

<http://yadyra.ru>

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ – МСХА имени
К.А. ТИМИРЯЗЕВА**

Кафедра виноделия

Реферат на тему:

**«Ферментация виноградных вин хитинсодержащими
препаратами»**

**Выполнил:
студент 31 группы
факультета садоводства и
овощеводства
Тумасьев А.Н.
Проверил:**

Москва – 2007

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 3 |
| 1. СЫРЬЕВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИНОГРАДА И ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ЕГО КАЧЕСТВУ | 5 |
| 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ВИНОДЕЛИЯ | 6 |
| 3. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ВИНОГРАДНЫХ ВИН | 7 |
| 4. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ВИНОГРАДНЫХ ВИН | 10 |
| 5. БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХИТИНА | 15 |
| 6. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ | 24 |
| СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ | 29 |

ВВЕДЕНИЕ

Культивируемый на земном шаре виноград относится к роду *Vitis* и включает 70 видов, наиболее приспособленных к тому или иному климату. Наиболее благоприятные условия для виноградарства имеются в теплых и умеренных зонах побережья Средиземноморья, в Калифорнии, Южной Африке, на побережье Черного моря, в странах Западной и Восточной Европы, южных регионах России и Аргентине. С приближением к полюсам вегетационный период сокращается, снижается сумма активных температур, а в районах с континентальным климатом продолжительные сильные морозы препятствуют выращиванию винограда. В тропическом климате, например в Индии и Индонезии, виноградное растение развивается на протяжении всего года, что позволяет, применяя определенные приемы, а также методы обрезки, получать по два-три урожая в год.

По континентам виноградные насаждения распределяются следующим образом: Европа — 65 %, Азия — 20, Америка — 9, Африка — 5, Австралия и Новая Зеландия — по 1 %. По данным Международной организации винограда и вина (МОВВ), их площади в мире составляли 7,814 млн га (по состоянию на 1 января 1998 г.), а валовой сбор винограда в 1997 г. равнялся 59,2 млн т. Было выработано 264,4 млн гл вина, собрано 7,0 млн т столового винограда и получено 1,0 млн т кишмиша, изюма и коринки. К 2000 г. производство вина ожидается довести до 328,8 млн гл.

Виноградарство и виноделие зарубежных стран достаточно полно можно рассмотреть на примере нескольких стран, типичных для отдельных континентов и регионов. Так, в Западной Европе наиболее представительны Франция и Германия, а в южной части Европейского континента — Испания и Италия. Среди стран Восточной Европы выделяются Венгрия и Болгария, на Американском континенте — США и Аргентина, в Азии — Турция.

В странах—членах Содружества Независимых Государств промышленное виноградарство развито в Азербайджане, Армении, Грузии, Казахстане, Кыргызстане, Молдове, Российской Федерации, Таджикистане, Туркменистане, Узбекистане и на Украине. Возделыванием винограда и его переработкой занимаются все перечисленные страны, которые по эколого-географическим условиям объединены в три региона: Российская Федерация, Украина и Молдова входят в Европейский, Грузия, Азербайджан и Армения — в Закавказский, Казахстан, Кыргызстан, Таджикистан, Туркменистан и Узбекистан — в Среднеазиатский. Доля первых двух регионов составляет около 80 % площадей виноградных насаждений 11 союзных республик бывшего Союза, а наибольший удельный вес их приходился на Азербайджан, Грузию, Молдову, Российскую Федерацию и Украину. Виноградарство и виноделие указанных стран имеет много общего в технологии возделывания винограда, оборудовании для приготовления различных групп и типов вин и коньяков. В то же время в каждой из них есть свои особенности и различия в способах ведения культуры, сортовом составе, направлениях использования винограда, методах его уборки и переработки, производстве различной винопродукции и ряде других технологических приемов.

Виноградарство в нашей стране изначально было важной и высокодоходной отраслью сельскохозяйственного производства. Возделыванием винограда и его переработкой в России занимались с незапамятных времен. Археологические раскопки старинных поселений свидетельствуют о том, что культура винограда существовала примерно с VI..V в. до н.э. Наиболее древняя культура винограда обнаружена в Южном Дагестане (свыше двух тысяч лет), а в остальных регионах Северного Кавказа и Нижнего Поволжья — в XVII.. XVIII вв. По указанию Петра I в 1716 г. первые виноградники были заложены на Дону. К 1914 г. их площади уже равнялись примерно 50 тыс. га, а валовой сбор — 213 тыс. т. Быстрое увеличение площадей, занятых виноградными насаждениями промышленного типа, началось с конца 50-х годов. Среднегодовое производство винограда в 1986... 1990 гг. составляло 685,8 и 428,4 тыс. га в 1991...1995 гг., а валовой сбор с 612,2 тыс. т в 1990 г. снизился до 300,6 тыс. т в 1995 г. Рекордный урожай был собран в 1984 г. — 1134 тыс. т, а в среднем за 1986...1990 гг. получали 685,8 тыс. т. Виноградники в плодоносящем возрасте в 1991 г. занимали 115 тыс. га, с которых было убрано 543 тыс. т при урожайности с 1 га 4,51 т, а в 1997 г. — 3,84 т с каждого из 72,2 тыс. га, а в 1999 г. — 3,98 и 61,7 соответственно.

Динамично развивалась и винодельческая отрасль. В 1985 г. общая мощность предприятий по розливу вин, производству шампанского в районах Урала, Сибири и Дальнего Востока достигала 120 млн. дал., объемы производства шампанского были доведены до 105 млн бутылок в год, а выработка вин в целом в стране достигала 100 млн дал. По производству винодельческой продукции Российская Федерация стала ведущей республикой. Так, удельный вес отрасли в пищевой промышленности был равен примерно 16 %, выпуск вина достиг 40 %, шампанского — 42 и коньяка — 26 %. Виноград выращивают в 198 специализированных совхозах, 97 из них имеют в своей структуре предприятия первичного виноделия. Они и перерабатывают практически весь производимый в стране виноград. Виноградное вино, шампанское и коньяк производятся в 70 субъектах Российской Федерации на специализированных предприятиях, а готовую продукцию разливают в основном на специализированных заводах вторичного виноделия. В 1997 г. выработано 10,52 тыс. дал виноградного вина, 9736 тыс. шампанского и 11 600 тыс. дал коньяка, а в 1999 г. эти показатели соответственно были равны 1300 тыс. дал, 7300 тыс. и 1411,92 тыс. дал.

1. СЫРЬЕВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИНОГРАДА И ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ЕГО КАЧЕСТВУ

Плоды (ягоды) винограда являются идеальнымместилищем натурального стерильного, сладкого и ароматного сока. Благодаря сочности ягод, высокой сахаристости и умеренной кислотности они обеспечивают получение соков и натуральных, гигиенически здоровых вин. Наличие в твердых частях грозди большого количества естественных химических веществ позволяет формировать широкое разнообразие типов вин, соков и безалкогольных пищевых продуктов. Особо на качество последних влияют состав и генетический тип почв. От них зависят полнота, тонкость и букет, а часто и сам тип вина. Так, перегнойно-карбонатные почвы способствуют получению высококачественных игристых вин и тонких коньяков. На почвах умеренно влажных субтропиков в среднеземноморских районах созревают ягоды, дающие самые ароматные и гармоничные десертные вина. Из винограда, выращенного в более жарких субтропиках на почвах сероземного типа, вырабатывают избранные крепкие вина типа хереса, портвейна, мадеры. Коричневые лесные (буроземные) почвы с нейтральной или слабокислой реакцией дают наилучшие красные натуральные сухие вина. Мускатные сорта винограда лучше всего удаются на шиферных почвах или на южных черноземах с большим включением гравия и обломков щебня. Наименее подходящие почвы для выращивания винограда — мощные черноземы с большим содержанием гумуса. На них особенно при орошении получают высокие урожаи винограда (до 20 т/га), но без достаточного количества сахаров и эфирных масел ягоды легко поражаются гнилью, а вина из них получаются жидкими и водянистыми, склонными к окислению и заболеваниям. Система мероприятий и приемов возделывания винограда, включающая весь комплекс работ по созданию виноградных насаждений и уходу за ними, должна обеспечивать получение урожая, оптимального по механическому и химическому составу гроздей и ягод.

Анализ механического состава гроздей и ягод позволяет определить соотношение масс структурных элементов грозди — гребня и ягод, а в них — кожицы, мякоти с соком и семян. В среднем масса гребней равна 3...7 % массы зрелых гроздей, мякоть с соком — 75...85 массы ягод, а также кожица — 15...20 и семена — 3...6 %. Изучив эти свойства у технических сортов винограда, можно правильно выбрать машины для механизированной уборки урожая и его переработки. По механическому составу грозди оценивают ожидаемый максимальный выход сусла, объем вторичного сырья и готовой винопродукции или полуфабрикатов, а также судят о наиболее целесообразном использовании винограда и выборе технологической схемы его переработки.

2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ВИНОДЕЛИЯ

Для промышленной переработки винограда имеют значение три группы микроорганизмов: дрожжи и дрожжеподобные грибы, молочнокислые и уксуснокислые бактерии, а также плесневые грибы. В каждой из них различают роды, виды и штаммы. Объединяют простейшие одноклеточные организмы по какому-нибудь общему для них признаку. Например, дрожжи сбраживают углеводы с образованием спирта, молочнокислые бактерии — молочной кислоты, уксуснокислые бактерии окисляют спирт в уксусную кислоту, плесневые грибы образуют при своем развитии на поверхности продукта плесневый налет. В группе микроорганизмов род — самый высокий ранг, имеющий значение в микробиологии, — представляет собой совокупность видов с многими общими свойствами. Группа штаммов, обладающих большим морфологическим (форма) и физиологическим (жизнедеятельность) сходством, занимающих определенный ареал и находящихся в сходных взаимоотношениях со средой обитания, относится к виду. Потомство одной или нескольких клеток одного вида микроорганизмов с ценными для производства физиологическими и биохимическими свойствами представляет штамм (расу). Их количество зависит от химического состава виноматериалов при хранении, санитарного состояния помещений и обсемененности исходного сырья. Практическую ценность для виноделия представляют только истинно винные дрожжи рода *Saccharomyces*. Полезные дрожжи — это дрожжи, превращающие виноградное сусло в вино хорошего качества. К ним относятся в основном дрожжи видов *Saccharomyces vini* и *Saccharomyces*, из которых путем селекции отбирают для производства расы (штамма) дрожжей, используемые затем для приготовления разводов чистых культур. В конечном итоге различные типы виноградных вин высокого качества получают лишь с применением необходимых отселекционированных чистых культур полезных микроорганизмов и рационального управления процессами спиртового, яблочно-молочного и яблочно-спиртового брожений. Помимо основных продуктов—спирта и углекислого газа — при спиртовом брожении возникает целый ряд других, так называемых вторичных продуктов брожения. Из 100 г гексоз под воздействием комплекса ферментов дрожжей образуется 48,6 г диоксида углерода, 3,3 г глицерина, 0,5 г янтарной кислоты и 1,2 г смеси молочной кислоты, ацетальдегида, ацетоина и других органических соединений. Наряду с этим дрожжевые клетки в период размножения и логарифмического роста потребляют из виноградного сусла аминокислоты, необходимые для построения собственных белков. При этом образуются из побочных продуктов брожения главным образом высшие спирты (обнаружено их почти 50, а в вине накапливается в среднем 250 мг/л), обладающие разнообразными запахами и существенно влияющие на аромат и букет вина. В их создании важное значение имеют и высокомолекулярные альдегиды и кетоны, летучие и жирные кислоты и их эфиры, углеводы и аминокислоты, все основные

органические кислоты, фенольные соединения, эфирные масла, азотистые и минеральные вещества.

Формирование вина начинается вслед за окончанием бурного брожения и заканчивается к моменту снятия виноматериалов с дрожжей (первая переливка). В этот период протекают физические, химические и биологические процессы, связанные с осветлением вина и нормализацией кислотности. Все изменения в вине на стадии его становления тесно увязаны с температурой. Практикой установлено, что при оптимальной температуре (около 12 °С) автолиз дрожжей проходит нормально, при ее повышении уменьшается выпадение винного камня, но ускоряется выделение диоксида углерода. Понижение температуры вызывает обратные явления. При формировании вина снижается антиоксидантное защитное действие диоксида углерода и увеличивается влияние на вино кислорода воздуха.

После снятия виноматериала с дрожжевых осадков процессы первичного виноделия заканчиваются. Вино переходит во вторичное виноделие — в стадию созревания, включающую период от конца его формирования до начала его старения.

Микрофлора виноградного вина представлена дрожжами, уксусно- и молочнокислыми бактериями. Они переходят в вино из суслу, попадают с оборудования, емкостей, шлангов, трубопроводов, мелкого инвентаря, заносятся со вспомогательными материалами. Большая часть специфичных, свойственных виноделию микробов причиняет вред винодельческому производству и при массовом размножении вызывает помутнение, а затем болезни (пороки) вин.

3. ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ВИНОГРАДНЫХ ВИН

Виноградные вина в Российской Федерации производят в соответствии с Основными правилами производства виноградных вин, утвержденными в 1993 г. Они регламентируют кондиции готовой продукции, отклонения от нормы основных химических показателей, предусматривают перечень разрешенных технологических приемов и веществ, используемых при выпуске вин, допустимые дозировки их, а также перечень запрещенных средств. Принято следующее определение вина: виноградное вино — продукт, получаемый в результате спиртового брожения виноградного суслу или мезги. В производстве специальных вин почти во всех странах предусмотрено добавление этилового спирта только виноградного происхождения. Вино определенного наименования готовят по технологической инструкции с конкретизацией требований Основных правил производства вин и санитарных норм.

В соответствии с действующей классификацией вина подразделяют по назначению, цвету и составу основных компонентов, ароматичности, сорту винограда, происхождению, срокам выдержки (возрасту) и технологии приготовления. Их объединяют в категории, типы, виды, группы и подгруппы. Вина виноградные в

зависимости от способа производства делят на натуральные и специальные. Вина как первой, так и второй группы могут быть ароматизированные (с использованием пряно-ароматических добавок) и контролируемых наименований по происхождению (из определенных сортов винограда строго регламентируемого района). По содержанию спирта и сахара вина бывают натуральные — сухие (без ощутимой сладости), сухие особые, полусухие, полусладкие (с объемной долей этилового спирта 9...16 % об. и массовой концентрацией сахаров 3...80 г/дм³) и специальные — сухие, крепкие, полудесертные, десертные и ликерные с 12...20 % об. спирта и 75...300 г/дм³. В зависимости от качества и сроков выдержки вина относят к молодым, без выдержки, выдержанные, марочные, коллекционные и контролируемого наименования по происхождению. Началом срока выдержки принято считать 1 января следующего за урожаем винограда года. По цвету (окраске) различают белые, розовые и красные вина. К первым относят вина от светло-соломенного (молодое «Алиготе») до янтарного — («Мускат белый» или «Портвейн белый»), а иногда и телесного цвета — (французское шампанское). Розовые и красные вина имеют очень много оттенков: от светло-рубиновых до темно-гранатовых и кирпичных тонов (соответственно «Жемчужина России», «Мускат черный», «Каберне Абрау»).

По содержанию углекислоты натуральные вина могут быть тихие, шипучие и насыщенные CO₂. Вина с избытком углекислоты представлены искусственно газированными и естественно игристыми винами. В свою очередь, последние бывают слабоигристые, так называемые жемчужные — «покалывающие» (от итал. фризанти), шампанские и собственно игристые вина, насыщенные углекислотой за счет вторичного брожения.

По сорту винограда вина делятся на сортовые, сепажные и купажные. Сортные готовят из одного ампелографического сорта винограда и называют их, например, «Алиготе», «Рислинг», «Ркацителли», «Каберне-Совиньон» или «Саперави». К каждому из них разрешается добавлять до 15 % винограда других сортов того же ботанического вида и окраски ягод основного сорта.

Сепажные вина — это вина из смеси различных сортов винограда, специально заложенной на плантации или пропорционально образуемая из нескольких сортов, произрастающих в одинаковых экологических условиях при переработке сырья (гроздей винограда).

Купажные вина вырабатывают из двух или нескольких партий виноматериалов разных сортов винограда. Виноматериал, доля которого в купаже составляет 50 % и более, называют базовым. Типичные купажные вина — шампанское, бордо, херес, марсала, малага и ароматизированные.

По срокам выдержки вина подразделяют на молодые — без выдержки, вина выдержанные, марочные и коллекционные. Молодое вино — это вино, получаемое по общепринятой технологии из отдельных сортов винограда или их смеси, реализуемое до 1 января следующего за урожаем винограда года. Вино без выдержки — это вино,

производимое по общепринятой технологии из конкретных сортов винограда или их смеси и реализуемое с 1 января следующего за урожаем винограда года.

Выдержанное вино — это вино улучшенного качества, приготовляемое по специальной технологии из отдельных сортов винограда или их смеси, с обязательной выдержкой перед розливом в бутылки не менее 6 мес.

Марочное вино — это вино высокого и постоянного качества, полученное из определенных сортов винограда по специальной или традиционной технологии и выдержанное в дубовых бочках перед розливом в бутылки не менее 1,5 лет.

Коллекционное вино — это марочное вино, выдержанное дополнительно в бутылках не менее 3 лет.

Вино контролируемого наименования по происхождению — это вино, произведенное из конкретных сортов винограда строго регламентируемого района, отличающееся оригинальными органолептическими свойствами, связанными с экологическими условиями конкретной местности, указанной в его названии.

Вина по технологии приготовления делят на вина традиционных, классических методов производства (бочковой выдержки, бутылочной шампанизации) и современных, технически прогрессивных [резервуарное (акратофорное), игристое, непрерывного хересования или малоокисленное натуральное белое вино].

Вино, получаемое полным или неполным сбраживанием сусла или мезги, содержащее этиловый спирт только эндогенного происхождения, относится к натуральному вину.

Вино, произведенное полным или неполным сбраживанием сусла или мезги с добавлением этилового спирта, относится к группе специального вина.

Принятая в Российской Федерации торгово-промышленная систематизация вин является универсальной, так как в ней выделены группы вин с общей технологией приготовления и примерно одинаковыми показателями состава и качества. Эти требования предусматриваются действующими Основными правилами производства виноградных вин, а также соответствующими государственными и отраслевыми стандартами.

Натуральные вина как самая обширная и многочисленная категория винодельческих продуктов представлены наибольшим числом групп и типов вин и виноматериалов. Это прежде всего сухие, сухие особые, полусухие и полусладкие, сортовые, купажные, молодые, без выдержки, выдержанные, марочные, коллекционные и контролируемые по происхождению вина. Выпускают их в соответствии с требованиями действующих Госстандарта и Основных правил производства виноградных вин с соблюдением санитарных норм и технологических инструкций, утвержденных для вина конкретного наименования. По способам приготовления и назначению виноматериалы бывают сухие и недоброды. Белые сухие подразделяют на шампанские, коньячные, натуральные сухие, хересные и купажные (сухосброженные) виноматериалы. В купажных

игристых и специальных крепких винах используют сухие купажные виноматериалы. Для производства игристых и полусладких вин предназначены виноматериалы — недоброды.

Шампанские виноматериалы — это полуфабрикат, используемый для производства шампанского. В Российской Федерации их вырабатывают из разрешенных для этих целей таких сортов винограда, как Пино черный и Пино серый, Шардонне, Каберне-Совиньон, Мускат белый, Рислинг, Сильванер, Совиньон, Алиготе, Траминер розовый, Цимлянский черный, Плечистик и др. Виноград собирают в шампанской стадии зрелости с обязательной сортировкой гроздей. Количество суслу, отбираемого с прессов периодического действия или стекателей, не должно превышать 50 дал из 1 т винограда. Его сульфитируют и сбраживают на чистой культуре специальных рас дрожжей при 16...18 °С.

Коньячные виноматериалы — это сырье для коньячного спирта, получаемое из виноградных сортов Алы терский, Клерет, Сильванер, Мцване, Алиготе, Плавай, Ркацителли и др. Виноград перерабатывают по схеме приготовления натуральных белых сухих виноматериалов с содержанием дрожжей до 2 %, но без применения сернистой кислоты. Сусло перед отстаиванием охлаждают до 10... 12 °С.

Хересные виноматериалы — это полуфабрикат для хересных вин, вырабатываемый из нейтральных белых сортов винограда или их смеси — Алиготе, Рислинг, Сильванер, Совиньон, Клерет, Траминер розовый, Пино белый, Ркацителли и др. при сахаристости не менее 18...20 % и перерабатывают с гребнеотделением по технологии производства белых сухих вин. При рН суслу 3,5 и более проводят гипсование винограда или мезги из расчета 1,5...2 г сульфата кальция на 1 кг. Хересование виноматериалов проводят пленочным, глубинным, беспленочным и глубиннопленочным способами. Брожение суслу ведут насухо на чистой культуре дрожжей рас Херес 20-С или Херес 96-К. Полученные при этих способах виноматериалы накапливают альдегиды, ароматические спирты, эфиры, лактоны и другие компоненты букета столового и марок крепких хересов.

Купажные (сухосброженные) виноматериалы используют в купажах игристых и специальных крепких вин, а красные сухие — для натуральных игристых вин.

Порядок (схему) обработки указанных и других виноматериалов устанавливают после их проверки на розливостойкость в соответствии с действующей Технологической инструкцией по обработке виноматериалов и вин на предприятиях винодельческой промышленности.

4. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ ВИНОГРАДНЫХ ВИН

Технология виноделия основана на регуляции процессов, катализируемых ферментами сырья, его микрофлоры, культурных штаммов дрожжей и бактерий - возбудителей брожения. Наряду с этим используются промышленные препараты гидролитических ферментов различной специфичности. Обработку ферментными препаратами применяют на стадиях получения сока, подготовки суслу к брожению,

стабилизации вин. Способ применения ферментных препаратов определяется качеством сырья и видом вырабатываемой продукции.

При выделении сока используют целые грозди винограда или ягоды без гребней. Массовая доля мякоти и сока составляет 75-85%, кожицы 13-20%, семян 3-6%, гребней 2-7%. Основным препятствием к выделению сока является водоудерживающая способность сырья и вязкость жидкой фазы, связанная с наличием полисахаридов - нейтральных и кислых (пектиновых веществ). В сусле-самотеке содержание полисахаридов составляет 0,4-1,2 г/л, в прессовых фракциях 1,0-8,5 г/л. Концентрация пектина в соке 0,1-0,8 г/л, в мускатных сортах - 3-4 г/л.

Выход сока и скорость фильтрации определяются в основном степенью расщепления наиболее гидрофильного полимерного компонента - пектина. В виноградных ягодах присутствует протопектин (компонент межклеточников и клеточных стенок), растворимый пектин клеточного сока и промежуточные формы трансформации протопектина в растворимый пектин. Расщепление пектиновых веществ винограда катализируют присутствующие в ягодах пектинэстераза, полиметилгалактуроназа, полигалактуроназа, пектинтрансэлиминазы, ферменты гидролиза нейтральных полисахаридов пектина. При разрушении ягод в процессе Получения сока протопектин приходит в соприкосновение с растворимыми формами пектинрасщепляющих ферментов. Это ускоряет естественный процесс деградации пектиновых веществ, имеющий место при созревании ягод. При относительно невысоком содержании пектина он может быть расщеплен ферментами сырья. При обработке ягод с высоким содержанием пектина (американских сортов), недостаточно зрелых ягод с повышенным содержанием протопектиновой фракции применяют обработку пектолитическими ферментными препаратами.

Применение пектолитических ферментных препаратов позволяет увеличить выход сусла на 2-6%, количество фракции сусла-самотека на 10%. Сусло осветляется в течение 5-10 ч вместо 20-24 ч. Повышается выход экстрактивных веществ и интенсивность окраски в винах.

Для гидролиза пектиновых веществ могут быть рекомендованы такие препараты, как Пектаваморин, Пектофоетидин, Полигалактуроназа Г10х, Ультразим, Винфлоу, Винозим, Пектинекс. Первые два препарата имеют также высокую активность кислой протеазы, что дает эффект осветления сусла за счет гидролиза белковой составляющей коллоидных частиц.

Для интенсификации сокоотделения применяют также препараты, в которых наряду с пектолитическими присутствуют ферменты гидролиза нейтральных полисахаридов - целлюлозы и гемицеллюлоз. Это препараты Вильзим АК, Ксилонигрин, Поликанесцин, Целловиридин, Целлофоетидин. Гидролиз нейтральных полисахаридов сопровождается высвобождением связанных с ними лигниноподобных и других фенольных веществ. При доступе кислорода фермент о-дифенолоксидаза, присутствующий в сырье, катализирует окисление фенольных веществ. Образующиеся

хиноны полимеризуются, что является причиной побурения окраски сусла. Хиноны комплексуются с белками, вызывая коллоидное помутнение. Дополнительный вклад в этот процесс дает мацерация тканей под действием комплекса цитолитических ферментов. Для удаления темноокрашенных продуктов и коллоидных частиц применяют сорбенты - бентонит, полиоксиэтилен, поливинилпирролидон.

Ферментативную обработку применяют при получении различных видов виноматериалов. Разработана схема производства красных столовых виноматериалов, которая включает сульфитацию мезги, внесение 0,01% Пектофоедина П10х, брожение мезги до остаточной сахаристости 1-3%, отделение, дображивание и купаживание виноматериалов. Ферментативная обработка мезги увеличивает выход красящих веществ на 10-30%, повышает коллоидную стабильность виноматериалов.

При получении белых десертных полусладких вин сульфитированную мезгу подогревают до 50° С, вносят Ксилонигрин П10х (0,01%) или Полигалактуроназу Г10х (0,00005%), настаивают мезгу при произвольном остывании в течение 12-48 ч, после чего отделяют виноматериалы, производят дображивание, спиртование, сульфитацию, обработку бентонитом и холодом.

При сравнении действия ферментных препаратов (Поликанесцина, Целловиридина, Вильзима, Ультразима, Тренолина опти и Пектиназы Гх из дрожжей *K. marxianus*) на выход сусла из мезги смеси белых сортов как оптимальные выбраны варианты обработки 0,02% Поликанесцина Г20х или 0,02% Вильзима АК Г20х. При этом общий выход сусла повышается на 4%. Для обработки мезги сорта Алиготе рекомендован Целловиридин Г20х (0,02%), увеличение выхода сусла составило 3,5%.

Обработка Поликанесцином Г20х положительно влияет на аромат виноматериалов, что связано с увеличением концентрации терпеновых спиртов и β-фенилэтилового спирта. В гидролитическом комплексе Поликанесцина присутствуют гликозидазы: α- и β-галактозидаза, α- и β-глюкозидаза, β-маннозидаза, β-ксилозидаза, α- и β-фукозидаза, α- и β-арабинофуранозидаза, α-рамнозидаза. Под действием гликозидаз происходит расщепление предшественников терпеновых спиртов (их гликозид-связанных форм) с освобождением последних.

Мезгу сорта Алиготе сульфитировали и ферментировали Поликанесцином (0,01%) в течение 12 ч при температуре 25° С. Отделенное сусло частично сбраживали и спиртовали до 18%. В полученных виноматериалах для портвейна белого Алушта содержание терпеновых спиртов повысилось с 1,89 до 2,37 мг/л, β-фенилэтилового спирта - с 2,87 до 5,10 мг/л за счет обработки ферментным препаратом.

Ферментные препараты гидролитического действия используются для стабилизации вин от коллоидных помутнений.

Виноградный сок содержит коллоидные компоненты клеточного сока, твердых частей ягоды и грозди. Основным источником биополимеров сусла и вина являются структурные элементы ягоды (кожица, клеточные стенки мякоти), о чем свидетельствует сходство фракционного состава биополимеров кожицы и виноматериалов.

В процессе брожения коллоидная система вина обогащается биополимерами автолизирующихся дрожжей: глюканом и маннопротеином клеточных стенок, продуктами неполного расщепления белков. Эти компоненты участвуют в формировании коллоидных помутнений наряду с биополимерами винограда.

На основании исследований химической природы частиц коллоидных помутнений вин разработана мультиэнзимная композиция МЭК-1 для виноделия, которая используется для стабилизации вин различных типов. В состав композиции входят препараты β -глюканазы, β -маннаназы, полигалактуроназы и кислой протеазы. Содержание углеводного компонента биополимеров вина снижается при действии β -глюканазы на 19-27%, β -маннаназы - на 42-44%, полигалактуроназы - на 17-28%. Кислая протеаза гидролизует 27-49% белкового компонента. Снижается до минимума концентрация крупных коллоидных частиц. Оптимальная доза МЭК-1 составляет 0,005-0,02%. Продолжительность обработки: для белых столовых виноматериалов – 8, красных столовых – 16, крепких виноматериалов – 24 ч. Единый узел стабилизации виноматериалов против коллоидных помутнений включает: купаж виноматериалов, введение ЖКС, МЭК-1, экспозицию в течение 8-24 ч, введение оклеивающих веществ, осветление и снятие с осадка, обработку холодом или пастеризацию, фильтрацию и розлив продукта. При обработке МЭК-1 экстрактивность повышается на 0,3-0,6 г/л, сохраняется окраска красных вин. Вина, обработанные МЭК-1, сохраняют стабильность в течение года. Осветленные стабильные вина характеризуются унимодальным распределением частиц по размерам и низкими значениями дзета-потенциала.

Хорошие результаты при стабилизации соков и вин дают иммобилизованные препараты кислых протеаз — пепсина, кислой протеазы аспергиллов. При этом достигается расщепление белка на 80-95%. Основными продуктами гидролиза являются пептиды, что положительно влияет на полноту вкуса соков и вин.

Применение гидролаз весьма эффективно при переработке винограда, пораженного серой гнилью. Для осветления сусла из винограда со степенью поражения 20-30% использовали композицию Пектофетицина П10х и Амилоризина П20х в дозах соответственно 0,025% и 0,005% или 0,01% и 0,0025%. Эффект осветления сусла составил 2-3 раза, скорость фильтрации повысилась в 2,25-3 раза. Снизилось содержание токсинов: пестицидов на 62-71%, патулина на 78%, гистамина на 36-47%. При гидролизе биополимеров, с которыми ассоциированы токсины, последние переходят в свободное состояние, но имея низкую растворимость в воде, ресорбируются на взвешенной фракции. Удаление этой фракции в процессе фильтрации приводит к снижению содержания токсинов в сусле.

Большинство ферментативных способов стабилизации вин и соков от коллоидных помутнений основано на расщеплении полисахаридных и белковых, но не фенольных компонентов коллоидных частиц. Для гидролиза фенольной составляющей может быть использован фермент танназа, катализирующий расщепление сложноэфирной связи фенол-кислот с фенолами или углеводами. Препараты танназы производятся за рубежом,

где используются в виноделии и консервной промышленности. В нашей стране еще в 60-х годах была разработана и апробирована в промышленности технология танназы из культуры гриба *Asp. carbonarius*, но производство фермента отсутствует.

Для удаления фенолов из виноматериалов используют флокулянты, сорбенты, фильтрующие материалы. При этом связываются полимерные формы фенольных соединений и их комплексы с белками и полисахаридами. Мономерные формы фенолов сохраняются в растворе и с течением времени подвергаются окислению и конденсации, что служит источником помутнений. Для удаления мономерных фенолов предложена обработка сусла ферментом монофенолмонооксигеназой, выделенной из культуры гриба вешенки. Окисление монофенолов происходит за счет растворенного кислорода, поэтому при обработке сусло постоянно перемешивают. Продолжительность обработки 0,5-1 ч, доза фермента -50-150 ед/л (за единицу активности принято количество фермента, катализирующее связывание кислорода со скоростью 1 мкмоль/мин). При обработке прессового сусла окисляется 60% монофенолов. Провоцирование окисления монофенолов приводит к их конденсации и образованию комплексов с другими коллоидами сусла. Эти комплексы удаляются после обработки сорбентами и сепарации. Осветленное сусло пригодно для получения качественных соко- и виноматериалов. Ферментативная обработка прессовых фракций сусла не только повышает коллоидную стабильность, но также облагораживает вкус напитков.

В последние десятилетия получили развитие исследования биокаталитических систем винных дрожжей и их роли в процессе формирования качества вин.

При производстве шампанских вин широко применяется выдержка виноматериалов на дрожжевых осадках с целью обогащения продуктами автолиза дрожжей. При этом повышается общее содержание азотистых веществ, содержание аминокислот, витаминов, ферментов, поверхностно активных веществ, улучшаются игристые и пенистые свойства. Автолиз дрожжей сопровождается снижением кислотности, окислительного потенциала биомассы и контактирующих виноматериалов. Для интенсификации массообменных процессов обогащение проводят в потоке, пропуская виноматериалы через слой дрожжей, иммобилизованных на пемзе. Такой вариант обработки позволяет одновременно с обогащением осветлять виноматериалы и повышать степень выбраживания остаточного сахара.

Существенный вклад в технологию высококачественных вин дает селекция дрожжей по признаку активности гидролитических ферментов. Использование рас *S. vini* Кокур 3 и Кокур 3-28б, обладающих высокой активностью внеклеточной эндополигалактуроназы, позволило снизить содержание пектина на 50% при сбраживании сусла белых сортов винограда. Количество высокомолекулярной фракции пектина, вызывающей коллоидные помутнения вин, сократилось в виноматериалах сорта Алиготе на 42-54%, сорта Рислинг - на 32-36%. В виноматериалах из сортов Каберне-Совиньон, Алиготе и Пино черный содержание приведенного экстракта повысилось соответственно на 59, 11 и 40%. Отмечено увеличение полноты вкуса.

Дрожжи рас Кокур 3 и Кокур 3-28б использовали при получении виноматериалов для портвейна белого Алушта. Разводки культур вносили в сульфитированное пресловое сусло из смеси белых сортов винограда. После частичного сбраживания (до 9% сахара) и спиртования до 18% об. виноматериалы обрабатывали препаратом Вильзим АК Г20х в дозе 0,005% с целью гидролиза нейтральных полисахаридов. После термообработки и заключительных процедур осветления получены виноматериалы, не содержащие полимерных форм пектиновых веществ (тест на пектиновые вещества отрицательный). Расход бентонита сокращен в 3-4 раза, желатина в 2-2,5 раза по сравнению с вариантом, где использована раса дрожжей Феодосия 1-19 и виноматериалы не обрабатывались ферментным препаратом. Стабильность портвейна повышена с 1,5 до 6 месяцев.

При исследовании динамики активности внеклеточных гидролаз винных дрожжей установлено, что секреция β -фруктофуранозидазы, протеиназы, полигалактуроназы и пектинэстеразы коррелирует с активностью липазы. Понижение температуры брожения вызывает увеличение как липазной активности, так и активности других гидролаз. Повышение секреции протеиназы и пектолитических ферментов можно вызвать внесением в сусло экзогенной липазы. Эффект липазы объясняют регуляцией синтеза секретлируемых ферментов на уровне проницаемости мембраны. Аналогично влияют ненасыщенные жирные кислоты, увеличивающие подвижность мембраны, тогда как насыщенные жирные кислоты ингибируют синтез гидролаз.

Выявление роли липаз как фактора регуляции ферментативной активности дрожжей привело к созданию технологии двухступенчатого брожения. На первой ступени дрожжи культивируют непрерывно в экспоненциальной фазе при скорости протока 0,15-0,2 ч⁻¹. Вторая ступень проходит при пониженной температуре, на 8-10° С ниже обычного режима периодического процесса. Клетки переходят в длительную стационарную фазу, в течение которой сбраживается основная часть углеводов сусла – 75-80%. Низкотемпературное брожение позволяет повысить активность гидролаз на второй ступени в 2-4 раза и сохранить ее значительно дольше, чем при периодическом процессе. Вина, полученные по двухступенчатой схеме, характеризуются глубокой трансформацией белка. Содержание белка составляет всего 5 мг/л, тогда как аминокислот – 50 мг/л. Белок представлен в основном низкомолекулярной фракцией 2-7 кДа. Степень гидролиза пектиновых веществ составляет 90%. Вина сохраняют стабильность в течение года без дополнительной ферментативной обработки.

5. БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХИТИНА

Хитин — близкий по структуре и функциям к целлюлозе полисахарид. Входит в состав гибких внутренних частей наружных скелетов членистоногих, клеточных стенок эукариотных микроорганизмов (грибов). Хитин отличается от целлюлозы лишь тем, что одна из групп —ОН в его молекуле заменена группой —NHCOCH₃ (при втором

углеродном атоме). Клеточные стенки, содержащие хитин, более устойчивы к действию микроорганизмов, что особенно важно для грибов, распространяющих мицелий по поверхности субстрата. Так как хитин непроницаем, питательные вещества среды не могут быть поглощены микроорганизмами и попасть внутрь мицелия, и гриб вынужден выделять ферменты, которые гидролизуют их, чтобы затем усвоить продукты разложения. Эти процессы уже используются в биотехнологии, например при получении антибиотиков, и, несомненно, имеют большую перспективу.

В валовом составе клеточных стенок грибов преобладают полисахариды, составляющие не менее половины сухой массы стенок, а у мицелиальных форм - до 98%. Важнейшими представителями этой группы соединений являются глюкан, маннан, хитин и целлюлоза.

Для дрожжей характерно наличие глюкана и маннана, которые могут составлять в сумме 70-90% сухой массы стенки. Хитин в клеточной стенке дрожжей обычно присутствует в количестве 1-3%, иногда более. Для мицелиальных форм грибов приводят величины содержания хитина 10-26%, в старом мицелии может быть 40-60% этого компонента. У муковых грибов находят родственное хитину соединение - хитозан, в количестве 10-30% сухой массы стенки.

Ригидную основу стенок дрожжей и мицелиальных грибов составляют пары полисахаридов, характерные для определенных таксономических групп. У аспергиллов эта пара – хитин- β -глюкан, у дрожжей р.р. *Saccharomyces* и *Candida* — маннан- β -глюкан, у муков — хитин-хитозан и т. д.

По содержанию белка дрожжевые и мицелиальные формы грибов не имеют заметных отличий, но количество липидов выше у мицелиальных грибов. Помимо перечисленных групп соединений, стенки грибов могут содержать пигменты, в частности, меланин, присутствие которого существенно повышает устойчивость к действию литических ферментов.

Наиболее распространенным полимером в клеточных стенках грибов является глюкан, он встречается как в качестве ригидного компонента (микрофибриллярная форма), так и в качестве матричного полимера.

Глюканы грибов содержат остатки D-глюкозы, соединенные β -1,2, β -1,3, β -1,6 или α -1,3-гликозидными связями. В одном β -связанном полимере могут встречаться два или три типа связи.

В стенках одного вида гриба могут присутствовать одновременно глюканы α - и β -типа. У диморфных грибов при переходе в мицелиальную форму возрастает доля β -глюкана, в дрожжевую - доля α -глюкана.

На основании растворимости глюканы делят на щелочерастворимые и щелоченерастворимые. Нерастворимые формы глюкана, среди которых встречаются неразветвленные линейные полимеры (линейный β -1,3-глюкан), склонны к образованию микрофибриллярных структур и входят в состав ригидных полимеров стенки. Разветвленные щелочерастворимые глюканы - компоненты матрикса.

Щелочерастворимый глюкан пекарских дрожжей и различных видов *Candida* представляет собой полимер, содержащий преимущественно β -1,3- и β -1,6-связи. В глюкане пекарских дрожжей преобладает первый тип связи (80-95%), связи второго типа составляют 8-12%. Для различных образцов полимера найдена молекулярная масса в пределах 220-290 кДа. Количество щелочерастворимого глюкана в стенках пекарских дрожжей составляет около 20% массы.

Для стенок аскомицетов и базидиомицетов характерно присутствие щелоченерастворимого глюкана, он гетерогенен. У пекарских дрожжей основной компонент этого полимера, составляющий около 85%, представлен разветвленным β -1,3-глюканом молекулярной массы около 240 кДа, со степенью полимеризации примерно 1500. В местах ветвления - связи типа β -1,6, составляющие около 3% гликозидных связей. Минорный компонент нерастворимого глюкана пекарских дрожжей - в высшей степени разветвленный β -1,6-глюкан со связями типа β -1,3 в точках ветвления, степень полимеризации глюкана 130-140 глюкозных единиц.

В стенках грибов глюканы существуют как самостоятельные структурные полимеры, а также в виде комплексов с хитином. В стенках *Asp. alliaceus* β -глюкан-хитиновый комплекс составляет половину сухой массы. Нерастворимый полисахаридный остов стенки *Candida guilliermondii* представляет собой глюкан-хитиновый комплекс, содержащий 35% N-ацетилглюкозамина (мономер хитина).

Маннан входит в число главных полисахаридных компонентов клеточной стенки дрожжей – *Candida*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* и др. В стенках дрожжей маннан присутствует в комплексе с белком. Маннопротеиновый комплекс часто сокращенно называют маннаном. Маннопротеин составляет наружную часть клеточной стенки дрожжей и считается ее матриксным компонентом, Маннан, входящий в состав маннопротеина, представляет собой разветвленный гетерополисахарид, состоявший из остатков D-маннозы и N-ацетилглюкозамина. Остатки маннозы соединены α -гликозидными связями, в некоторых маннанах присутствует небольшое количество (3-связанной маннозы. Часть остатков маннозы фосфорилирована. Остатки АГА присоединены β -связью.

Маннан пекарских дрожжей - гетерогенный полимер, свыше 80% составляет фракция 94 кДа. В составе полисахаридной части маннана выделяют внешнюю цепь, внутренний кор и щелочелабильные олигосахариды. Остатки маннозы связаны в основной цепи α -1,6-гликозидной связью, во внешней цепи и внутреннем коре – α -1,2 и α -1,3-связью. Щелочелабильные олигосахариды связаны с белком O-гликозидной связью через остатки треонина или серина. Белковая часть маннопротеина пекарских дрожжей может составлять от 1,5 до 50%.

Хитин находят в клеточных стенках большинства грибов, где он играет роль опорного и формирующего элемента. У мицелиальных форм хитин составляет внутреннюю часть клеточной стенки, ее микрофибриллярный слой. У дрожжевых форм грибов хитин сосредоточен преимущественно в зоне почечных рубцов.

Хитин – это β -1,4-связанный линейный полимер N-ацетилглюкозамина. Природный хитин ацетилирован не полностью, некоторые мономерные единицы представлены глюкозамином. В отличие от большинства природных полисахаридов хитин имеет щелочные свойства, определяемые присутствием амидных и аминных групп. Хитин относится к числу полимеров, трудно растворимых и слабо набухающих в воде. Хитин – природный хелат, способный связывать ионы двухвалентных металлов, что играет определяющую роль в их поглощении грибами из внешней среды.

В стенках грибов хитин содержится в различных количествах, в зависимости от таксономической принадлежности, морфологических особенностей и физиологического состояния. У аспергиллов он составляет 7-24% сухой массы стенки, у пенициллов - до 5,5%. У диморфных грибов при переходе из дрожжевой в мицелиальную форму количество хитина возрастает, у *Candida albicans* — в 2—3 раза. Количество хитина повышается по мере старения культур, у мицелиальных грибов - за счет утолщения микрофибриллярного слоя, а у дрожжевых, где хитин локализуется в почечных рубцах, за счет увеличения их числа.

В стенках дрожжей и мицелиальных грибов хитин встречается в виде комплексов с α - и β -глюканами, белками, пигментами, с которыми может быть связан с помощью ковалентных или ионных связей. Около половины массы стенок *Asp. niger* составляет щелоченерастворимый комплекс α -глюкана с хитином. В почечных рубцах пекарских дрожжей находят хитин в комплексе с щелоченерастворимым β -1,6-глюканом.

Хитин может образовывать прочные комплексы с меланиновыми пигментами грибов, такие комплексы найдены у *Agaricus bisporus*, *A. campestris*, *Asp. nidulans*, *Verticillium dahliae*. Хитин-меланиновые комплексы выполняют функцию антилизисного компонента, предохраняющего стенки грибов от биodeградации в природных условиях.

В стенках мицелия мукооровых грибов содержится хитозан – частично деацетилированный хитин, в количестве до 30%. Хитозан является матричным компонентом клеточных стенок грибов. Хитозан можно получить из хитина путем обработки концентрированными щелочами при высокой температуре, вызывающей деацетилирование.

Пигменты в стенках грибов представлены каротиноидами и меланинами. Особое значение имеют меланины, влияющие на чувствительность грибов к литическим ферментам, УФ-лучам и другим внешним факторам.

Меланины – сложные соединения гетероциклической природы, относящиеся к числу полимеров с полисопряженными двойными связями.

За исключением аспергиллина, меланины не растворяются в воде, но растворимы в щелочах, ограниченно растворимы в спирте и ацетоне. В клетках грибов меланины присутствуют не как индивидуальные вещества, а как группы соединений различной молекулярной массы. Из *Asp. nidulans* выделены фракции меланинов молекулярной массы 2000; 350 и 2,9 кДа.

Меланины локализуются как в цитоплазме, так и в поверхностных структурах грибов. Меланин обычно накапливается по мере старения культур, соответственно увеличивается толщина его слоев в клеточных стенках. Количество меланина составляет от 2 до 18% к массе мицелия.

Меланины играют очень важную роль в устойчивости грибов к биодegradации. На примерах различных видов аспергиллов, а также *Sclerotium rolfisii* показана повышенная устойчивость пигментированного мицелия к литическим ферментам, по сравнению с беспигментным мицелием. Длительную сохранность в почве конидий и других репродуктивных форм грибов связывают с наличием в них меланина.

В стенках дрожжей и мицелиальных грибов выделяют матрикс и микрофибриллярный ригидный слой. Последний непосредственно граничит с цитоплазматической мембраной. Матриксные компоненты составляют внешний слой стенки, они же заполняют пространство между микрофибриллами внутреннего слоя. По характеру расположения ригидных и матриксных компонентов стенки дрожжей и грибов сходны со стенками грамположительных бактерий, где все структурные элементы составляют единое целое и нет деления на отдельные слои.

У дрожжевых форм ригидный микрофибриллярный слой представлен щелоченерастворимым глюканом, основным элементом матрикса является маннопротеин.

Внешняя часть стенки образована маннопротеином, отдельные полимерные цепи которого соединены дисульфидными, тиоэфирными связями или удерживаются в единой структуре силами гидрофобного взаимодействия. Маннопротеин проникает в глюкаиовый слой, отдельные молекулы маннопротеина соединяются с глюканом ковалентными связями, что создает единую структуру стенки. Хитин локализуется в основном в зонах почечных рубцов (более 90%), незначительная доля (около 7%) распределена в латеральных стенках. И в почечных рубцах, и в латеральных стенках хитин связан с (β -1,6-глюканом. В рубце хитин сверху прикрыт β -1,3-глюканом. Хитин-связанные глюканы относятся к щелоченерастворимым.

Основные элементы стенки *Candida utilis* – микрофибриллы глюкана и маннановый матрикс. Непосредственно к цитоплазматической мембране прилегает белковый слой, далее следуют глюкановые волокна мелкосетчатой текстуры, покрытые слоем гомогенного, неструктурированного маннана. Наружная поверхность стенки представлена слоем липопротеидов, одета полисахаридной капсулой.

Липиды, локализующиеся на поверхности дрожжевых клеточных стенок и придающие им гидрофобные свойства, оказывают отрицательное влияние на скорость ферментативного лизиса. Гидрофобизация стенки наблюдается при пленочном росте, и у дрожжей сахаромикетов связана с появлением на поверхности стенки свободных жирных кислот, в основном, пальмитиновой и олеиновой. Свободные жирные кислоты можно удалить мягкой щелочной обработкой.

Стенка мицелиальных грибов в качестве ригидного компонента обычно содержит хитин, у некоторых грибов - целлюлозу или ее комплекс с хитином. Матричные компоненты представлены белком, глюканом, маннаном, пигментами.

Клеточная стенка мицелиальных грибов имеет слоистую структуру, однако слои разделяются нечетко. Внутренняя поверхность стенки представлена микрофибриллами ригидного компонента, проникающего в направлении наружу в матричные элементы. Внешняя поверхность может быть покрыта слизью. Интактная стенка имеет толщину 100 ± 27 нм. Поверхность гифы покрыта водорастворимой, слабоорганизованной слизью, лежащей на стенке. За слоем слизи следует щелочерастворимый глюкан (около 14% массы стенки) и далее вглубь - микрофибриллы хитина, погруженные в щелоченерастворимый β -1,3-глюкан (содержание хитина и нерастворимого глюкана соответственно 43 и 27%). Во всей толще стенки распределены молекулы цистеинсодержащего белка. Слой щелочерастворимого глюкана переходит в слой щелоченерастворимого глюкана и хитина и составляет с ним единое структурное целое, степень организованности и компактности которого возрастает по мере удаления от поверхности гифы. Внутренняя хитиновая поверхность стенки гладкая, компактная, имеет фибриллярную структуру.

В стенке *Schizophyllum commune* выделяют четыре слоя: наружный аморфный слой щелочерастворимого α -1,3-глюкана, слой аморфного β -1,3-1,6-глюкана, далее внутрь дискретный слой белка и слой микрофибрилл хитина, погруженных в белковый матрикс.

Для мукоровых грибов характерна монолитная стенка, которая ни по составу, ни по структурной организации не делится на слои. Примером служит стенка *Rhizopus delemar*. Она представляет собой единое структурное целое, состоящее из микрофибрилл хитина, цементированных хитозаном и белком или пептидами, мозаично рассеянными в толще стенки. Сходная структура стенок у *Mucor rouxii*.

Для лизиса клеточных стенок дрожжей, содержащих α -глюкан, необходимы ферментативные комплексы с α -глюканазной активностью. Этим объясняется неэффективность препаратов β -глюканазы и ее комплексов с протеазой в применении к дрожжам р. р. *Cryptococcus* и *Schizosaccharomyces*.

Чувствительность клеточных стенок дрожжей к литическим ферментам зависит от возраста культуры. В большинстве случаев дрожжи, как и бактерии, более подвержены лизису в ранних фазах роста, в стационарной фазе дрожжевые клетки приобретают устойчивость к литическим ферментам.

Основными ферментами, участвующими в лизисе клеточных стенок мицелиальных грибов, являются хитиназа и глюканаза. Хитин – основа ригидного слоя стенок многих мицелиальных грибов, и в ряде случаев хитиназа как индивидуальный фермент может вызывать их лизис. Действие хитиназы усиливает ее сочетание с протеазами и глюканазами, гидролизующими матричные компоненты клеточных стенок, что облегчает доступ хитиназы к субстрату. Комплекс хитиназ с протеазой полностью лизирует стенки *Rhizopus delemar*, на примере стенок *Neurospora crassa* показан синергизм действия

хитиназы и β -глюканазы. Лизис стенок *Agaricus bisporus* достигается с помощью комплекса хитиназы с β -1,3- и β -1,6-глюканазами.

Некоторые глюканазы имеют самостоятельное миколитическое действие. Это экзо- β -1,3-глюканаза *Candida utilis*, эндо- β -1,3-глюканаза *V. circulans* WL-12.

Комплекс ферментов, достаточный для лизиса различных видов дрожжевых и мицелиальных грибов, должен включать α -1,3; β -1,3; β -1,6-глюканазы, протеазу и хитиназу. Достаточно сильным является сочетание β -1,3-глюканазы, хитиназы и протеазы.

В природе довольно часто встречаются микроорганизмы, синтезирующие полный комплекс названных ферментов. Это микопаразитарные грибы, живущие на плодовых телах грибов - различные виды р.р. *Cladobotryum*, *Hyromyces*, *Trichoderma* и др. Большинство актиномицетов синтезируют внеклеточные протеазы и хитиназы, многие также глюканазу. Из культуральной жидкости *Act. cinerosus* и *Act. griseinus* выделены ферментные препараты с активностью трех перечисленных ферментов, обладающие широким спектром дрожже- и миколитического действия.

Рассматривая проблему ферментативного лизиса дрожжей и мицелиальных грибов, мы сознательно акцентируем внимание на применении ферментативных комплексов, а не индивидуальных ферментов. У дрожжей и мицелиальных грибов наблюдаются большие колебания количественного и качественного составов клеточных стенок в зависимости от возраста культуры и условий ее выращивания, и для их лизиса целесообразно конструировать такие ферментативные комплексы, которые соответствуют возможным изменениям состава субстрата.

Рассмотрим свойства важнейших групп ферментов, участвующих в лизисе дрожжей и мицелиальных грибов.

Глюканазы очень широко представлены в живой природе, их находят у микроорганизмов, низших и высших растений, низших животных. Разнообразие природных глюканов соответствует множество типов глюканаз. Глюканазы литического действия принадлежат к α -1,3, β -1,3, β -1,3-1,6 и β -1,6-типам.

Активность глюканаз определяют, используя соответствующие виды природных глюканов: псевдонигеран (линейный α -1,3-глюкан с небольшим количеством точек ветвления в поз. α -1,4), нерастворимый в воде ламинарин и растворимый в горячей воде пахиман (линейные β -1,3-глюканы с небольшим количеством точек ветвления в поз. 1,6), ячменный глюкан и лихенин (глюканы смешанного типа β -1,3-1,4), пустулан (О-ацетилированный β -1,6-глюкан) и др.

Глюканазы α -1,3-типа найдены у *Asp. nidulam*, *V. circulans* WL-12, *Cladosporium resinae*, *T. viride*, они входят в комплексы литических ферментов грибов-микопаразитов. Из культуральной жидкости *T. viride* выделена эндо- α -1,3-глюканаза, гидролизующая различные α -глюканы грибов и лишайников, олигосахариды нигерана с образованием глюкозы и нигерозы.

Среди бактерий широко распространена способность синтезировать β -глюканазы различного типа. Наиболее активные продуценты β -1,3-глюканазы встречаются среди

видов *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. thuringiensis*.

Ферменты с прямым дрожжелитическим действием чаще всего встречаются в большой группе внеклеточных эндо- β -1,3-глюканаз. Микроорганизмы могут синтезировать до шести глюканаз этого типа, как, например, *B. circulans* WL-12. Эндо- β -1,3-глюканазы, способные лизировать живые клетки дрожжей, продуцируют *Arthrobacter luteus*, *B. circulans*, *Flavobact. dormitator*, *Oerskovia xanthyneolytica* и *Rhizopus chinensis*. Из культуры *Arthrobacter luteus* получают препарат Зимолиазы, который используется в качестве дрожжелитического агента.

Внеклеточные глюканазы микроорганизмов имеют ряд общих свойств. Большинство глюканаз имеет молекулярную массу в пределах 20-40 кДа, оптимум действия в интервалах pH 4-7 к температуры 30-50° С. Глюканазы стабильны в слабокислой и нейтральной среде, исключение составляет эндо- β -1,3-глюканаза *Arthrobacter luteus*, стабильная в зоне pH 4,5-11. Многие глюканазы ингибируются тяжелыми металлами и реагентами, связывающими сульфгидрильные группы.

Глюканазы входят в комплекс автолитических ферментов многих дрожжей. Преимущественные типы внутриклеточных глюканаз дрожжей - экзо- β -1,3-1,6 и эндо- β -1,3. Наиболее распространена первая из них, найденная в клетках *S. utilis*, *Cryptococcus albidus*, *H. wingei*, различных видов р. р. *Kloeckera* и *Saccharomyces*, а также у *Pichia polymorpha*. Неспецифическая глюканаза гидролизует как ламинарии, так и пустулан с образованием глюкозы.

Глюканазы эндо- β -1,3-типа найдены в клеточных стенках *S. utilis*, *Cytophaga johnsonii*, *H. anomala*, *Kluuyveromyces fragilis*, *P. pastoris*, различных видов сахаромицетов, в клеточных экстрактах дрожжей р. р. *Cryptococcus* и *Rhodotorula*. При гидролизе ламинарина этими ферментами образуются ламинарисахариды и глюкоза.

У некоторых дрожжей (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*) в клеточных стенках обнаруживают α -1,3-глюканазы. У *Rhodotorula* этот фермент нельзя отнести к автолитическим, поскольку в стенках этих дрожжей нет α -глюкана.

Все внутриклеточные глюканазы имеют оптимум действия при pH 5-6 и температуре не выше 50° С, что определяется условиями их функционирования в живой клетке.

Хитиназы и хитозаназы привлекают большое внимание исследователей как ферменты кругооборота хитина у микроорганизмов, а также с точки зрения использования при гидролизе природного хитина.

Проблема утилизации хитина морских ракообразных представляется практически значимой в связи с ростом добычи продуктов моря. Это вызвало поиск продуцентов хитиназы среди микроорганизмов. Способность синтезировать хитиназу присуща многим актиномицетам (р. р. *Actinomyces*, *Streptomyces*), различным видам бацилл, *Achromobacter liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Mycobacter AL-1* и др.

Миколитическая способность исследована у хитиназ, продуцируемых *Bacillus R-4*, *Mycobacter AL-1*, *Streptomyces sp. 6*, *Str. orientalis*. Комплекс литической протеазы и хитозаназы, продуцируемый *Bacillus R-4*, обладает сильным литическим действием на клеточные стенки *R. delemar*. Оба составляющих фермента проявляют самостоятельную миколитическую способность. Хитозаназа - фермент с молекулярной массой 31 кДа и оптимумом действия на гликольхитозан и клеточные стенки *Rhizopus* при pH 6,5 и температуре 40° С, стабилен в зоне pH 4,5-7,5, ингибируется ионами тяжелых металлов и окислителями, активируется ЭДТА.

Ферментный комплекс *Streptomyces sp. 6*, включающий хитозаназу, лизирует клеточные стенки гиф и спор муковок грибов. Очищенная хитозаназа - фермент 26-29 кДа, с оптимумом при pH 4,5-6,5 и температуре 60° С, быстро лизирует прорастающие споры различных видов муковок, что приводит к их гибели.

Среди внеклеточных ферментов миксобактера обнаружен фермент, обладающий хитозаназной и β -1,4-глюканизной активностью. Для гидролиза хитозана оптимальны pH 6,8 и температура 70° С. Очищенный фермент катализирует освобождение редуцирующих Сахаров из стенок грибов р. *Rhizopus*, из *Asp. niger*, *Geotrichum candidum*, *T. viride*.

Литические протеазы микроорганизмов и протеазы общего типа участвуют в ферментативном лизисе дрожжей и мицелиальных грибов как индивидуальные ферменты, способные вызвать деградацию клеточной стенки, и как необходимые предшественники для проявления литической активности глюканиз и хитиназ.

Многие микроорганизмы синтезируют ферментативные комплексы, включающие протеазы дрожжелитического и миколитического действия. В состав комплексного препарата Зимолиазы входит протеаза Зимолиаза В), под действием которой из клеточных стенок пивных дрожжей освобождается макромолекулярный маннопротеин 180 кДа, активность протеазы проявляется в зоне pH 7-12. Щелочная протеаза, способная лизировать клеточные стенки дрожжей *S. utilis*, входит совместно с β -1,3-глюканизой в комплекс ферментов, продуцируемых *Micropolyspora sp. 434*. Протеаза имеет молекулярную массу 25-30 кДа, ингибируется тяжелыми металлами и ПХМБ. Комплекс щелочной протеазы и глюканизы наиболее активен при pH 6-8.

В литическом комплексе *Bacillus R-4* наряду с хитозаназой обнаружена протеаза, способная как индивидуальный фермент лизировать клеточные стенки грибов р. *Rhizopus*. Фермент молекулярной массы 19 кДа активен при pH 7-7,8, стабилен при pH 7-9. Протеаза *Bacillus R-4* - фермент широкой протеолитической специфичности, расщепляет более 40% пептидных связей в желатине, гемоглобине, протамине, гидролизует различные растительные и животные белки. При равной протеолитической активности ни один из коммерческих препаратов протеаз (Биопраза, Майлзим, Проназа, кристаллическая нейтральная протеаза *B. subtilis*) не проявляет способности лизировать клеточные стенки *R. delemar*, как протеаза R-4. Предельная степень лизиса стенок гриба составляет около 60%, а при сочетании с хитозаназой того же штамма - 80%.

Культура *Oerskovia* sp. СК продуцирует две глюканызы и протеазу молекулярной массы 12 кДа, активную в нейтральной и слабощелочной среде. Протеаза расщепляет животные и растительные белки и активно лизирует клетки пекарских дрожжей (степень лизиса 61%). Проявляет синергизм при сочетании с гомологичными глюканызами.

Протеазы общего типа, не обладающие самостоятельной литической активностью, могут использоваться для предобработки клеточных стенок дрожжей, придающей им чувствительность к действию глюканыз и хитиназ низкой литической способности. Это показано на примерах лизиса дрожжей р.р. *Rhodotorula* и *Sporobolomyces*.

6. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Ферментная промышленность выпускает препараты различной степени концентрирования и очистки. Многие виды отечественных ферментных препаратов имеют названия и индексы, несущие информацию о продуценте фермента, основной активности и способе выделения препарата. Название таких препаратов состоит из двух частей: первая соответствует виду основной активности, вторая – видовому названию продуцента. Например, Амилосубтилин — это препарат α -амилазы из культуры *B. subtilis*, Глюкаваморин – препарат глюкоамилазы из *Asp. awamori*, Целловиридин - препарат целлюлазы из *T. viride*.

Препараты, выделенные из глубинной культуры, имеют в индексе букву «Г» (глубинный), из твердофазной - «П» (поверхностный). Далее следует цифровой индекс, который характеризует степень концентрирования фермента в препарате по отношению к культуральной жидкости или твердофазной культуре. Так препараты с индексом Г3х должны иметь активность в ед/г в 3 раза выше, чем средняя активность культуральной жидкости в ед/мл. Устанавливается стандартная активность препарата, соответствующая этому соотношению. Стандартная активность, как правило, не изменяется в течение многих лет. В то же время активность продуцентов изменяется в процессе селекции, совершенствуется технология культивирования. В результате индекс концентрирования снижается по сравнению с исходным. Часто выпускают несколько сортов препарата с одним индексом и разной активностью. Цены на препараты устанавливают пропорционально величине основной активности. Каждая партия ферментного препарата сопровождается сертификатом, где указана активность. Препараты, содержащие комплекс ферментов, где важно соотношение компонентов комплекса, характеризуются по двум или более видам активности. При этом цена устанавливается в соответствии с основной активностью, обычно являющейся интегральной. Для препаратов целлюлаз это активность, определяемая по действию на фильтровальную бумагу (так называемая активность АФБ), для пектиназ — общая пектолитическая.

Наряду с препаратами, имеющими буквенно-цифровую индексацию, распространены препараты с тривиальными названиями, в которых отражены основной вид активности, величина активности, название фирмы и т.д.

Индексом Гх обозначается неочищенная культуральная жидкость продуцента фермента. Препараты Гх используются преимущественно на месте выработки. Так, в спиртовом производстве применяют культуральную жидкость продуцентов амилолитических и целлюлолитических ферментов, получаемую в ферментных цехах спиртзаводов. При добавлении консервантов препараты Гх можно транспортировать на значительные расстояния даже в летний период.

В пищевых производствах препараты Гх пригодны лишь в технологических процессах, где исключено попадание препарата в готовый продукт, например, при производстве спирта, где ферментные препараты удаляются из продукта в процессах отгонки и ректификации.

Препараты с индексом ГЗх получают путем распылительной сушки концентрированной культуральной жидкости. Концентрирование проводится методом вакуум-выпаривания при температуре, не вызывающей инактивации ферментов (обычно не выше 30° С). При необходимости перед упариванием в культуральную жидкость добавляют стабилизаторы и регулируют величину рН, поскольку в процессе концентрирования стабилизирующие компоненты могут переходить в нерастворимое состояние, а рН сдвигается из-за изменения концентрации и соотношения растворенных электролитов. По окончании концентрирования в концентрат культуральной жидкости вносят соли-наполнители в количестве не менее 100% к массе сухих веществ концентрата, с целью снижения механических потерь при сушке. Сушку проводят при температуре на входе в сушилку до 140° С, на выходе - до 70° С. Распыляемый продукт подвергается воздействию высокой температуры в течение долей секунды, но этого достаточно для частичной термоинактивации ферментов. Для снижения величины потерь ферментативной активности в концентрат добавляют агенты, повышающие термостабильность ферментов.

В качестве соли-наполнителя обычно используют поваренную соль. Количество соли рассчитывают исходя из активности фермента в культуральной жидкости, стандартной активности препарата и средней величины потери активности по термоинактивации при сушке. Высушенный препарат при необходимости стандартизуют той же солью или иными наполнителями.

Препараты с индексом ГЗх являются неочищенными. Они имеют высокую степень микробной обсемененности, порядка 10^{10} спор или клеток в 1 г. Это ограничивает сферу применения. В пищевой промышленности препараты ГЗх используются в тех же технологиях, что и Гх. В сельском хозяйстве препараты ГЗх широко применяются для обработки кормов с целью повышения их усвояемости. В микробиологической промышленности препараты ГЗх используют для гидролиза компонентов питательных сред, а также при получении белковых препаратов из биомассы микроорганизмов.

Индекс ГЗх-Ф присвоен препаратам, которые получают путем распылительной сушки концентрированного фильтрата культуральной жидкости. Препараты ГЗх-Ф являются частично очищенными, так как при фильтрации из культуральной жидкости

удаляется биомасса и часть балластных веществ. Активность препаратов ГЗх-Ф выше, чем ГЗх. В пищевой промышленности препараты ГЗх-Ф используют наряду с более чистыми - Г10х.

Индекс Г10х имеют препараты, полученные путем осаждения органическими растворителями из концентрированных фильтратов культуральной жидкости. Перед фильтрацией культуральную жидкость обрабатывают минеральными или органическими коагулянтами, что позволяет в процессе разделения фаз освободить фильтрат от биомассы микроорганизмов, балластных белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот. Фильтрат концентрируют вакуум-выпариванием, добавляя при необходимости стабилизирующие агенты. Из концентрированного фильтрата ферменты осаждают каким-либо органическим растворителем или смесью растворителей (этанолом, изопропанолом, их смесью, ацетоном и др.). Выбор растворителя зависит от физико-химических свойств фермента, определяющих полноту осаждения ферментного белка и сохранение его активности в осадке. В процессе осаждения происходит фракционирование белков ввиду различия в величине молекулярной массы, изоэлектрической точки, гидрофильности. В осадок не переходят низкомолекулярные органические вещества (олигосахариды, аминокислоты и низшие пептиды, низкомолекулярные фракции пигментов). Ферментный осадок отделяют от жидкой фазы и высушивают в вакуумной или распылительной сушилке. В первом случае высушенный продукт измельчают. Сухие препараты стандартизуют, добавляя наполнители (соли, крахмал, муку и пр.). Вид наполнителя определяется целевым назначением препарата.

Препараты Г10х имеют значительно более высокую чистоту, чем Гх, ГЗх, ГЗх-Ф. Это выражается как в активности ферментов на 1 г препарата, так и в удельной активности на 1 мг белка. Микробная обсемененность препаратов Г10х регламентируется на уровне 10^4 — 10^5 спор или клеток в 1 г. Этот показатель зависит в основном от качества фильтрации и выдерживается далеко не всегда.

По составу ферментативного комплекса препараты Г10х существенно отличаются от культуральной жидкости. Технологический процесс выделения препаратов Г10х оптимизируется по величине выхода и степени очистки основного фермента (или ферментов), тогда как сопутствующие ферменты в различной степени отделяются от основного на стадиях предварительной очистки культуральной жидкости, ее фильтрации и осаждения ферментов органическими растворителями. Некоторые технологии препаратов Г10х включают стадии инактивации сопутствующих ферментов, например, путем изменения рН среды.

Область применения препаратов Г10х охватывает различные пищевые производства, отрасли легкой и химической промышленности, кормопроизводство, ветеринарию. При использовании препаратов для переработки растительного сырья в пищевые продукты и напитки следует придерживаться дозировок, разрешенных органами санитарного надзора, во избежание нежелательных последствий воздействия повышенных концентраций препаратов на человеческий организм.

Препараты с индексом Г20х получают с применением ультрафильтрации - способа концентрирования, основанного на разделении веществ различной молекулярной массы с помощью полупроницаемых мембран с определенным размером пор. Ультрафильтрации подвергают предварительно очищенные ферментные растворы, свободные от клеток микроорганизмов и взвешенных частиц. Культуральную жидкость очищают и фильтруют так же, как при получении препаратов Г10х. Фильтрат дополнительно очищают с помощью стерилизующей фильтрации, после чего направляют на ультрафильтрацию. На стадии ультрафильтрации из ферментного раствора удаляются низкомолекулярные компоненты (соли, сахара, пигменты) и белки с эффективным радиусом молекул меньше радиуса пор мембраны. На стадии ультрафильтрации контролируют концентрацию компонентов, стабилизирующих ферменты, и при необходимости вводят стабилизаторы дополнительно в концентрируемый раствор.

Из ультраконцентратов получают жидкие и сухие формы ферментных препаратов. Жидкие формы стабилизируют консервантами, например, бензойной кислотой. Сухие формы получают путем распылительной сушки. Перед сушкой в концентрат вносят стабилизаторы и наполнители.

Препараты Г20х применяют при производстве пищевых продуктов и напитков, в кормопроизводстве, в составе лекарственных средств для лечения заболеваний, связанных с ферментной недостаточностью.

Препараты с индексом Пх представляют собой высушенные культуры грибов - продуцентов ферментов, полученные при твердофазном культивировании. Препараты Пх сохраняют полный ферментативный комплекс продуцентов. Они неочищены и имеют высокую микробную обсемененность. Применяются аналогично препаратами Г3х.

Препараты с индексами П10х и П25х получают из свежих или высушенных твердофазных культур грибов по следующей схеме: водная экстракция ферментов из культуры гриба, отделение экстракта, осаждение ферментов из экстракта этиловым или изопропиловым спиртом, отделение ферментного осадка, суспендирование осадка в воде, добавление к суспензии стабилизаторов и наполнителей, сушка суспензии распылением. Препараты П10х применяются аналогично П10х, П25х – аналогично Г20х.

Препараты с индексом П20х получают по схеме: экстракция ферментов из твердофазной культуры, стерилизующая фильтрация экстракта, ультрафильтрация, стандартизация и стабилизация ультраконцентрата, сушка его распылением. Препараты применяют аналогично Г20х.

Перечисленные виды ферментных препаратов относятся к так называемым растворимым, то есть к препаратам, активная часть которых растворяется в водной среде. По окончании ферментативной обработки субстрата растворимый препарат остается в реакционной среде и вторично не используется. Наряду с растворимыми выпускают также иммобилизованные ферменты. Иммобилизация - это включение объекта в изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна с ней обмениваться молекулами (субстратов, эффекторов).

Иммобилизованные ферменты получают путем связывания с носителями растворимых ферментов или клеток микроорганизмов, обладающих ферментативной активностью. Наиболее распространенные способы связывания - это сорбция на носителе, ковалентное связывание и включение в структуру гелей-носителей.

Иммобилизация приближает условия функционирования ферментов к природным. В природе большая часть ферментов ассоциирована со структурами живых организмов или элементами окружающей среды, что важно для проявления активности ферментов и их стабильности.

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ перед растворимыми при проведении процессов промышленного биокатализа. Иммобилизованные ферменты можно изъять из реакционной среды, что позволяет контролировать ход ферментативной реакции и многократно использовать ферментные препараты. Каталитический процесс можно проводить непрерывно, пропуская растворы субстратов через реакторы с иммобилизованными ферментами. Продукты реакции не загрязняются примесями ферментных препаратов. Иммобилизованные ферменты имеют высокую операционную стабильность, а их каталитические свойства можно модифицировать, изменяя способ связывания и вид носителя.

Применение иммобилизованных ферментов позволило решить задачу создания крупных промышленных биокаталитических процессов, с помощью которых производят аминокислоты, органические кислоты, сахара, органические растворители, метан, антибиотики, гормональные препараты, производят очистку сточных вод и водоемов, биоконверсию органических отходов.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеева Н. М. Научно-практические рекомендации по вопросам стабилизации вина. - Краснодар, 1999.-53 с.
2. Вакарчук Л. Т. Технология переработки винограда. - М: Агропром-издат, 1990.-271 с
3. Валуйко Г. Г., Зинченко В. И., Мехузла Н. А. Стабилизация виноградных вин. - Симферополь: Таврида, 1999. - 108 с.
4. Гаина Б. С. Энология и биотехнология продуктов переработки винограда. - Кишинев: Штиинца, 1999. - 267 с.
5. Кишковский З. Н., Мержаниан Н. А. Технология вина. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. - 504 с.
6. Книга о вине / Я. М. Ена, В. В. Ливчун, А. В. Соловьев, М. А. Чайковская. - Донецк: Донеччина, 1994. - 254 с.
7. Нилов В. И., Скурихин И. М. Химия виноделия. - М.: Пищевая промышленность, 1967. - 442 с.
8. Родопуло А. К. Основы биохимии виноделия. - М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. - 240 с.
9. Шольц Е. П., Пономарев В. Ф. Технология переработки винограда. -М: Агропромиздат, 1990. - 447 с.