшому дослідженню:

а)столові вина випробовують на схильність до помутніння, які викликають дріжджі і оцтовокислі бактерії. Для посіву вина на дріжджі і оцтовокислі бактерії використовують середовище вино-цукор-агар або вино з цукром. Для вирощування оцтовокислих бактерій можна використовувати вино з виноградним суслом, для вирощування дріжджів - виноградне сусло або сусло-агар;

б)всі типи вин випробовують на схильність до помутніння, яке викликають молочнокислі бактерії. Для посіву на наявність молочнокислих бактерій можуть бути використані середовища з автолізату дріжджів, капустяного відвару, розбавленого виноградного сусла. Щоб попередити розвиток сторонньої мікрофлори, до поживних середовищ додають спирт з розрахунку 0,6-0,8 $см^3$ спирту-ректифікату на 5$см^3$ середовища. Якщо молочнокислі бактерії знаходяться в активному стані (сусла що бродять, молоді вина), спирт в середовище додають перед посівом. Якщо молочнокислі бактерії знаходяться в малоактивному стані (старі вина), то спирт в середовище додають через добу після посіву. При висіві на наявність молочнокислих бактерій вина, в яких знаходиться багато дріжджів, для кращого пригнічення розмноження дріжджів цукор в автолізат додавати не слід.

У поживне середовище вносять досліджуване вино об'ємом 1$см^3$. Якщо при мікроскопії в полі зору було виявлено 10 і більше клітин молочнокислих бактерій, то для посіву беруть 0,1$см^3$ вина. Посіви культивують 6 діб при температурі 25-27°С. Оцінка мікробіологічного стану вина проводиться за наступною шкалою(табл.5).

За наявності у вині молочнокислих бактерій вино піддають також дослідженню прискореним методом (метод Є.І. Квасникова і Г.Ф. Кондо). Готують будь-яке поживне середовище, сприятливе для розвитку молочнокислих бактерій. У 10 $см^3$ середовища додають фенолфталеїн (як індикатор) і титрують розчином гідроокису натрію С (NaOH)= 0,1 моль/$дм^3$ до блідо-рожевого кольору.

Потім все середовище нейтралізують необхідною кількістю лугу до pH 8,0, вводять розчин лакмоїду (змінюють забарвлення в межах pH 4,4-6,4) об'ємом 2-3$см^3$ на кожні 100$см^3$ середовища, розливають в пробірки по 5$см^3$ і стерилізують. Готове середовище повинно мати синій колір. В пробірки, які містять 5$см^3$ середовища, заливають по одній краплі досліджуваного вина. Посіви культивують при температурі 25-27ºС протягом 5 діб, переглядають щодня.

Таблиця 5 – Оцінка мікробіологічної стійкості виноматеріалів і вин

Доба, коли помічено розвиток мікроорганізмів	Наявність мікроорганізмів у вині під час розвитку				
	мікроміцетів		ОКБ	Суміші дріжджів та ОКБ	МКБ
	Винних дріжджів	Плісеневих грибів			
Перша	Нестійке	Здатні до захворювання, а за наявності характерних змін – хворе цвіллю	Хворе	Хворе	Спостерігання за посівом починають через три доби
Друга	Нестійке	Якщо вино каламутне – початкова стадія захворювання; якщо вино прозоре – нестійке	Хворе	Хворе	
Третя	Нестійке	Нестійке	Нестійке	Нестійке	Здатні до захворювання, а за наявності характерних змін – хворе
Четверта	Стійке	Стійке	Нестійке	Нестійке	Нестійке
П’ята	Стійке	Стійке	Нестійке	Нестійке	Нестійке
Шоста	Стійке	Стійке	Стійке	Стійке	Нестійке

Почервоніння середовища, утворення характерної муті і осаду свідчить про розвиток молочнокислих бактерій. Результати визначають за шкалою активності молочнокислих бактерій (табл. 6).

Примітка: замість фенолфталеїну можна використати комбінований індикатор: бромкрезол-пурпур і крезол зелений. За допомогою цього індикатора в поживному середовищі установлюють pH 7,0; при такому pH колір середовища в присутності індикатора темно-синій. Після висіву досліджуваного вина за зміною забарвлення середовища можна судити про розвиток молочнокислих бактерій. Ці бактерії утворюють молочну кислоту, тому збільшується активна кислотність і при pH 6 забарвлення буде синє, pH 5 – зелене, pH 4 – жовто-зелене, pH 3 – світло-жовте.

Виноматеріали з високою титрованою кислотністю і наявністю бактерій типу молочнокислих кислотознижувачів перевіряють хроматографічним методом на наявність яблучної кислоти. При виявленні яблучної кислоти вирішують питання про залишення виноматеріалу для окремих типів вин до закінчення яблучно-молочного бродіння або припинення цього бродіння стерилізацією.

Таблиця 6 – Шкала оцінки активності молочнокислих бактерій

МКБ	Час (діб)		Кількість гідроокису на титрування середовища	Характер росту	Мікроскопічна картина
	Від посіву до початку почервоніння середовища	Від посіву до початку знебарвлення			
Немає	Без змін	Без змін	0	Росту немає	Бактерій немає
Слабка активність	4	5	0,3 – 0,5	Каламуть, осад, шовковисті хвилі	Багато паличок
Активні	3	3 – 4	0,5 – 1	Теж саме	Багато паличок
Дуже активні	2	3 – 4	1 – 3,5	Теж саме	Багато паличок
Надзвичайно активні	1	2 – 3	3 – 4	Теж саме	Багато паличок
Немає	1 – 2	2 – 3	0,1 – 0,3	Пластівцеподібний зернистий осад або плівка	Дріжджі

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити результати мікроскопування центрифугованої проби вина. Необхідно зробити висновок про доцільність проведення подальшого дослідження на схильність до помутніння, викликаного дріжджами, оцтовокислими бактеріями і молочнокислими бактеріями. Слід обгрунтувати вибір поживного середовища для проведення дослідження. Відзначити в протоколі мотивований висновок про мікробіологічний стан вина. При наявності молочнокислих бактерій проводять дослідження прискореним методом і відзначають в протоколі їх активність за відповідною шкалою. Роблять технологічні висновки про необхідність закінчення яблучно-молочного бродіння або стерилізації.

Контрольні питання

1.Яким методом проводиться дослідження мікробіологічної стійкості виноматеріалів і вин?

2.Які критерії оцінки стійкості вин?

Лабораторна робота 15
МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ВИНОМАТЕРІАЛІВ НА ЗБЕРІГАННІ І ВИТРИМУВАННІ

Мета заняття. Ознайомитися з порядком відбору середньої проби виноматеріалу для проведення аналізу, з методом контролю. Навчитися на підставі мікроскопування і результатів підрахунку мікроорганізмів давати оцінку стану вина і відповідні рекомендації щодо технологічної обробки.

Завдання. Заздалегідь ознайомитися з джерелами літератури. Повторити морфологію винних дріжджів, оцтово - і молочнокислих бактерій.

Устаткування і матеріали. Біологічний мікроскоп, мікробіологічні петлі, лабораторна центрифуга, колби, пробірки, зразки виноматеріалів.

Заходи безпеки. При роботі з центрифугою слід дотримуватися заходів безпеки, викладених в занятті 2.

Порядок виконання лабораторної роботи

Після закінчення бродіння молоді виноматеріали, що знаходяться на осадах дріжджів, самоосвітлюються.

Середня проба виноматеріалу відбирається від однорідної партії за правилами ГОСТ 14137-74 "Вина, коньяки, і коньячні спирти (правила відбору проб)". Якщо проба використовується для посіву, то відбирається вона з дотриманням правил стерильності. З добре перемішаної однорідної партії вина стерильною піпеткою відбирають середню пробу. Якщо вино довго було на відпочинку, то пробу треба брати з товщі, обов'язково з осаду. Для цього користуються стерильними скляними трубками з гумовими шлангами. Якщо трубок мало, то після кожного відбору проби їх слід вимити чистою водою, а потім обполоснути спиртом, після чого вживати не раніше, ніж через 5хв. Для кожної місткості треба брати окрему трубку.

З середньої проби відбирають вино об'ємом 10см^3 і центрифугують протягом 10хв при частоті обертання 25с$^{-1}$ або 5хв при частоті обертання 50с$^{-1}$. З центрифужних пробірок повністю зливають надосадну рідину, осад добре перемішують і мікробіологічною петлею готують препарат для мікроскопування. При центрифугуванні проба концентрується приблизно в двадцять разів.

Оцінка мікробіологічного стану вин на витримуванні проводиться таким чином. Одержаний в результаті центрифугування препарат мікроскопують (об'єктив 40х, окуляр 15х), проглядаючи декілька полів зору, після чого обчислюють середню кількість мікроорганізмів в одному полі зору. Для диференціації живих і мертвих клітин мікроорганізмів рекомендується використовувати люмінесцентний мікроскоп. Таким чином, ступінь освітлення виноматеріалів контролюють методом мікроскопування осаду після центрифугування з визначенням кількості клітин мікроорганізмів в одному полі зору і фізіологічного стану дріжджів (відсоток мертвих клітин у стадії автолізу, наявність сторонніх мікробів).

Контроль виноматеріалів на зберіганні проводять не рідше одного разу на місяць.

Мікробіологічний стан вина перевіряють так як і на всіх стадіях технологічного процесу: при переливанні, обклеюванні, доливанні, фільтрації (методика роботи така сама, як і контролю молодих виноматеріалів).

Допускається наявність 1-2 клітин живих мікроорганізмів в одному полі зору в центрифугованій пробі. За наявності в кожному полі зору великого числа мікроорганізмів вино вважають інфікованим і проводять подальше визначення його мікробіологічного стану стосовно дріжджів, оцтовокислих і молочнокислих бактерій. Мікробіологічний стан вина, інфікованого дріжджами і оцтовокислими бактеріями, визначають за часом їх розвитку в пробі вина.

Досліджувану пробу вина поміщають в стерильну пробірку під ватяною пробкою і установлюють в термостат з температурою 25-27°С. Спостереження за розвитком дріжджів і оцтовокислих бактерій у вині за створених оптимальних умов доступу повітря ведуть протягом шести діб. Оцінку стану виноматеріалів проводять за спеціальною шкалою (табл. 7).

Таблиця 7 – Шкала оцінки мікробіологічного стану вина

Доба	Оцінка мікробіологічного стану вина за наявністю				
	Дріжджів		ОКБ	Суміші дріжджів та ОКБ	МКБ
	винних	плівчастих			
1	Нестійке	Здатні до захворювання, а за наявності характерних змін – хворе цвіллю	Хворе	Хворе	Спостереження за посівами починають через 3 доби
2	Нестійке	Якщо вино каламутне – початкова стадія захворювання; якщо вино прозоре – нестійке	Нестійке	Хворе	Спостереження за посівами починають через 3 доби
3	Нестійке	Нестійке	Нестійке	Нестійке	Для високо-кислотних столових сухих вин процес яблучно-молочного бродіння; для інших – захворювання вина
4	Стійке	Стійке	Нестійке	Нестійке	Нестійке
5	Стійке	Стійке	Нестійке	Нестійке	Нестійке
6	Стійке	Стійке	Стійке	Стійке	Нестійке
7	Стійке	Стійке	Стійке	Стійке	Стійке
15	Стійке	Стійке	Стійке	Стійке	Стійке

Непрямим показником хворого вина є летка кислотність (для оброблених вин більше 1,3 г/дм^3, для необроблених більше 0,85 г/ дм^3) і

сторонні тони при органолептичній оцінці.

Мікробіологічний стан вина, інфікованого молочнокислими бактеріями, визначають за їх кількістю у полі зору мікроскопа і за часом розвитку бактерій в поживному середовищі. При визначенні мікробіологічного стану вина за кількістю молочнокислих бактерій у полі зору мікроскопа підраховують кількість цих бактерій в різних частинах препарату, приготованого після центрифугування зразка. Визначають середній вміст бактерій в одному полі зору (об'єктив 40х, окуляр І5х. Оцінку стану вина проводять за орієнтовними показниками (табл.8). Визначення кількості живих і мертвих молочнокислих бактерій експрес-методом проводять за допомогою люмінісцентної мікроскопії. При виявленні у полі зору люмінісцентного мікроскопа живих клітин молочнокислих бактерій менше половини від загальної кількості мікробіологічний стан вина оцінюється за показниками (табл. 7). Якщо живих клітин бактерій виявлено більше половини, то мікробіологічний стан вина оцінюється за табл.8.

Визначення мікробіологічного стану вина за кількістю молочнокислих бактерій у полі зору мікроскопа є орієнтовним, результати його згодом повинні бути уточнені посівом вина в поживні середовища із спиртом або з сорбіновою кислотою.

При визначенні мікробіологічного стану вина за часом розвитку молочнокислих бактерій в поживних середовищах пробу вина об'ємом 0,5 $см^3$ висівають в одне з поживних середовищ для молочнокислих бактерій із спиртом або в солодове сусло з сорбіновою кислотою. Посіви розміщають в термостаті з температурою 25-27ºС.

Таблиця 8 – Показники інфікованості вин молочнокислими бактеріями за мікроскопічною картиною

Кількість МКБ	Хімічні та органолептичні показники вина	Мікробіологічний стан вина
3 – 5	Без змін	інфіковане
6 – 15	Без змін	Сильно інфіковане
Більше 15	Без змін	На початку захворювання в висококислих столових сухих винах – процес біологічного кислотопониження
Більше 15	Летка кислотність більше 0,5 $г/дм^3$, сторонні тони та присмаки	Хворе

Спостереження за розвитком молочнокислих бактерій починають через три доби після висіву і ведуть не менше семи діб при висіві в солодове сусло з сорбіновою кислотою і не менше 15 діб при висіві в поживні середовища із

спиртом. Оцінку ведуть за шкалами оцінки мікробіологічного стану вина.

Технологічні рекомендації. Для вин, оцінених за шкалою як "нестійке", призначають сульфітацію до вмісту $S0_2$ вільного 20-25 мг/дм^3, не перевищуючи кількостей, дозволених ДСТ 7208-70 "Вина виноградні. Технічні вимоги". За винами ведуть постійний мікробіологічний контроль.

Для вин, оцінених за шкалою як "хворі", призначають комплекс технологічних обробок: сульфітацію до вмісту вільного $S0_2$ 20 мг/дм^3, пастеризацію при 70-75ºС протягом 10-15хв, оклеювання і фільтрацію. Подальше зберігання хворих оброблених вин не рекомендується.

Виноматеріали з високою титрованою кислотністю і наявністю бактерій типу молочнокислих кислотопонижувачів перевіряють методом хроматографії на наявність яблучної кислоти. При виявленні яблучної кислоти вирішується питання про залишення виноматеріалів для окремих типів вин до закінчення яблучно-молочного бродіння або про запобігання цьому процесу стерилізацією.

Обробка результатів експерименту і оформлення звіту

У протоколі слід зазначити результати мікроскопування виноматеріалів, підрахунку мікроорганізмів. Якщо виявлено істотну кількість мікроорганізмів, відзначають наявність дріжджів, оцтово - і молочнокислих бактерій. Роблять висновок про необхідність проведення дослідження мікробіологічного стану вина і практично здійснюють відповідне визначення. Проводять оцінку стану виноматеріалу за наведеною шкалою. Роблять відповідні технологічні рекомендації.

Контрольні питання

1.Яким методом проводиться контроль виноматеріалів на витримуванні і зберіганні?

2.Які критерії оцінки мікробіологічного стану виноматеріалів?

Лабораторна робота 16
СУЧАСНІ МЕТОДИ МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ СИРОВИНИ ТА ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Головні питання, на які потрібно відповісти при проведенні мікробіологічного контролю, можуть бути сформульовані таким чином:

1. Чи є в досліджуваному зразку живі мікроорганізми (скринінговий аналіз)?

2. Якщо встановлена наявність живих мікроорганізмів в об’єкті, то яка їх кількість та які саме ці мікроорганізми (підтверджуючі ідентифікаційні аналізи) є в ньому?

В наш час, коли гостро стоїть питання забезпечення стійкої якості та безпечності харчових продуктів, використання харчовими підприємствами традиційних методів мікробіологічного контролю стає недостатньо ефективним. Традиційні класичні методи мікробіологічного контролю, як правило, трудомісткі, тривалі і не універсальні. Вони можуть бути реалізовані тільки при наявності на підприємстві якісної лабораторної бази та професійних

кадрів. Для швидкого одержання вірогідних результатів постійно йде удосконалення поживних середовищ, приладів, методів аналізу.

Методи мікробіологічної оцінки чистоти та безпеки харчових продуктів розподіляються на *якісні* та *кількісні*.

В наш час нормування мікробіологічних показників безпеки харчових продуктів проводять за альтернативним принципом двокласної системи.

По-перше, безпечність та якість харчових продуктів за мікробіологічними показниками оцінюють за відсутністю в певних об'ємах продукту санітарно-показових мікроорганізмів: бактерій групи кишкових паличок, потенційно патогенних (*E. coli*, коагулазопозитивних стафілококів, сульфітредукуючих клостридій, бактерій роду *Proteus, Bacillus cereus*) та патогенних мікроорганізмів, тобто нормується маса продукту, в якій не допускається присутність санітарно-показових, умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів. Наприклад, в багатьох харчових продуктах широкого вжитку сальмонели не повинні виявлятися в 25г, в продуктах дитячого харчування – в 50г. Такі аналізи є *якісними*.

По-друге, для мікроорганізмів псування, заквасочної та пробіотичної мікрофлори норматив регулює допустиму кількість колонієутворюючих одиниць в 1г ($см^3$) продукту. Наприклад, в 1г м'якого морозива кількість МАФАнМ не має перебільшувати $1 \cdot 10^5$ КУО, ліверної ковбаси – $2 \cdot 10^3$ КУО. Такі аналізи відносяться до *кількісних*.

Сучасні нові кількісні методи визначення чисельності мікроорганізмів в харчових продуктах основані на реєстрації біолюмінісценції, біоелектричних явищ або на мікроскопуванні.

Для визначення чисельності мікроорганізмів шляхом вимірювання їх біолюмінесценції існують спеціальні мікроскопи, в яких ініціюється власна люмінесценція мікроорганізмів за допомогою УФ- та короткохвильових променів видимої частини спектру. Підсилити люмінесценцію бактерій можна обробкою спеціальними барвниками.

Люмінесценція біологічних об'єктів найчастіше буває спричинена наявністю АТФ. Методи, засновані на ***АТФ-біолюмінесценції***, дозволяють розділяти живи клітини від мертвих, полегшують і прискорюють прижиттєвий кількісний облік мікрофлори.

Але АТФ – це основне джерело енергії для біохімічних реакцій у всіх живих клітинах, і тому в кожному харчовому продукті він міститься у великій кількості. Це є недоліком кількісного обліку бактерій в продуктах, тому що потребує відділення мікробного АТФ від "фонового."

Поряд з цим принцип реєстрації люмінесценції АТФ і його похідних використовується для визначення рівня контамінації технологічного обладнання та робочих поверхонь на харчових виробництвах. Візуальний контроль тут недостатній, а мікробіологічний потребує багато часу. Чистоту поверхонь легко перевірити за допомогою нескладних портативних приладів, які реєструють біолюмінесценцію як мікроорганізмів, так і часток продуктів на устаткуванні. Це дає змогу вжити негайних заходів (якщо треба) ще до запуску технологічної лінії і попередити появу браку.

Як ще один приклад експрес-методів з використанням біолюмінесценції можна назвати люмінесцентно-серологічну ідентифікацію бактерій роду *Listeria* за допомогою полівірулентної лістеріозної аглютинуючої сироватки з антитілами. Визначення роду *Listeria* – збудника гострого інфекційного захворювання, яке передається м'ясом, яйцями птахів, – проводять в спеціальних препаратах на люмінісцентному мікроскопі.

Новим напрямом в цій галузі є виявлення санітарно-показових мікроорганізмів, яке базується на ***наявності*** в них ***специфічних ферментів***. Наприклад, облік ентеробактерій можна вести завдяки наявності у них ферментів β-Д-глюкуронідази та β-Д-галактозидази, які розщеплюють певні субстрати, а продукти гідролізу останніх забарвлюють *E. coli* в один колір, коліформні бактерії – в другий, інші грамнегативні бактерії – в третій або не забарвлюють зовсім. Таким чином, на одній чашці Петрі через 18-24 години можна підрахувати окремо різних представників групи *Enterobacteriaceae*.

Вдосконаленням цього методу є контроль таких посівів в УФ-променях (366 нм). Оригінальність методу полягає в тому, що за винятком декількох штамів *Salmonella* та *Shigella* кишкова паличка є єдиним видом сімейства *Enterobacteriaceae*, який має фермент β-Д-глюкуронідазу. Цей фермент гідролізує субстрат МУГ (4-**м**етил-**у**мбеліферіл-β-Д-**г**люкуронід) з утворенням 4-метил-умбеліферона, який має при λ=366 нм яскраву блакитну флуоресценцію. Присутність у посіві колоній з такою флуоресценцією – вагомий доказ наявності *E. coli.*

Субстрат МУГ можна додавати до різних стандартних поживних середовищ. Цей принцип положено в основу створення поживних середовищ багатьма фірмами зарубіжжя, наприклад, існує низка середовищ Fluorocult (фірма Merck, Німеччина), впроваджено Violet Red Bile Agar w/MUG (фірма Difco), тестові набори Colilert R-18, Quanti-Disk та Simplate (США) та ін.

В Україні з таких продуктів Міністерством охорони здоров'я рекомендовано системи Colilert R-18, Quanti-Disk та Simplate. Вони призначені для застосування в установах державної санітарно-епідемічної служби та в організаціях, які здійснюють виробничій контроль питної води. Ці методи дозволяють виявити присутність загальних БГКП по реакції β-Д-галактозидази, яку вони мають з патентованим субстратом ONPG. Наявність цих бактерій підтверджується пожовтінням культурального середовища. А присутність типової *E. coli* підтверджується яскраво-блакитною флуоресценцією культурального середовища завдяки утворенню метил-умбеліферона, який вивільняється при взаємодії індикатора Colilert R-18 MUG з ферментом β-Д-глюкуронідазою, який, як вже говорилося, має лише кишкова паличка.

Ці методи мають велику перевагу перед класичними тим, що стандартизують процеси санітарно-бактеріологічного аналізу води, прискорюють одержання чітких і точних результатів, знижують собівартість аналізів.

Настанови щодо використання таких наборів містяться в методичних рекомендаціях: МР 10.10.2.1 – 137-2007. Застосування тестових наборів Colilert R-18 для санітарно-бактеріологічного контролю якості води, затвердженого

наказом МОЗ від 24.01.2007 № 24; МР 10.10.21 – 155-2008. Визначення найбільш вірогідного числа мікроорганізмів у воді з використанням тестів діагностичних Quanti-Disk та Simplate, затверджено наказом МОЗ від 14.03.2008 № 138.

Методи, які основані на вимірюванні змін сили струму при розмноженні мікроорганізмів, використовують для санітарно-бактеріологічного дослідження будь-яких об'єктів навколишнього середовища.

При цьому враховується той факт, що мікроорганізми в процесі метаболізму в будь-якому середовищі змінюють його електропровідність. Середовища, які використовують, називають ***імпедансними***. Вони можуть бути і загального вжитку, і селективними, тобто використовуються для всіх мікроорганізмів або тільки для конкретних родів бактерій, дріжджів, плісеневих грибів і т.д.

На цьому методі основана робота мікробіологічного аналізатора «БакТрак 4300», який використовують для прискореного якісного та кількісного визначення мікроорганізмів у відповідності до вимог чинної нормативно-технічної документації.

Імпеданс – це опір потоку змінного струму через матеріал. Зміни імпеданса звичайно відбуваються в поживному середовищі під час росту та метаболічної активності мікроорганізмів. Експоненційні зміни імпедансного сигналу можуть спостерігатися, коли кількість мікроорганізмів досягає порогу біля 10^6–10^7 клітин/см^3. Час, необхідний для досягнення значущої зміни імпеданса, називається часом визначення імпеданса. Значення цього показника зворотно пропорційне концентрації мікроорганізмів в матеріалі, який досліджується: чим вищий ступінь забруднення зразка мікроорганізмами, тим менший проміжок часу зміни імпедансу. Хід кривої імпедансного сигналу відображає динаміку росту мікроорганізмів у зразку (рис. 17).

Незважаючи на те, що імпедансний аналіз оснований на процесі росту культур мікроорганізмів, він суттєво відрізняється від стандартних методів визначення чисельності мікроорганізмів методом посіву в чашки. Оскільки в стандартному методі немає можливості об'єктивно оцінити, скільки окремих клітин мікроорганізмів утворило колонію на поверхні середовища, результат завжди виражають в колонієутворюючих одиницях (КУО). Таким чином, результат чашкового методу являє собою деяку стандартизовану величину, яка характеризує ступінь мікробного забруднення зразка, а не абсолютне число здатних до розмноження мікроорганізмів. Суттєвими особливостями класичного методу є необхідність проведення серійних десятикратних розведень мікроорганізмів, які присутні в матеріалі, що досліджується, до ступеня, при якому вони можуть бути вірогідно підраховані з використанням агаризованих поживних середовищ. Тривалість класичного методу з періодом інкубації до візуалізації колоній – 24–72 години.

Імпедансний аналіз є динамічним процесом і відображає метаболічну активність мікроорганізмів в часі. Тому немає значення, чи присутні мікроорганізми у вигляді окремих клітин, чи цілими групами, оскільки їх сумарна метаболічна активність складається із активності окремих клітин, які

змінюють іонний склад поживних середовищ. Це дає можливість визначати рівень мікробного забруднення зразка без проведення серійних десятикратних розведень, що значно скорочує час пробопідготовки.

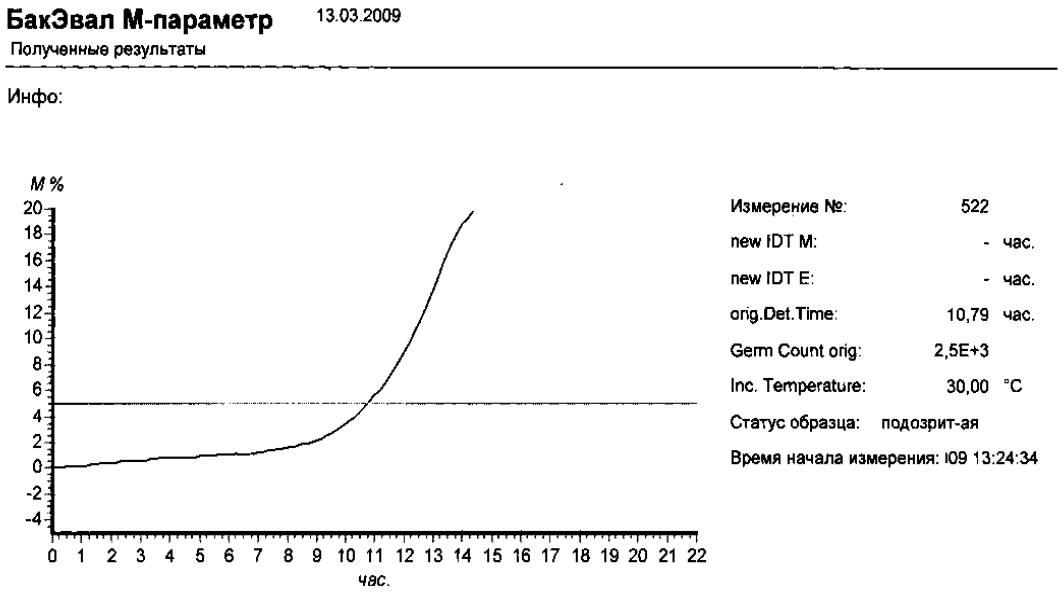


Рис. 17. Динаміка росту мікроорганізмів в процесі дослідження

Таким чином, даний метод не тільки дає можливість визначати кількість мікроорганізмів в зразку, а дозволяє також визначати рівень їх активності, який в решті решт є вирішальним в процесі псування сировини і готової продукції.

Загальний час дослідження зразка при імпедансному методі не перевищує 24 години. У більшості ж випадків результати бувають уже через кілька годин. Чим більше у зразку мікроорганізмів, тим швидше буде отримано результат дослідження.

Процес дослідження автоматизований, зменшено витрати робочого часу та матеріалів, одночасно можна аналізувати 64 зразки, документування проводиться в автоматичному режимі, але аналізатор потребує попередньої калі бровки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Капрельянц Л.В., Пилипенко Л.М.,Єгорова А.В. та ін. Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник.-Херсон:ФОП Грінь Д.С., 2016. – 478 с.
2. Бурьян Н.И. Микробиология виноделия. – Ялта: Институт винограда и вина, 2002. – 431 с.
3. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия. – Симферополь: «Таврида», 2003. – 560 с.
4. Санитарная обработка технологического оборудования, винопроводов, инвентаря и помещений в винодельческой промышленности / О.Г. Бобров, В.А. Виноградов, С.А. Кишковская, В.А. Загоруйко. – Ялта: Институт винограда и вина, 2004. – 38 с.
5. Справочник по виноделию. Изд. 2-е, перераб. и доп. Под ред. Г.Г. Валуйко, В.Т. Косюры. – Симферополь: «Таврида», 2000. – 624 с.

ЗМІСТ

Положення про відпрацювання лабораторних робіт	3
Основи мікробіологічного контролю у харчовому виробництві	6
Джерела сторонніх мікроорганізмів в харчовій промисловості. Мікробіологічні та санітарно-гігієнічні критерії безпеки харчових продуктів	7
Особливості загальної мікробіологічної оцінки харчових продуктів	11
Коротка історична довідка про етапи розвитку мікробіології бродильних виробництв	15
Морфологічні, культуральні ознаки та фізіологічні властивості винних дріжджів	16
Чисті культури дріжджів в бродильних виробництвах	28
Взаємовідношення дріжджів у бродильних виробництвах	30
Морфологічні та фізіологічні властивості плісеневих грибів-шкідників виноградників і виноробства	33
Морфологічні, культуральні ознаки та фізіологічні властивості оцтовокислих бактерій	37
Морфологічні, культуральні ознаки та фізіологічні властивості молочнокислих бактерій	42
Джерела інфікування. Хвороби вин та пива	47
Методи пригнічення розвитку мікроорганізмів	56
Лабораторна робота № 1. Завдання мікробіологічного контролю	59
Лабораторна робота № 2. Поживні середовища та їх використання	60
Лабораторна робота № 3. Визначення фізіологічного стану дріжджів	62
Лабораторна робота № 4. Мікробіологічний контроль винограду та іншої плодово-ягідної сировини	64
Лабораторна робота № 5-6. Виділення чистої культури дріжджів	66
Лабораторна робота № 7. Мікробіологічний контроль обладнання і ємностей	68
Лабораторна робота № 8-9. Мікробіологічний контроль допоміжних матеріалів	69
Лабораторна робота № 10. Мікробіологічний контроль сусла і мезги	71
Лабораторна робота № 11. Мікробіологічний контроль повітря цехів виноробних підприємств	73
Лабораторна робота № 12. Приготування і контроль виробничої розведення дріжджів	74
Лабораторна робота № 13. Мікробіологічний контроль за процесом бродіння	77
Лабораторна робота № 14. Дослідження мікробіологічної стійкості виноматеріалів і вин	78
Лабораторна робота № 15. Мікробіологічний контроль виноматеріалів на зберіганні і витримуванні	82
Лабораторна робота № 16. Сучасні методи мікробіологічних досліджень сировини та харчових продуктів	85
Список літератури	89

ЗМІСТ