

## НОВЫЕ ШТАММЫ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВИНОГРАДНЫХ ВИН\*

Агеева Н.М., д-р техн. наук, Прах А.В., канд. с.-х. наук, Насонов А.И., канд. биол. наук,  
Супрун И.И., канд. биол. наук, Токмаков С.В., канд. биол. наук

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

**Реферат.** Из спонтанной микрофлоры винограда выделено и исследовано 60 моноспоровых изолятов винных дрожжей, проведён их молекулярно-генетический анализ. Доказана принадлежность клеток к роду *Saccharomyces*. Исследованы технологические свойства 20 штаммов – бродительная и дыхательная активность, устойчивость к стрессорам.

**Ключевые слова:** вина, новые штаммы дрожжей, генетический анализ, бродительная и дыхательная активность, устойчивость к этанолу, диоксиду серы, нагреванию, охлаждению

**Summary.** From the spontaneous microflora of grapes it is isolated and studied 60 monocryptogamous isolates of the wine yeast, their molecular-genetic analysis carried out. The belonging of the cells is proven to the kind *Saccharomyces*. The technological properties of 20 strains – fermenting and respiratory activity, stability to the stress factors are studied.

**Key words:** wines, new strains of yeast(s), genetic analysis, fermenting and respiratory activity, stability to ethanol, dioxide of sulfur, to heating and to cooling

**Введение.** Для виноградных вин современная винодельческая промышленность России широко применяет специальные винные дрожжи: активные сухие дрожжи производства Франции, Германии, Италии, обладающие множеством достоинств, но и не лишённые ряда недостатков. В случае неправильного выбора расы дрожжей их использование приводит к разрушению сортового аромата и формированию органолептических свойств, не характерных конкретному сорту винограда. Между тем, широко известно, что для производства столовых вин лучше применять дрожжи, адаптированные к конкретным условиям местности, в том числе к особенностям химического состава сбраживаемого сула. Такие исследования широко ведутся во многих виноградо-винодельческих регионах мира [1-4], в том числе в России [5, 6].

Наши исследования показали наличие дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* на поверхности ягод винограда, произрастающего в анапо-таманской зоне Краснодарского края, и целесообразность их использования для производства виноградных вин [6].

**Объекты и методы исследований.** В качестве объектов исследований использовали 60 моноспоровых изолятов винной дрожжевой микрофлоры, различавшихся морфолого-культуральными характеристиками.

Для экстракции ДНК использовали апробированный ранее упрощённый метод с общей продолжительностью экстракции около 1,5-2 часов [7-9]. Для апробации были отобраны 5 микросателлитных маркеров с различной степенью полиморфности – С6, С11,

\*Поддержано грантом №16-48-230347\16-р\_а Российского фонда фундаментальных исследований и администрации Краснодарского края и Госзаданием РАН

YPL009c, ScYOR267c и ScAAT4. Прямой праймер в каждой праймерной паре был мечен соответствующим флуоресцентным красителем (ROX – красный, R6G – зеленый, FAM – синий и TAMRA – желтый).

ПЦР проводили на амплификаторе BioRad T100 в объеме 25 мкл; в состав ПЦР-смеси входили: 1x ПЦР буфер (СибЭнзим), 0,05 mM dNTP, 0,32 mM каждого праймера, 1,5 ед. Taq ДНК полимеразы (СибЭнзим), 40 нг ДНК и деионизированной воды до общего объема реакционной смеси 25 мкл. Условия ПЦР следующие: денатурация при 95 °C – 2 мин; затем 35 циклов – 10 с при 95 °C; 58 °C – 30 с; 72 °C – 30 с; финальная элонгация при 72 °C – 10 мин.

Фрагментный анализ проводили на генетическом анализаторе AB3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) при напряжении электрофореза 15 кВ длительностью 600 секунд. Перед проведением фрагментного анализа, 1 мкл ПЦР-продукта растворяли в 20-60 мкл деионизированной воды, затем 1 мкл разведенного ПЦР-продукта переносили в приготовленный непосредственно перед использованием буфер нанесения следующего состава – 8,85 мкл Hi-DiTM Formamide (Applied Biosystems, Foster City, California) и 0,15 мкл размерного стандарта (S450, COrDIS, Syntol).

Разведенный ПЦР-продукт в буфере нанесения подвергали денатурации в течении 5 минут при 95 °C, после охлаждения на льду образец помещали в плашку генетического анализатора. Полученные данные визуализировались в программе GeneMapper v4.1. (Applied Biosystems, Foster City, California). Кластерный анализ выполнен методом UPGMA с использованием пакета программ PAST. Технологические свойства выделенных штаммов дрожжей оценивали по методикам [10].

**Обсуждение результатов.** По результатам SSR-генотипирования были получены SSR-фингерпринты для 60 штаммов винных дрожжей по 12 SSR-маркерам. В таблице приведены примеры SSR-фингерпринтов 16 штаммов дрожжей-сахаромицет по 6 SSR-маркерам.

Для оценки степени генетической близости изученных штаммов, на основе данных SSR-генотипирования, была проведена кластеризация с использованием метода UPGMA с построением дендрограммы. По результатам кластеризации можно выделить 3 основных кластера и 1 образец, выделившийся в отдельный кластер. Очевидно, что распределение образцов по кластерам не соответствует их географическому происхождению. Однако имеется неоднородность представленности в кластерах изолятов из различных точек отбора.

Все изоляты дрожжей (отбор винограда из хозяйств ООО «Вилла Виктория» и ООО «Имение Сикоры», находящихся в окрестностях с. Семигорский между Анапой и Новороссийском) полностью представлены в одном кластере и не встречаются в других, что говорит о высокой генетической близости представленных изолятов. Это подтверждается и характеристикой точек отбора, представляющих собой близко расположенные виноградники. Изоляты двух штаммов Д-4-27 и Д-4-25 являются генетическими клонами. Такое низкое генетическое разнообразие может говорить о значительной депрессии аборигенной популяции дрожжей-сахаромицетов и возможном проникновении коммерческих штаммов с винограда на виноградники.

Наибольшее генетическое разнообразие отмечено в изолятах, полученных с винограда, выращенного на виноградниках обанкротившегося винодельческого завода СПК им. Ленина. Это указывает на существование устойчивой природной популяции дрожжей-сахаромицетов на этих виноградниках. Отмечено влияние сорта на выход винных дрожжей рода *Saccharomyces*. В образцах красного сорта Каберне-Совиньон было выделено меньше всего сахаромицетов около 2 % от общего количества изолятов, в то время как в образцах из белого сорта винограда Шардоне – до 8-12 % в зависимости от места отбора проб.

ДНК-фингерпринты для некоторых изученных штаммов аборигенных винных дрожжей  
рода *Saccharomyces*

Маркер Изолят	C4	C11	YPL009c	ScAAT2	ScSAAT1	ScAAT3	C5	ScYOR267C
Д-5С-21	105/ 107	192/200	300/303	225	260/263	306/329	342	343
Д-8-6	105/107	216/237	300/309	220	260/263	328	342	343
Д-4-27	115/109	190/214	303/309	220	260	303	322	322
Д-4-23	115/109	190/214	303/309	222	260	303	322	322
Д-1-25	107/109	192	306	220	260	328	277	278/307
Д-2-27	105/107	213	309	225	260	295	328	295
Д-1-4	105/107	213	309	225	260	295	328	295
Д-2-30	107/109	192	300	220	260	295	277	328
Д-2-5	107/109	192	300	220	260	295	277	277
Д-8-9	109/111	200	303	220	260	306	295	295
Д-8-10	109/111	200	303	220	260	306	295	295
Д-8-5	109/111	220	306	220	260	328	295	295
Д-4-19	115/109	190/214	303/309	222	260	303	322	322
Д-8-7	105/107	216/237	300/309	220	260/263	328	342	343
Д-2-6	105/107	192	300/333	225	260	328	295	257
Д-1-6	105/107	214	300	225	260	328	289	289

Для проведения исследований технологических свойств были отобраны дрожжи первого кластера (рис.). Исследовали активность брожения и дыхания, устойчивость к неблагоприятным (стрессовым) факторам среды: спирту, теплу и холоду, диоксиду углерода. Полученные результаты позволяют все исследуемые штаммы винных дрожжей по бродильной активности разделить:

- полное сбраживание сахаров с небольшим латентным периодом (4 штамма);
- полное сбраживание сахаров с продолжительным (сутки и более) адаптационным периодом (10 штаммов);
- неполное сбраживание сахаров с образованием недобродов (6 штаммов).

Следует обратить внимание на наличие остаточных несброженных сахаров (формирование недобродов, массовая концентрация сахаров более 0,4 г/100 см<sup>3</sup>). Проведенные исследования показали, что несброженные дрожжами вариантами 14-20 сахара представляли собой фруктозу, что зачастую является признаком вялотекущего алкогольного брожения.

Исследована дыхательная активность изучаемых изолятов дрожжей. Результаты показали взаимосвязь между дыхательной и бродильной активностями клеток: чем активнее дрожжи сбраживали сахара виноградного суслу, тем ниже их дыхательная функция. По полученным данным, дрожжи вариантов 11-16 могут быть рекомендованы для производства игристых вин.

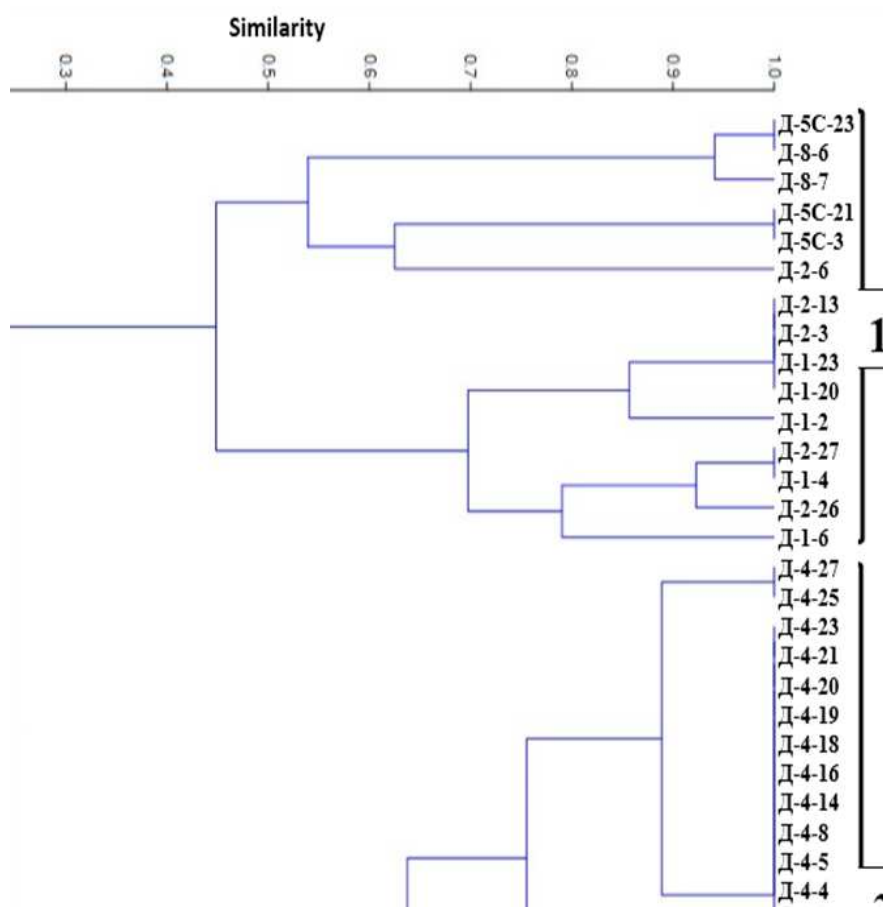


Рис. Первый кластер дрожжей

Полученные результаты показали, что большая часть исследуемых штаммов устойчива к присутствию в среде диоксида серы в концентрации до 200 мг/дм<sup>3</sup> за исключением вариантов Д 1-2, Д1-6, Д 2-13, Д4-20, Д 4-27. Сравнивая экспериментальные варианты с контрольными, можно отметить близость полученных результатов, то есть сульфостойкость большинства выделенных штаммов дрожжей идентична контрольным вариантам (активные сухие дрожжи, разводки рас дрожжей из музея культур НИВиВ «Магарач»).

Наибольшую устойчивость к действию низких температур показали дрожжи вариантов Д 2-5, Д 2-6 и Д 2-14. При 60°С большинство штаммов дрожжей не дают роста на твердой питательной среде. Исключение составляют штаммы вариантов Д 1-2, Д 1-20, Д 2-3, Д 2-5, Д 2-6 4-7, клетки которых сохранили жизнеспособность и физиологическую активность даже при температуре 60°С. Это позволяет отнести указанные штаммы к категории термостойких и рекомендовать их использование в технологии, предусматривающей термические обработки совместно с винными дрожжами.

Важнейшим свойством винных дрожжей является спиртообразующая способность. Сбраживание сула в одинаковых условиях показало, что дрожжи вариантов Д 2-3, Д 2-6, Д 2-27, Д 3-17 и Д 4-8 обеспечили такое же спиртонакопление, как и контрольные образцы дрожжей (Кахури 7 и Оеноферм). Это свидетельствует об однотипности спиртового брожения контрольных и опытных изолятов винных дрожжей.

В условиях ООО «Микровиноделие» с использованием выделенных штаммов дрожжей проведено сбраживание белого и красного виноградного сула. Установлено, что белые столовые виноматериалы, приготовленные с применением многих эксперименталь-

ных штаммов дрожжей, характеризовались высоким качеством и имели дегустационные оценки на уровне контроля (Кахури 7 и Оеноферм) и даже выше. Это варианты Д 1-2, Д1-6, Д 1-14, Д 1-20, Д 2-3, Д 2-6, Д 2-27, Д 3-17 и Д 4-8. Следует отметить, что использование штаммов вариантов Д 1-2, Д1-6, Д 1-14, Д 1-20, Д 2-3 и Д 4-8 позволило получить белые столовые виноматериалы с яркими сортовыми ароматами, дополненными тонами, выработанными винными дрожжами.

В технологии красных вин лучшие результаты обеспечило применение дрожжей вариантов Д 2-6, Д 4-8, Д 4-20 и Д 4-27.

**Заключение.** Проведенные исследования показали, что биомасса дрожжей-сахаромицетов, выделенных из спонтанной микрофлоры виноградной ягоды, содержит большое количество дрожжевой микрофлоры, характеризующейся высокими хозяйственно ценными признаками, применение которой обеспечивает производство качественного вина. Такая микрофлора может быть использована в селекции новых местных штаммов винных дрожжей для их последующего применения в технологии виноделия с целью замены импортных аналогов дрожжей.

### Литература

1. Saeed M., Anjum F.M., Zahoor T., Nawaz HAQ, Sajjad-UR-Rehman. Isolation and Characterization of Starter Culture from Spontaneous Fermentation of Sourdough. - INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY. -2009. - 11-p. 329–332
2. Holzapfel, W.H., P. Haberer, R. Geisen, J. Bjorkroth and U. Schillinger. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American J. Clinic Nutr., 2001.-73: 365–373
3. Corsetti, A., P. Lavermicocca, M. Morea, F. Baruzzi, N. Tosti and M. Gobbetti, 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* & *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. Int. J. Food Microbiol., 64: 95–104
4. Samanta TT, Das A. Isolation, identification, and characterization of gut microflora of *Perionyx excavatus* collected from Midnapore, West Bengal. - J Basic Microbiol. 2016 Mar;56(3):286-93
5. Иванова, Е.В. Сравнительная оценка морфологических свойств промышленных рас дрожжей из коллекции ин-та виноделия и виноградарства «Магарач» / Е.В. Иванова, С.А. Киш-ковская, Н.И. Бурьян, Н.А. Пикарь, Э.Л. Зинькевич // Виноград и вино России. – 2000. – № 6. – С. 46-48.
6. Агеева, Н.М. Исследование состава микрофлоры винограда с целью идентификации природных популяций *Saccharomyces cerevisiae* / Н.М. Агеева, А.И. Насонов, А.В. Прах, И.И. Супрун, Е.А. Сосюра // Вестник АПК Ставрополя. – 2017. –№ 1.– С. 115-120.
7. Legras, J.-L. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains / J.-L. Legras, O. Ruh, D. Merdinoglu [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2005. - 102, 73– 83.
8. Keith, D. A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*/ D. Keith, M.R. Richards, G. Richard [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. - 2009. – 96, 355–359.
9. Супрун, И.И. Аprobация метода генотипирования штаммов винных дрожжей рода *Saccharomyces* на основе анализа геномных участков Inter-Delta / И.И. Супрун, С.В. Токмаков, Н.М. Агеева [и др.] // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2015. – №112(08). – С. 484-494. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2015/08/pdf/36.pdf>
10. Бурьян, Н.И. Микробиология виноделия / Н.И. Бурьян // Симферополь: Таврия, 2002. – 403 с.