

УДК 579.25:579.6:663.252

DOI 10.30679/2587-9847-2022-35-123-127

НОВЫЕ ШТАММЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ИЗОЛИРОВАННЫЕ НА СОРТЕ ПТИ МАНСАН, И ИХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ*

Лободина Е.В., аспирант, Аль-Накиб Е.А., аспирант,
Авакимян А.О., аспирант

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)

Реферат. Показаны результаты отбора, изоляции и молекулярно-генетической идентификации 25 автохтонных штаммов. Проведена оценка бродильной активности автохтонных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, изучена способность продуцирования сероводорода. Выделен штамм ПМ 7, перспективный для апробации в условиях микровиноделия.

Ключевые слова: дрожжи, *Saccharomyces cerevisiae*, ПЦР, ScHO-F/ScHO-R, бродильная активность, сероводород.

Summary. The article shows the results of selection, isolation and molecular genetic identification of 25 autochthonous strains. The fermentation activity of autochthonous strains of *Saccharomyces cerevisiae* was assessed, and the ability to produce hydrogen sulfide was studied. A strain PM 7 has been isolated, which is promising for approbation in the conditions of microwinemaking.

Key words: yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, PCR, ScHO-F/ScHO-R, fermentation activity, hydrogen sulfide.

Введение. Производство качественной винодельческой продукции зависит от многих факторов, таких как сорт винограда, зона и условия его выращивания и от технологий производства вина [1-6].

Ключевая роль в формировании органолептического профиля вина зависит от внесенного штамма дрожжей, метаболиты которого формируют вкусовые характеристики конечного продукта [7]. В настоящее время в технологии виноделия, в основном, используются коммерческие чистые культуры винных дрожжей, применение которых привело к значительному улучшению технологии производства вина и соответствующего конечного качества благодаря многочисленным преимуществам, в том числе устойчивости к критическим абиотическим факторам, таким как возможность быстрой и эффективной ферментации виноградного суслу с высокой концентрацией сахаров; высокому содержанию титруемых кислот виноградного суслу; отклонениям температуры; недостатку источников азота, повышенным концентрациям этанола и диоксида серы [8-11].

Несмотря на то, что коммерческие штаммы соответствуют технологическим требованиям и устойчивы к ряду абиотических факторов, производимые вина характеризуются отсутствием разнообразия в органолептическом профиле и отсутствием региональных особенностей [12, 13]. Для получения вин, имеющих региональную особенность используемого сорта винограда, была предложена идея применения автохтонных штаммов в процессе брожения. Многочисленные исследования в данном направлении показали актуальность и перспективу использования природных штаммов

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-316-90049

дрожжей для получения вин высокого качества и уникальными органолептическими характеристиками [14-21].

В своей работе исследовали бродильную активность автохтонных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, изолированных на винограде сорта Пти Мансан, пос. Таманский (Темрюкский район, Краснодарский край) в 2019 году.

Объекты и методы исследований. В качестве объектов исследований были использованы 25 штаммов винных дрожжей, выделенных с поверхности ягод винограда сорта Пти Мансан (пос. Таманский).

Изолирование проб винограда проводили в сухую погоду в период технической спелости ягод винограда. Образцы (грозди) общей массой около 2 кг помещали в стерильные пакеты и транспортировали в лабораторию. Затем в асептических условиях пробы винограда измельчали и затем полученное отфильтрованное сусло помещали в стерильную посуду с ватно-марлевой пробкой и сбраживали при температуре 20-23 °С. При сбраживании сахара 70 г/дм³ производили посев на чашки Петри с твердой питательной средой следующего состава: дрожжевой экстракт – 1 % w/v, пептон – 2 % w/v, глюкоза – 2 % w/v, агар-агар – 2 % w/v. Из выросших на плотной среде колоний отбирали чистые культуры.

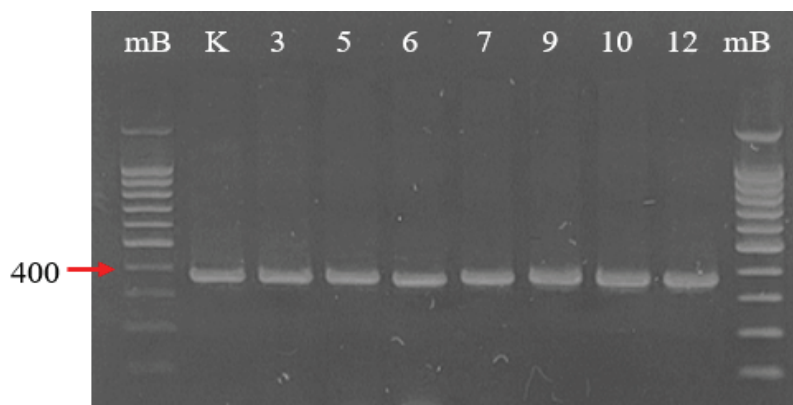
Для идентификации винных дрожжей рода *Saccharomyces* было проведено тестирование чистых культур изолятов на селективной среде Lysine Medium Base (Himedia, Индия), содержащей в качестве единственного источника азота аминокислоту лизин.

Экстракцию ДНК проводили по методике, описанной в работе [22]. Молекулярно-генетические исследования принадлежности штаммов к виду *S. cerevisiae* проводили согласно [23].

Определение содержания сахаров в сброженном сусле проводили с помощью рефрактометрического метода согласно ГОСТ ISO 2173-2013 [24].

Дрожжи, способные продуцировать сероводород выявляли качественным методом, который базируется на образовании сульфида свинца в процессе развития штамма. [25]. Изучаемые штаммы засеивали в пастеризованное виноградное сусло, разлитое в пробирки по 20 мл. После внесения культуры в сусло, пропитанную раствором уксуснокислого свинца полоску бумаги помещали между пробкой и горлышком пробирки так, чтобы полоска бумаги находилась над средой. Культивирование осуществляли при температуре 23-25 °С в течение 10 суток, регулярно отмечая состояние индикаторной полоски. Почернение бумаги свидетельствовало об образовании сульфида свинца, а, следовательно, о выделении микроорганизмами сероводорода. Степень образования H₂S определяли по следующей шкале: 0 – нет почернения (сероводород не образуется), почернение до 1 мм (низкое образование сероводорода), почернение 2-3 мм (среднее образование сероводорода); 4-5 мм (высокое образование сероводорода).

Обсуждение результатов. В результате исследований было получено 25 монокультур дрожжей. С помощью селективного теста определили принадлежность изучаемых монокультур к роду *Saccharomyces*. Результаты селективного теста показали, что из 25 штаммов 17 относятся к роду *Saccharomyces*, что составляет 68 %. С помощью молекулярно-генетических методов определили принадлежность сахаромикетов к виду *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи этого вида имели продукт размером 400 п.н. (рис. 1).



Примечания: mB – маркер молекулярного веса, 100 п.н.; K – контроль ОК-1, Германия, букет; 3-12 изучаемые штаммы дрожжей

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР реакции с использованием праймерной пары ScHO-F/ ScHO-R

Полученные в результате ПЦР анализа данные свидетельствуют о том, что все изученные штаммы рода *Saccharomyces* являются видом *Saccharomyces cerevisiae*.

Штаммы, определенные к виду *S. cerevisiae* были оценены по бродильной активности и способности к синтезу сероводорода. В виноградное пастеризованное сусло сорта Саперави вносили дрожжевые разводки с количеством клеток 100-150 млн/см³ и производили ежедневную оценку содержания сухих веществ в сусле. Так, на первом этапе эксперимента, 12 исследуемых штаммов определили, как штаммы с низкой бродильной активностью и удалили их из работы. Результаты исследования скорости сбраживания сахаров для оставшихся пяти штаммов, показали, что при культивировании на виноградном сусле штаммы дрожжей характеризовались различной бродильной активностью. Это говорит о том, что энергия брожения зависела, прежде всего, от индивидуальных физиологических свойств штаммов.

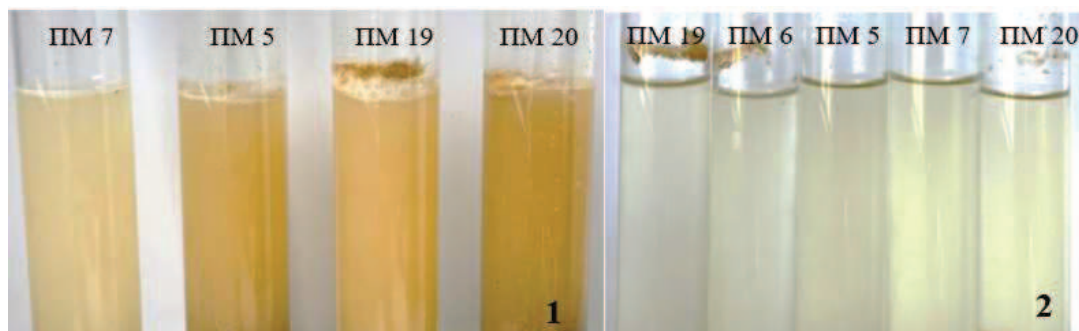
Известно, что образование сероводорода при производстве вин является штаммовой особенностью [26] и его содержание в вине в количествах, превышающих порог вкусовой чувствительности, может привести к появлению посторонних тонов. Результаты оценки бродильной активности и способности к синтезу сероводорода представлены в таблице.

Технологические характеристики изучаемых штаммов

Шифр штамма	Массовая доля сухих веществ, %					Образование сероводорода / область почернения, мм	Образование пены при брожении
	Продолжительность брожения, сут.						
	1	3	4	5	7		
ПМ 5	18,7	12,8	7,3	4,6	4,4	0	-
ПМ 6	18,9	13,6	7,8	6,2	5,8	1	+
ПМ 7	18,9	12,2	7,5	6,5	3,6	0	-
ПМ 19	18,7	12,1	7	6,2	3,7	1	+
ПМ 20	18,9	12,2	6,6	6,1	5,1	0	+

Бродильная активность изучаемых дрожжевых изолятов варьировала. Так, наибольшую активность брожения на третьи сутки проявили штаммы ПМ 7, ПМ 19 и ПМ 20. На седьмые сутки брожения штаммы ПМ 7 и ПМ 9 способствовали снижению сухих веществ, в сусле до 3,6 и 3,7 г/см³ соответственно. Оценка штаммов по способности

образовывать сероводород показала, что все исследуемые штаммы не способны синтезировать H_2S в критических для виноделия количествах. Штаммы ПМ 5, ПМ 7, ПМ 20 не способны к синтезу сероводорода вовсе, а штаммы ПМ 6 и ПМ 19 образовывали H_2S в незначительном количестве (область почернения до 1 мм). Образование пены при брожении белых вин является негативной характеристикой дрожжевых штаммов. Так, способность к пенообразованию проявили штаммы ПМ 6 и ПМ 19 и ПМ 20 (рис. 2).



Примечание: 1 – вторые сутки брожения; 2 – седьмые сутки брожения

Рис. 2. Бродильная способность изучаемых штаммов на вторые и седьмые сутки

Выводы. Проведенные исследования по изучению активности брожения и способности к образованию сероводорода изучаемых штаммов позволяют сделать вывод о перспективности использования автохтонных штаммов при технологии виноделия. Так, дрожжевой штамм ПМ 7 способствовал снижению количества сухих веществ на седьмые сутки до концентрации $3,6 \text{ г/см}^3$, не образовывал пену при брожении и отличался хорошим осветлением виноматериала, что позволяет отнести его к категории перспективных штаммов и рекомендовать для последующей оценки по основным технологическим характеристикам в условиях микровиноделия.

Литература

1. Ubalde J., Sort X., Poch R., Porta M. Influence of edapho-climatic factors on grape quality in Conca de Barberà Vineyards (Catalonia, Spain) // J. Int. Sci. Vigne Vin. 2007. Vol. 41(1). P. 33-41.
2. Fang F., Li J.M., Zhan P., Tang K. Effect of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines // Food Res. Int. 2008. № 41. P. 53-60.
3. Vontrobová E., Kubizniaková P., Fiala J., Sochor J., Matoulková D. Autochthonous yeasts as one of the tools to produce wines by original technologies // Kvasny prumysl. 2019. Vol. 65. P. 38-45.
4. Minebois R., Pérez-Torrado R., Querol A. A time course metabolism comparison among *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* and *S. kudriavzevii* species in wine fermentation // Food Microbiol. 2020. Vol. 90. P. 103484.
5. Wang B., Tan F., Chu R., Li G., Li L., Yang T., Zhang M. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on biogenic amines in wine // Trends Food Sci. Tech. 2021. Vol. 116. P. 1029-1040.
6. Windholtz S., Redon P., Lacampagne S., Farris L., Lytra G., Cameleyre M., Barbe J.C., Coulon J., Thibon C., Masneuf-Pomarède I. Non-*Saccharomyces* yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide // LWT Food Sci. Technol. 2021. Vol. 149. P. 111781.
7. Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A. Function of yeast species and strains in wine flavor // Int. J. Food Microbiol. 2003. Vol. 86. P. 169-180.
8. Cadière A., Aguera E., Caillé S., Ortiz-Julien A., Dequin S. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution // Food Microbiol. 2012. Vol. 32. P. 332-337.
9. Ilieva F., Petrov K., Kostadinović Veličkovska S., Gunova N., Dimovska V., Rocha J. M. F., Esatbeyoglu T. Influence of Autochthonous and Commercial Yeast Strains on Fermentation and Quality of

Wines Produced from Vranec and Cabernet Sauvignon Grape Varieties from Tikveš Wine-Growing Region, Republic of North Macedonia // *Appl. Sci.* 2021. Vol. 11(13). P. 6135.

10. Танащук Т.Н., Шаламитский М.Ю., Ермихина М.В., Михеева Л.А. Скрининг природных изолятов дрожжей рода *Saccharomyces* для производства столовых виноматериалов // *Виноградарство и виноделие*. 2018. № 45. С.48-51.

11. Абдуллабекова Д.А., Магомедова Е.С. Природные дрожжи – перспективный ресурс для традиционных технологий // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2009. №5(2). С. 445-447

12. Lisanti M.T., Blaiotta G., Nioi C., Moio L. Alternative methods to SO₂ for microbiological stabilization of wine // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2019. Vol. 18. P. 455-479.

13. Wójcicki M., Swider O., Choinska R., Bujak M., Sokołowska B., Szczepanska M., Bartosiak E., Roszko M.L., Juszczuk-Kubiak E. New Isolated Autochthonous Strains of *S. cerevisiae* for Fermentation of Two Grape Varieties Grown in Poland // *Appl. Sci.* 2022. Vol. 12. P. 3483.

14. García M., Esteve-Zarzoso B., Crespo J., Cabellos J.M., Arroyo T. Influence of native *Saccharomyces cerevisiae* strains from DO “Vinos de Madrid” in the volatile profile of white wines // *Fermentation*. 2019. Vol. 5. P. 94.

15. Çelik Z.D., Erten H., Cabaroglu T. The influence of selected autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on the physicochemical and sensory properties of narince wines // *Fermentation*. 2019. Vol. 5. P. 70.

16. Blanco P., Mirás-Avalos J.M., Pereira E., Orriols I. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains // *J. Sci. Food Agric.* 2013. Vol.93. P. 2849-2857.

17. Кишковская С.А., Танащук Т.Н., Шаламитский М.Ю., Загоруйко В.И., Ширяев М.И., Авданина Д.А., Эльдаров М.А., Равин Н.В., Марданов А.В. Природные штаммы дрожжей *Saccharomyces Cerevisiae*, перспективные для производства вин типа херес // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. № 3. С. 275-282.

18. Агеева Н.М., Насонов А.И., Прах А.В., Супрун И.И. Исследование бродильной и дыхательной активности новых штаммов дрожжей, предназначенных для производства белых столовых вин // *Наука Кубани*. 2018. № 2. С. 16-23.

19. Tufariello M., Chiriatti M.A., Grieco F., Perrotta C. Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile of Negroamaro wines // *LWT-Food Science and Technology*. 2014. Vol. 58. P. 35-48.

20. Агеева Н. М., Прах А.В., Насонов А. И., Супрун И.И. Исследование технологических свойств новых штаммов винных дрожжей, выделенных из спонтанной микрофлоры винограда // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. 2018. № 52(04). С. 110-122.

21. Загоруйко В.А., Танащук Т.Н., Кухаренко О.Е., Виноградов Б.А., Костенко Е.В. Влияние рас дрожжей на формирование ароматобразующего комплекса шампанских виноматериалов // «Магарач». *Виноградарство и виноделие*. 2012. № 3. С. 21-23.

22. Degre R., Thomas D. Y., Ash J. Wine yeast strain identification // *Am. J. Enol. Vitic.* 1989. Vol. 40. P. 309-315.

23. De Melo Pereira G.V., Ramos C.L., Galvão C., Souza Dias E., Schwan R.F. Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. 2010. Vol. 51(2). P. 131-137.

24. ГОСТ ISO 2173-2013. Продукты переработки фруктов и овощей. Рефрактометрический метод определения растворимых сухих веществ. М.: Издательство Стандартиформ. 2014. 12 с.

25. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М.: Изд-во Моск. ун-та., 1976. С.143-144.

26. Guidici P., Zambonelli C., Kunkee R.E. Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulphide // *Am. J. Enol. Vitic.* 1993. Vol. 44. P. 17-21.