

✓

АКАДЕМИЯ НАУК УССР

ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ
им. акад. Д. К. ЗАБОЛОТНОГО

21095

И. П. ИВАНОВА

ПЛЕНЧАТЫЕ ДРОЖЖИ В ВИНОДЕЛИИ МОЛДАВИИ И БОРЬБА С НИМИ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель —
кандидат биологических наук
Г. Ф. КОНДО

ИЗДАТЕЛЬСТВО ЦК КП МОЛДАВИИ
КИШИНЕВ 1967

Виндусис.

АКАДЕМИЯ НАУК УССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ
им. акад. Д. К. ЗАБОЛОТНОГО

И. П. ИВАНОВА

ПЛЕНЧАТЫЕ ДРОЖЖИ В ВИНОДЕЛИИ МОЛДАВИИ И БОРЬБА С НИМИ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель —
кандидат биологических наук
Г. Ф. КОНДО

Центральная научная библиотека
Полтавской обл. Мемориал С.М.Косов.
Библиотека им. К. А. Тимирязева
№21095

ИЗДАТЕЛЬСТВО ЦК КП МОЛДАВИИ
КИШИНЕВ 1967

Работа выполнена в отделе виноделия Молдавского научно-исследовательского института садоводства, виноградарства и виноделия. Идентификация культур проведена в отделе типовых культур Института микробиологии АН СССР.

Диссертация изложена на 182 стр. машинописи и состоит из 8 глав. Иллюстрирована 24 таблицами, 25 рисунками и 1 приложением.

В библиографическом указателе приведено 220 литературных источников, из них отечественных 125 и иностранных 95.

Автореферат разослан _____

Защита состоится _____

Ваши отзывы на реферат просим направлять по адресу: Киев, 127, ул. Окружная, 59, Институт микробиологии и вирусологии им. акад. Д. К. Заболотного АН УССР.

38715

ВВЕДЕНИЕ

Директивами XXIII съезда КПСС по пятилетнему плану развития народного хозяйства СССР на 1966—1970 годы предусматривается дальнейшее значительное увеличение производства продовольственных товаров, в том числе продукции виноградарства и виноделия.

Молдавская республика занимает ведущее место в стране по производству вин. На ее территории находится четвертая часть всех виноградных насаждений Советского Союза. К концу предстоящего пятилетия площадь виноградников в республике увеличится на 80 тыс. га, что позволит в 1970 г. собрать более миллиона тонн винограда. Соответственно намного возрастет выработка виноматериалов.

В Молдавии, благодаря разнообразию почвенно-климатических условий, выпускаются вина почти всех типов. Однако, основным направлением виноделия республики является производство столовых вин. Эти вина весьма часто подвергаются бутылочным помутнениям, причиной которых являются, главным образом, пленчатые дрожжи. Развиваясь в бутылочных винах, без свободного доступа воздуха, эти дрожжи не вызывают значительных химических изменений в составе вина, изменяя лишь его внешний вид. Это приводит к снижению качества вина, дополнительной обработке его с затратой труда и материалов (И. Циммерман — 1938, Н. Ф. Саенко с соавт. — 1939, 1944, 1956, 1957, 1959, Л. Н. Нечаев — 1939, 1950, Е. Минарик — 1960, 1963 и др.).

Попадая в столовые вина, пленчатые дрожжи при доступе воздуха или при достаточном количестве растворенного кислорода, очень быстро размножаются, образуя пленку на поверхности вина, так называемую «цвель». Это заболевание

ведет к существенным изменениям в химическом составе вина (Мульдер, 1853, Л. Пастер, 1866, Р. Кох, 1899, Г. Шандерль, 1936, Е. Пейно, 1957, И. Ван-Циль, 1958, М. Кикнавелдзе, 1961 и др.).

В литературе довольно широко освещены вопросы изменения содержания этилового спирта и органических кислот под влиянием жизнедеятельности пленчатых дрожжей в вине. Однако такие важные для вкуса и внешнего вида вина компоненты, как эфиры, высшие спирты, летучие кислоты, дубильные и красящие вещества, почти не изучались.

Пленчатые дрожжи широко распространены в природе. Исследователи, изучавшие эпифитную микрофлору, а также дрожжевую микрофлору соков и вин, встречали и описывали пленчатые дрожжи (Л. Пастер, 1876, Ганзен, 1881, В. И. Кудрявцев, 1935, 1954, А. М. Шумаков, 1948, 1953, Е. И. Квасников с соавторами, 1948, 1950, 1953, Н. К. Могиланский, 1956, Г. И. Моснашвили, 1956, Н. И. Сербинова, 1958, Л. В. Тюрина, 1957, 1959, Н. М. Трофименко, 1959, Ж. Риберо-Гайон, 1958, 1960, Э. Минарик, 1960, 1961, 1963, П. Н. Унгурян, 1960, А. В. Шахсуварян, 1960, В. Журавлева, 1960, М. Мавланн, 1961 и др.). Микрофлора вин разных географических районов (по данным ряда авторов) существенно отличается по видовому составу. Так, например, в условиях Средней Азии заболевания вин «цвелью» очень редки. Это объясняется низким содержанием пленчатых дрожжей на виноградинке, вследствие засушливого климата. В Молдавии же «цвель вина» является весьма распространенным заболеванием, что и побудило нас провести изучение пленчатых дрожжей Молдавской республики. Подобные исследования в Молдавии ранее не проводились.

Задачей наших исследований явилось изучение морфологических, культуральных, физиологических и биохимических свойств свежевыделенных штаммов пленчатых дрожжей, распространенных на ягодах различных сортов винограда, оборадованных винодельческих заводов и в столовых винах. Одновременно изучалось влияние представителей различных видов пленчатых дрожжей на изменение химического состава вин, а также спиртоустойчивость, кислотоустойчивость и сульфитоустойчивость этих дрожжей. Испытывались антисептические свойства новых консервантов (пирэф и сорбиновая кислота), устанавливались наиболее эффективные дозировки их в борьбе с пленчатыми дрожжами в виноделии.

Решение поставленных задач позволит предохранить сухие вина от заболеваний, связанных с развитием этой группы дрожжей, а, следовательно, сохранить высокое качество получаемых в Молдавии столовых вин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Территория Молдавской республики, несмотря на сравнительно небольшие размеры, характеризуется чрезвычайно разнообразными природными условиями. Учитывая это и стремясь возможно полнее охарактеризовать состав плесневых дрожжей Молдавии, мы проводили сбор образцов в трех основных природных зонах республики: северной (колхоз им. Ленина Тырновского района), центральной (Молдавский научно-исследовательский институт садоводства, виноградарства и виноделия и экспериментальная база Молдавской Академии наук) и южной (совхоз «Чумай» Кагульского района).

Отбор проб проводился по следующей методике. Ягоды винограда отбирались в стерильный мешочек, раздавливались и сок, с соблюдением всех правил асептики, собирался в стерильную колбочку. Находящиеся на ягоде дрожжи попадали в сок и через некоторый промежуток времени проявляли себя брожением или образованием пленки. В некоторых случаях рост пленки начинался только после прекращения брожения сока. Из появившихся пленок изолировались отдельные штаммы посевом в чашки Петри на агаризированный виноградный сок.

Для выяснения видового состава плесневых дрожжей, инфицирующих винодельческие производства, отбирались пробы с оборудований, коммуникаций и тары. Пробы (смывы и «соскребы») помещались в жидкое сусло, из которого описанным уже методом велась изоляция отдельных штаммов изучаемой группы дрожжей.

Для установления видового состава дрожжей в винах Молдавии отбирались пробы из здоровых, помутневших и больных вин, приготовленных в различных районах нашей республики. Отобранное стерильной пипеткой вино высевалось в пробирку с виноградным соком и, после появления пленок, из него изолировались чистые культуры плесневых дрожжей тем же методом.

Идентификация выделенных чистых культур плесневых дрожжей проводилась по методике В. П. Кудрявцева (1954), а неспорообразующих — по Лоддер и Крегер-ван Рий (1952).

Болезнь «цвель вина» изучалась путем искусственного заражения сухих белых и красных вин чистыми культурами дрожжей трех видов, выделенных нами с поверхности ягод винограда и вин (*Hansenula anomala*, шт. 166₁, *Pichia alcoholophila*, шт. 25; *Candida mycoderma*, шт. 3₁), а также спонтанными плесневыми дрожжами, состоявшими из ассоциации 2 видов: *Candida mycoderma* и *Pichia alcoholophila**). Влияние спирта, кислотности, сернистого ангидрида, а также новых консервантов — нирэфа и сорбиновой кислоты на плесневые дрожжи в вине изучалось на тех же штаммах.

Опыты по выявлению химических изменений, происходящих в вине в результате заболевания его «цвелью», проводились на сухом белом стерильном вине в неполных колбах для лучшей аэрации дрожжей. Красное вино, используемое в опытах, подвергалось холодной стерилизации (пропускалось через стерилизующие пластины) с целью сохранения красящих веществ. Спонтанные дрожжи изучались на вине, пропущенном через фильтры-пластины, в стеклянных 10-литровых баллонах, то есть в условиях, приближающихся к производственным. Колбы и баллоны были закрыты ватными пробками и находились в оптимальных для развития плесневых дрожжей температурных условиях 25—27°C. Химические изменения изучались спустя 2, 4, 6 и 8 месяцев с начала опыта, в динамике или однократно — после окончания опыта, в зависимости от поставленной цели.

Вино анализировалось с помощью следующих методов исследования. Титруемая кислотность, летучие кислоты, экстракт, средние эфиры, сумма дубильных и красящих веществ и сернистая кислота (общая и свободная) определялись методами, описанными А. М. Фроловым-Багреевым и Г. Г. Агабальянцем в книге «Химия вина» (1951). Спирт определялся в отгоне из вина стеклянным спиртометром класса 0,1 (Гос. стандарт 5665—58, Москва, 1959). Глицерин — йодпокислотным методом, предложенным А. П. Смирновой и Н. А. Эскиной (1962). Альдегиды определялись в отгоне йоднометрическим методом, модифицированным Н. Ф. Сасенко.

*) Спонтанные плесневые дрожжи были взяты на производстве из вин, больных «цвелью».

Эпидии — на фотоэлектроколориметре по методике Дурминидзе (1952) в модификации В. Н. Никандровой. Количество углекислого газа измеряли прибором карбометром (экспресс-анализатор на CO_2), pH — потенциометром ЛП-5. Растворенный в вине кислород — на полярографе ЛР-60 ЧССР (Б. В. Липис, 1959). Органические кислоты (вишняя, лимонная, яблочная, молочная и янтарная) определяли качественно методом круговой хроматографии на бумаге, описанным чехословацкими исследователями Хейсом и Мачеком (1959).

На газовом хроматографе УХ-1 определялись эфиры, высшие спирты и летучие кислоты. Анализ протекал при следующих условиях: газ — носителем был гелий со скоростью движения 80 мл/сек при давлении газа на входе в колонку 1,1 атм. и на выходе из нее 0,3 атм. Носителем жидкой фазы или твердым носителем служил порошок огнеупорного диатомитового кирпича с величиной зерен 0,25—0,5 мм. В качестве неподвижной фазы использовался триэтаноламин. Температура разделения высших спиртов и эфиров — 85°C. Летучие кислоты разделялись при 150°C.

Хроматографированию предшествовала подготовка образца, которая сводилась к концентрированию его для повышения чувствительности анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛЕНЧАТЫХ ДРОЖЖЕЙ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ВИНОГРАДНИКАХ И В ВИНАХ

Для характеристики пленчатых дрожжей, находящихся на виноградиках, мы отбирали листья, зеленые грозди и спелые ягоды на виноградных кустах в период их вегетации с июня по октябрь. В литературе имеются данные об увеличении количества винных дрожжей на ягодах винограда к моменту его созревания и сбора. Мы наблюдали эту закономерность и у пленчатых дрожжей. На виноградином кусте в период его вегетации представлены следующие 4 вида: *Candida krusei* (Cast.) Berkhout, 1923, *Hansenula anomala* (Hansen) Sydow, 1919, *Pichia alcoholophila* Klöcker, 1912, *Pichia membranaefaciens* Hansen, 1904 (табл. 1).

Таблица 1

Видовой состав пленчатых дрожжей на листьях и ягодах
виноградного куста в период его вегетации

Месяц	В и д	Количество штаммов
Июнь	<i>Pichia alcoholophila</i>	1
	<i>Pichia</i> sp.	1
Июль	<i>Pichia membranaefaciens</i>	1
	<i>Pichia</i> sp.	5
	<i>Candida krusei</i>	2
Сентябрь	<i>Hansenula anomala</i>	14
	<i>Candida krusei</i>	35
	<i>Pichia membranaefaciens</i>	1
	<i>Pichia</i> sp.	1
Октябрь	<i>Hansenula anomala</i>	2
	<i>Candida krusei</i>	6
	<i>Pichia alcoholophila</i>	1
	<i>Pichia</i> sp.	1

В целях установления видового состава пленчатых дрожжей, встречающихся в винах Молдавии, нами были исследованы 128 образцов столовых вин. Из них было изолировано 89 штаммов, которые отнесены нами к *Candida mycoderma* (Reess), 1870, *Pichia alcoholophila* Klöcker, 1912, *Pichia membranaefaciens* Hansen, 1904.

К этим же видам отнесены пленчатые дрожжи, изолированные из проб, отобранных с предметов оборудования винзаводов, тары и коммуникаций (табл. 2).

Таблица 2

Видовой состав пленчатых дрожжей на различных объектах виноделия

Место выделения культуры	В и д	Количество штаммов
Ягоды и листья винограда	<i>Candida krusei</i>	43
	<i>Hansenula anomala</i>	16
	<i>Pichia alcoholophila</i>	2
	<i>Pichia membranaefaciens</i>	2
	<i>Pichia</i> sp.	2
Вино	<i>Candida mycoderma</i>	41
	<i>Pichia alcoholophila</i>	8
	<i>Pichia membranaefaciens</i>	2
	<i>Pichia</i> sp.	38
Предметы оборудования и тара	<i>Candida mycoderma</i>	6
	<i>Pichia</i> sp.	10

Данные таблицы 2 показывают, что только дрожжи рода *Pichia* распространены на всех изучавшихся объектах. На ягодах и листьях винограда преимущество составляют аспорогенные дрожжи *Candida krusei* и спорообразующие — *Hansenula anomala*, которые обладают способностью усваивать углеводы не только путем окисления, но и брожения. Предметы винодельческого оборудования и вина инфицированы, в основном, аспорогенными дрожжами *Candida mycoderma* и спорообразующими — рода *Pichia*, которые обладают строгим окислительным метаболизмом. Пленчатые дрожжи попадают в вина двумя путями. Они могут остаться в вине после выбраживания, как часть эпифитной микрофлоры винограда, а также в результате контакта с инфицированным оборудованием и тарой на производстве. Однако, учитывая видовой состав пленчатых дрожжей, распространенных в винах, можно предположить, что главная роль в его составе принадлежит дрожжам, инфицирующим винодельческие предприятия.

Изучение физиологических свойств пленчатых дрожжей показало, что виды внутри одного рода (и штаммы внутри одного вида) отличаются между собой не только по усвоению тех источников углерода, которые применялись для таксономического разделения дрожжей (по Лоддер и Крегер-ван Рий, 1952 и по В. И. Кудрявцеву, 1954), но также и других

углеродосодержащих веществ, использованных дополнительно.

Так, наибольшее количество штаммов, изолированных с виноградного куста, отнесено нами к *Candida krusei*. Согласно систематике Лоддер и Крегер-ван Рий (1952), все эти штаммы идентичны (по наличию брожения и окисления глюкозы и по отсутствию брожения и окисления галактозы, сахарозы, мальтозы и лактозы). Однако, изучение ассимиляции 33 источников углерода позволило выявить некоторые различия в окислении отдельных сахаров (l-сорбозы, целлабиозы, l- и d-арабинозы, d-ксилозы) и органических кислот (яблочной, винной, лимонной и щавелевой). Определились группы штаммов с различной способностью к ассимиляции d-ксилозы, щавелевой кислоты. Отдельные штаммы по-разному усваивают винную, лимонную и яблочную кислоты, l- и d-формы арабинозы и др.

Большая группа штаммов, изолированных из столовых вин, отнесена нами к *Candida muscatellae*. Все эти штаммы по систематике Лоддер и Крегер-ван Рий (1952) идентичны. Однако изучение большого числа источников углерода выявило некоторые особенности. Все штаммы составили две группы по усвоению целлабиозы и d-ксилозы. Что касается остальных изучаемых углеводов (l-сорбоза, трегалоза, d-раффиноза, декстрин, крахмал, инулин, l- и d-арабиноза, d-рибоза и целлюлоза), они, как правило, дрожжами этого вида не усваиваются, за исключением отдельных штаммов.

Результаты, полученные при установлении способности дрожжей *Hansenula anomala* усваивать исследуемые источники углерода, соответствуют литературным данным (В. И. Кудрявцев, 1954).

Необходимо подчеркнуть, что все исследуемые штаммы усваивают путем окисления трегалозу, целлабиозу, как правило, крахмал, d-рибозу и фумаровую кислоту. Не усваивают: l-сорбозу, l-рамнозу, целлюлозу и щавелевую кислоту.

Физиологические признаки дрожжей рода *Pichia* также соответствуют литературным данным (В. И. Кудрявцев, 1954). Однако имеются некоторые расхождения в усвоении органических кислот. Дрожжи *Pichia membranaefaciens*, в противоположность типичным культурам, не ассимилируют лимонной кислоты, а *Pichia alcoholophila* — винной. Дрожжи обоих видов усваивают фумаровую и не усваивают — щавелевой кислоты. Остальные источники углерода (l-сорбоза, трегалоза, крахмал, d-рибоза, l-рамноза, целлюлоза), а

также нитратная форма азота, за исключением целлабозы и $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, не усваиваются дрожжами рода *Pichia*.

Нам удалось установить коррелятивную связь между ассимиляцией спиртов (глицерина, маннита, сорбита) и молочной кислоты у дрожжей рода *Pichia* и *Candida mycoderma*, изолированных из столовых вин. При ассимиляции дрожжами глицерина и молочной кислоты, не усваиваются маннит и сорбит. При отсутствии ассимиляции глицерина, не усваивается и молочная кислота, в противоположность манниту и сорбиту (табл. 3).

Таблица 3

Коррелятивная связь в ассимиляции спиртов и молочной кислоты у дрожжей, изолированных из столовых вин

В и д	Количество штаммов	Ассимиляция			
		глицерин	маннит	сорбит	молочная кислота
<i>Pichia membranaefaciens</i>	2	+	—	—	+
<i>Pichia alcoholophila</i>	7	+	—	—	+
	1	—	+	+	—
<i>Pichia</i> sp.	6	+	—	—	+
	2	—	+	+	—
<i>Candida mycoderma</i>	16	+	—	—	+
	12	—	+	+	—

Примечание: + ассимилирует
— не ассимилирует

Таким образом, штаммы рода *Pichia* и *Candida mycoderma*, изолированные из столовых вин, можно разделить на две группы: ассимилирующие глицерин и молочную кислоту, без усвоения маннита и сорбита и не усваивающие глицерин и молочную кислоту с ассимиляцией маннита и сорбита.

Штаммы рода *Pichia*, изолированные с листьев и ягод винограда, составляют одну группу, т. к. все усваивают глицерин и молочную кислоту, без ассимиляции маннита и сорбита.

БОЛЕЗНЬ «ЦВЕЛЬ ВИНА»

Заболевание столовых вин «цвелью» начинается с появления на их поверхности пленки, которая весьма часто состоит из ассоциации двух видов или родов пленчатых дрожжей (табл. 4).

Таблица 4

Видовой состав пленок больных «цвелью» вин

В и н о	Вид дрожжей	Штамм
Гибрид красный	<i>Pichia membranaefaciens</i>	5 ₁
	<i>Pichia alcoholophila</i>	5 ₂
	<i>Pichia alcoholophila</i>	5 ₃
	<i>Pichia alcoholophila</i>	5 ₄
Гибрид красный	<i>Pichia alcoholophila</i>	9 ₁
	<i>Candida mycoderma</i>	9 ₂
	<i>Candida mycoderma</i>	9 ₃
Ркацители	<i>Pichia alcoholophila</i>	29 ₁
	<i>Pichia alcoholophila</i>	29 ₂
	<i>Candida mycoderma</i>	29 ₃
	<i>Candida mycoderma</i>	29 ₄
Алиготе	<i>Pichia alcoholophila</i>	32 ₁
	<i>Candida mycoderma</i>	32 ₂

Морфологические различия пленок можно заметить только в начале их развития. В дальнейшем пленка настолько утолщается, что превращается в рыхлую массу.

В результате длительного нахождения вина под пленкой происходят существенные изменения его химического состава (табл. 5).

Таблица 5

Химические изменения столового белого вина в результате
заболевания его «цвелю»

Проводимые исследования вина	Состав вина			
	до опыта	ч е р е з		
		2 месяца	4 месяца	6 месяцев
Титруемые кислоты, г/л	3,90	3,56	5,62	4,00
Летучие кислоты, г/л	0,39	1,18	3,63	1,82
Спирт, об. %	9,42	7,52	3,53	0
Глицирр., г/л	0,682	0,653	0,576	0,561
Эфир., г/л	0,158	0,176	0,278	0,360
pH	3,42	3,17	—	3,05
Альдегиды, мг/л	4,4	123,2	66,0	57,2
Кислород, мг/л	1,18	0	0	—
Сернистая кислота общая, мг/л	64,00	56,32	46,08	46,08
Сернистая кислота свободная, мг/л	12,80	5,12	5,12	5,12
Органические кислоты (хроматографически)				
Винная	+	+	+	+
Лимонная	+	+	÷	±
Яблочная	+	—	—	—
Молочная	±	—	—	—
Янтарная	+	+	+	±

Примечание: + наличие кислоты,
— отсутствие кислоты,
± незначительное количество (следы)

Опыты с красными винами показали, что пленчатые дрожжи разрушают красящие вещества (за шесть месяцев с 174,4 мг/л до 3,3 мг/л) и снижают содержание суммы дубильных и красящих веществ (за шесть месяцев с 640,0 мг/л до 260,0 мг/л). В результате этих процессов изменяются интенсивность окраски вина и его цвет.

Изменения летучих компонентов больных «цвелю» вин мы смогли проследить с помощью газового хроматографа VX-1. На рисунках 1, 2, 3 представлены хроматограммы эфиров и высших спиртов. Контрольное (здоровое) вино содержит 15 веществ: три эфира — этилацетат, бутилацетат, изоамилацетат; шесть высших спиртов — вторичный бутанол, пропанол, изобутанол, н-бутанол, амиловый оптически активный, изоамиловый. Кроме того, этанол и пять пенидентифициро-

важных летучих компонентов. Через 3 месяца хроматограмма показывает отсутствие бутилацетата и одного вещества из группы неидентифицированных. Спустя 6 месяцев отсутствует семь компонентов (бутилацетат, изоамилацетат, н-бутанол и четыре из группы неизвестных веществ). Этилацетат и одно неидентифицированное вещество обнаружены в незначительных количествах.

Во всех опытах (с представителями различных видов плесневых дрожжей), как правило, отсутствовала группа веществ, к сожалению, неопределенных. В литературе мы не встретили подобных исследований, поэтому сказать, что это за вещества пока не представилось возможным.

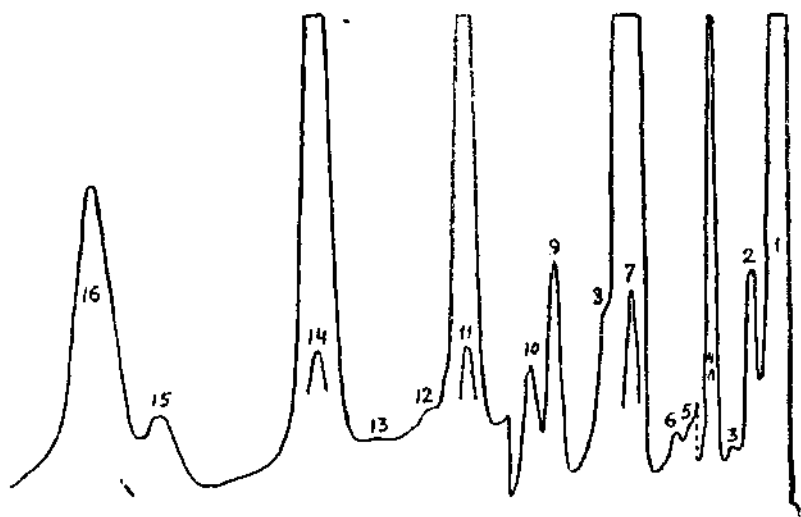


Рис. 7. Хроматограмма эфиров и высших спиртов здорового вина (контроль)

- | | |
|------------------------|-----------------------------------|
| 1 — экстрагент | 9 — вторичный бутанол |
| 2 — этилацетат | 10 — пропанол |
| 3 — неидентифицировано | 11 — изобутанол |
| 4 — неидентифицировано | 12 — неидентифицировано |
| 5 — бутилацетат | 13 — неидентифицировано |
| 6 — неидентифицировано | 14 — н-бутанол |
| 7 — этанол | 15 — амилловый оптически активный |
| 8 — изоамилацетат | 16 — изоамиловый |

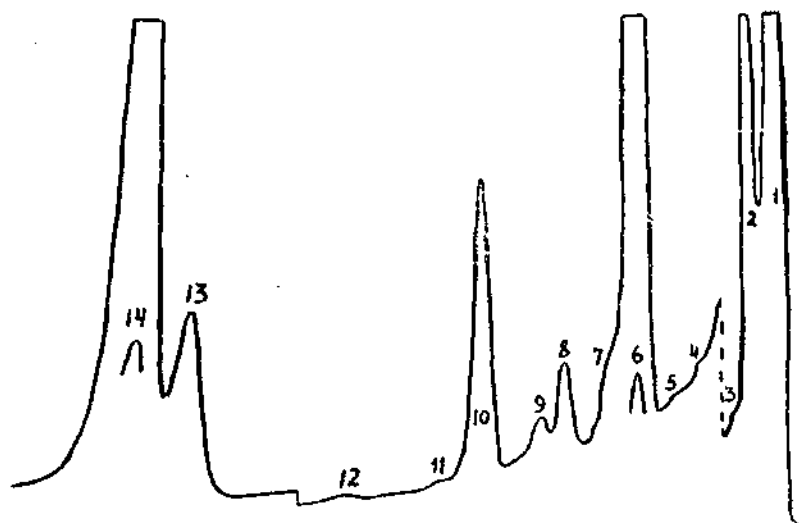


Рис. 2. Хроматограмма эфиров и высших спиртов большого «цвелью» вина (через 3 месяца)

- | | |
|------------------------|-----------------------------------|
| 1 — экстрагент | 8 — вторичный бутанол |
| 2 — этилацетат | 9 — пропанол |
| 3 — неидентифицировано | 10 — изобутанол |
| 4 — неидентифицировано | 11 — неидентифицировано |
| 5 — неидентифицировано | 12 — н-бутанол |
| 6 — этанол | 13 — амилловый оптически активный |
| 7 — изоамилацетат | 14 — изоамиловый |

Хроматограммы летучих кислот показывают в контрольном вине наличие уксусной, изомасляной, н-масляной, изовалериановой кислот. В опыте с развитием дрожжей *Candida tuscodermis* через 6 месяцев отсутствовала изовалериановая кислота, а с развитием *Pichia alcoholophila* хроматограмма показывает н-валериановую кислоту, которая отсутствовала в контроле. В остальных опытах качественный состав летучих кислот не изменился.

Химические процессы, которые происходят в большом «цвелью» вине, вызывают значительные изменения вкуса и внешнего вида вина. Находясь продолжительное время под пленкой, оно теряет сортовой букет, приобретает посторонние неприятные тона, изменяет окраску и становится, в конце концов, непригодным для употребления.

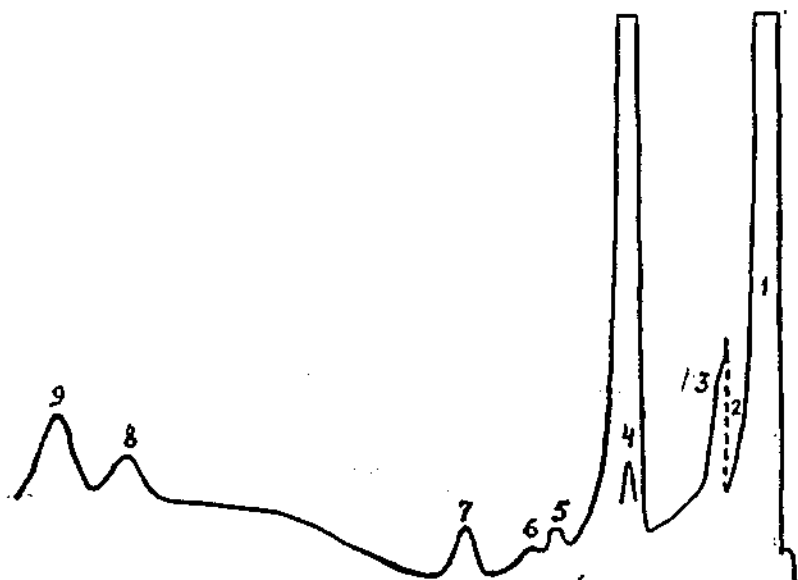


Рис. 3. Хроматограмма эфиров и высших спиртов большого «цвелью» вина (через 6 месяцев)

- | | |
|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 — экстрагент | 6 — пропанол |
| 2 — этилацетат (следы) | 7 — изобутанол |
| 3 — неидентифицировано (следы) | 8 — амилловый оптически активный |
| 4 — этанол | 9 — изоамилловый |
| 5 — вторичный бутанол | |

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПЛЕНЧАТЫХ ДРОЖЖЕЙ В ВИНЕ

Развитие пленчатых дрожжей в вине зависит от ряда факторов. Мы изучали влияние спирта, кислотности и сернистого ангидрида на эту группу дрожжей.

Пленчатые дрожжи имеют различную устойчивость к спирту. Наиболее спиртоустойчивыми являются дрожжи, выросшие спонтанно в условиях винодельческого производства. Они не развиваются в вине при 16 об.% спирта. Наименее спиртоустойчивы *Hansenula anomala*, не развивающиеся при 13 об.% спирта. Этим, по-видимому, можно объяснить то, что

нам не удалось выделить их из столовых молдавских вин. Дрожжи *Candida mycoderma* и *Pichia alcoholophila* прекращают развитие при 15 об.% спирта.

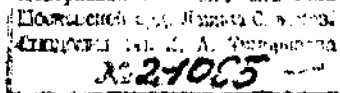
Изучаемые нами виды пленчатых дрожжей являются высоко кислотоустойчивыми. Максимальная кислотность столовых вин (13—15 г/л винной) не ограничивает их развития.

По вопросу сульфитоустойчивости пленчатых дрожжей в литературе имеются весьма противоречивые мнения. Так, М. А. Герасимов (1955) считает, что дрожжи *Mycoderma**) переносят дозы в 280 мг/л. В работах Шандерля (1960) приводятся данные о том, что пленчатые дрожжи весьма устойчивы против сернистого ангидрида, и их развитие нельзя устранить даже при наличии в вине 500 мг/л общего содержания ангидрида. Однако ряд авторов (Н. И. Сербинюва, 1958, Д. К. Чаленко, 1960 и др.) считает, что эти дрожжи очень чувствительны к сернистой кислоте, и что она препятствует развитию их в вине.

Из работы Кильгофера (1963) известно, что антисептическое действие сернистого ангидрида основывается, если не исключительно, то преимущественно, на находящейся в вине недиссоциированной сернистой кислоте (H_2SO_3), а не на ее ионах (SO_3^{2-} и HSO_3^-). Автор указывает на связь этой недиссоциированной кислоты с pH вина. Если при наличии 100 мг/л свободного сернистого ангидрида в очень кислом вине с pH 2,8 недиссоциированной сернистой кислоты содержится около 10 мг, то при pH 3,8 — всего около 1 мг. Поэтому в кислых винах эта кислота является более сильным антисептиком.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что пленчатые дрожжи в Молдавии не являются сульфитоустойчивыми, и развитие их прекращается уже при сравнительно невысокой дозе общей сернистой кислоты (200 мг/л). Наиболее сульфитоустойчивыми являются дрожжи, выросшие на вине спонтанно. Они не развиваются при содержании общей сернистой кислоты 200 мг/л. Виды *Candida mycoderma*, штамм 3₁, *Pichia alcoholophila*, штамм 25₁, *Hansenula anomala*, штамм 166₁ не развиваются уже при 150 мг/л общей сернистой кислоты. По-видимому, именно высокая активная кислотность молдавских столовых вин является основной причиной того, что пленчатые дрожжи не развиваются в них при сравнительно невысокой дозе сернистой кислоты. Кроме того, следует учиты-

*) В транскрипции *mycoderma* вместо *mycoderma*.



вать недавнее применение в нашей республике этой кислоты, как антисептика, которая стала широко использоваться в промышленном виноделии фактически только с 1945 года.

БУТЫЛОЧНЫЕ ПОМУТНЕНИЯ СТОЛОВЫХ ВИН

Помутнения бутылочных вин в Молдавии встречаются весьма часто. Нами были исследованы 45 образцов помутневших бутылочных вин из разных районов республики. В 30 образцах (т. е. около 70%), помутнение было вызвано группой пленчатых дрожжей (табл. 6).

Попадая в бутылки при розливе вина, пленчатые дрожжи без свободного доступа кислорода, пленки, как правило, не образуют. Они не вызывают тех химических изменений, которые наблюдаются при заболевании вин «цвелью». Образую

Таблица 6

Видовой состав пленчатых дрожжей, изолированных из помутневших вин различных районов Молдавии

В и д	Количество выделенных штаммов	В и н о
<i>Candida mycoderma</i>	22	Алиготе Фетяска Рнацителн Смесь гибридов красных Трамниер Каберне Гибрид розовый Гибрид красный Смесь европейских Белое сухое
<i>Pichia alcoholophila</i>	3	Смесь европейских Гибрид красный Смесь красных
<i>Pichia membranaefaciens</i>	1	Гибрид розовый
<i>Pichia</i> sp.	17	Алиготе Смесь европейских белых Каберне Делавар Мускат оттопель Гибрид красный Смесь европейских белых Европейское розовое Смесь красных Смесь розовых

осадов и вызывая помутнение готового продукта, дрожжи портят товарный вид вина, делая его непригодным для реализации. Одной из основных причин, ведущих к дрожжевым помутнениям, является насыщение при розливе вина кислородом. Это происходит на автоматических линиях розлива, а также через полнэтиленовые пробки, которые не обеспечивают герметичность укупорки. Растворенный в вине кислород, позволяет дрожжам, попавшим в бутылки, сохранять свою жизнедеятельность длительное время. Нам удалось изолировать два штамма дрожжей *Candida mycoderma* (230₁ и 230₂) из вина сорта «Кряца», которое находилось на выдержке 14 лет. Дрожжи, обуславливающие помутнения столовых бутылочных вин, по своим физиологическим свойствам идентичны дрожжам, вызывающим заболевание вин «цвелью» и представлены родом *Pichia* и *Candida mycoderma*.

ПИРЭФ И СОРБИНОВАЯ КИСЛОТА, КАК СРЕДСТВО БОРЬБЫ С ПЛЕНЧАТЫМИ ДРОЖЖАМИ

Одним из способов стабилизации вина является применение антисептиков (консервантов). Среди большого их количества, испытываемого в последнее время энологами различных стран, наиболее перспективными зарекомендовали себя диэтиловый эфир пироугольной кислоты (пирэф) и сорбиновая кислота. Изучение этих антисептиков проводилось, главным образом, с целью применения их для предупреждения вторичного заброживания при производстве полусладких вин. В дозах до 200 мг/л пирэфа и 300 мг/л сорбиновой кислоты они не вызывают изменения органолептических свойств вина. Что касается их консервирующих свойств, то единого мнения по этому вопросу нет, так как различные микроорганизмы вина по-разному реагируют на действие этих антисептиков. В свою очередь эффективность консервирующего действия пирэфа и сорбиновой кислоты зависит от содержания в вине спирта, сахара, pH, от температуры хранения вина, содержания в нем сернистой кислоты, от количества находящихся в вине дрожжевых клеток.

Антисептическое действие пирэфа и сорбиновой кислоты*)

*) Диэтиловый эфир пироугольной кислоты, который мы использовали в своей работе, был впервые синтезирован в СССР лабораторией органического синтеза Института химии АН МССР, где и получил название «Пирэф». Сорбиновая кислота была получена из ЧССР.

испытывалось пами на различных видах пленчатых дрожжей. В целях предохранения столовых вин от бутылочных помутнений и заболевания «цвелью», устанавливались наиболее эффективные дозировки каждого консерванта в отдельности, а также в сочетании их с сернистым ангидридом (для снижения доз, вносимых консервантов). Изучалась активность антисептиков в зависимости от степени осветленности вина (количество в нем дрожжевых клеток).

В результате проведенных исследований установлено, что антисептические свойства пирэфа значительно варьируют в зависимости от вида пленчатых дрожжей, количества их клеток, находящихся в вине и химического состава вина. Так, наиболее устойчивыми являются *Pichia alcoholophila*, которые не развиваются при внесении в вино 400 мг/л пирэфа. *Pansea-pia anomala* и *Candida mycoderma* не развиваются при содержании в вине 250 мг/л. Эти высокие дозировки можно снизить, применяя совместно два антисептика пирэф с сернистой кислотой. Наиболее эффективна обработка предварительно отфильтрованных вин пирэфом в количестве 100 мг/л в сочетании с сернистой кислотой в дозе 100 мг/л. Необходимо отметить, что одна сернистая кислота (100 мг/л) не предохраняет столовые вина от развития в них пленчатых дрожжей. В виду специфичности действия пирэфа (быстрый гидролиз в вине), применение его целесообразно только при стабилизации бутылочных вин.

В результате проведенных исследований с сорбиновой кислотой установлено, что она даже в больших дозах (350 мг/л) только тормозит развитие пленчатых дрожжей. Стабилизировать столовые вина сорбиновой кислотой можно, только применяя ее вместе с сернистой, в количествах 200 мг/л сорбиновой и 100 мг/л сернистой кислоты.

В виду того, что сорбиновая кислота в винах не гидролизует, применять ее целесообразно для обработки больших партий столовых вин в негерметических резервуарах.

Одной из основных мер борьбы с изучаемой группой дрожжей является приготовление столовых вин по предложенной П. Н. Унгурином и А. Е. Орешкиной (1961) технологической схеме, которая предусматривает получение малоокисленных вин, т. е. вин с низким содержанием кислорода, что препятствует развитию пленчатых дрожжей. Сочетание такой технологии с применением консервантов и высокой культурой производства сохраняет столовые вина от бутылочных помутнений и заболеваний «цвелью».

В Ы В О Д Ы

1. Пленчатые дрожжи широко распространены на виноградниках, оборудовании винодельческого производства и в столовых винах Молдавии. Количество их на виноградном кусте заметно возрастает к моменту сбора урожая. Попадание этих дрожжей в вина происходит двумя путями; с ягодами при переработке винограда и при контакте вин с инфицированным оборудованием.

2. Роды пленчатых дрожжей, встречающиеся на объектах виноделия в Молдавии: *Candida* — 53%, *Pichia* — 38% и *Hansenula* — 9%.

3. Виды дрожжей, изолированные из проб, собранных на виноградниках, существенно отличаются от видов, изолированных из столовых вин и винодельческого оборудования.

Превалирующими видами дрожжей, находящимися на ягоде к моменту сбора урожая, являются *Candida krusei* и *Hansenula anomala*, характерной особенностью которых является способность сбраживать сахара. Из винодельческого оборудования и вин выделяются дрожжи, относящиеся к видам *Candida mycoderma*, *Pichia alcoholophila* и *Pichia membranaefaciens*, которые характеризуются строгим окислительным метаболизмом.

4. У дрожжей рода *Pichia* и *Candida mycoderma*, изолированных из столовых вин, установлена сопряженность процессов использования ими спиртов и молочной кислоты. Так, при ассимиляции дрожжами глицерина и молочной кислоты не усваиваются маннит и сорбит, а при ассимиляции маннита и сорбита не усваивается глицерин и молочная кислота.

5. Заболевание столовых вин «цвелью», вызываемое развитием пленчатых дрожжей, сопровождается глубокими химическими изменениями — окислением этилового спирта, органических летучих кислот (яблочной, молочной, янтарной, лимонной), глицерина, альдегида. При этом исчезает растворенный в вине кислород, связывается сернистая кислота, разрушаются красящие и дубильные вещества, изменяется состав летучих компонентов вина.

6. Методом газовой хроматографии установлено в винах больных «цвелью» частичное исчезновение эфиров и высших спиртов (бутилацетата, изоамилацетата, *n*-бутанола), а также группы неидентифицированных веществ и почти полностью этилацетата. В составе летучих кислот (уксусной,

изомасляной, н-масляной, изовалериановой) изменения незначительны.

7. *Candida mycoderma*, *Pichia alcoholophila* и *Pichia membranaefaciens* часто вызывают бутылочные помутнения столовых вин, при котором существенных химических изменений в его составе не происходит — теряется лишь товарный вид. Эти виды дрожжей по своим физиологическим признакам идентичны пленчатым дрожжам, вызывающим заболевание вин «цвелью».

8. Различные виды пленчатых дрожжей имеют неодинаковую устойчивость к спирту; наименее спиртоустойчивы *Hansenula anomala*. При благоприятной температуре и доступе кислорода они не развиваются при 13 об. % спирта. Дрожжи *Candida mycoderma* и *Pichia alcoholophila* при этих же условиях не развиваются при 15 об. % спирта. Наиболее спиртоустойчивы пленчатые дрожжи, выросшие в винах спонтанно. Они не развиваются при 16 об. % спирта.

9. Все исследованные пленчатые дрожжи являются кислотоустойчивыми. Максимальная кислотность столовых вин (13—15 г/л винной) не является препятствием для их развития.

10. Все виды пленчатых дрожжей не развиваются в вине при наличии в нем 200 мг/л сернистого ангидрида.

11. Установлено, что обработка столовых вин новыми консервантами: пирэфом (100 мг/л) при бутылочном розливе и сорбиновой кислотой (200 мг/л) при хранении вин в негерметических резервуарах с содержанием в винах 100 мг/л сернистого ангидрида, предохраняет их от бутылочных помутнений и заболеваний «цвелью».

12. Наиболее эффективной мерой борьбы с пленчатыми дрожжами в виноделии является приготовление столовых вин с низким содержанием растворимого кислорода по специальной технологии, предложенной П. Н. Унгурияном и А. Е. Орешкиной (1961), с одновременной обработкой их пирэфом или сорбиновой кислотой. Большое значение имеет при этом также повышение культуры винодельческого производства.

СПИСОК

опубликованных работ по материалам диссертации

- Ивакова Н. Н. Снижение дозровок консервантов за счет совместного их действия. «Виноделие и виноградарство СССР» № 2, 1965.
- Ивакова Н. Н. Антисептическое действие ППРЭФ'а на дрожжевые организмы вина. Сборник статей по химии и применению ППРЭФ'а. Изд. «Карта молдовеняскэ», Кишинев, 1965.
- Ивакова Н. Н. Сорбиновая кислота в борьбе с пленчатыми дрожжами. «Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии» № 3, 1966.
- Ивакова Н. Н. Пленчатые дрожжи Молдавии и вызываемые ими заболевания вин. Материалы 4-й конференции молодых ученых Молдавии. Изд. АН МССР, Кишинев, 1966.
- Ивакова Н. Н. Цель вина и ее возбудители — пленчатые дрожжи. Труды МИИНСВиВ, т. 12, 1966. Изд. «Карта молдовеняскэ».

Технический редактор Н. Чеканский.
Корректор Н. Цимерман.

Сдано в набор 6-IV-67,	Подписано в печать 29-IV-67.
Формат бумаги 60 × 84 ¹ / ₁₆ .	Физ. печатных листов 1,5.
Усл.-печатных листов 1,35.	Уч.-изд. листов 1,1.
ЛБ03665	Тираж 150. Заказ 1832. Бесплатно.

Тип. Издательства ЦК КПМ, Кишинев.