УДК 579.66:663.13; 663.223.1:663.253

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИННОГО ШТАММА SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y-3980

Котенко С.Ц., Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Аливердиева Д.А.

ФГБУН «Прикаспийский институт биологических ресурсов» Дагестанского научного центра РАН, Махачкала, e-mail: eslanda61@mail.ru

Выделен штамм дрожжей с повышенной бродильной активностью, предназначенный для вторичного сбраживания тиражной смеси под давлением. Молекулярно-генетическим анализом установлено, что штамм относится к виду *S. cerevisiae.* Изучены морфологические, физиологические и культуральные особенности штамма. Обнаружено, что *Y-3980* способен к экскреции ценных компонентов ароматного комплекса: высших спиртов, высококипящих сложных эфиров, терпеновых соединений, а также жирных кислот и незаменимых аминокислот, обогащающих качество, вкус и аромат вина. В вине, приготовленном с использованием штамма, наблюдалось уменьшение содержания изобутанола, этилацетата и обогащение высококипящими сложными эфирами, такими как этиллактат, диэтилсукцинат, гераниолацетат, β-фенилэтилацетат, диэтилмалат и этиллинолеат. Шампанское марки «Брют», полученное с использованием штамма *S. cerevisiae Y-3980,* обладает тонким ароматом, гармоничным вкусом, высокими игристыми и пенистыми свойствами, длительной игрой, средним мелкодисперсным пенообразованием. Штамм представляет интерес для использования в производстве шампанских вин.

Ключевые слова: селекция; винные дрожжи S. cerevisiae Litto-Levure, S. cerevisiae Y-3980, шампанское вино, ароматобразующие соединения

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF WINE STRAIN SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y-3980

Kotenko S.T., Khalilova E.A., Islammagomedova E.A., Aliverdieva D.A.

Precaspian Institute of Biological Resources of Dagestan Scientific Center RAS, Makhachkala, e-mail: eslanda61@mail.ru

Yeast strain with improved fermentative activity, designed for the secondary fermentation of the tirage mixture under pressure was isolated. Molecular – genetic analysis identified that the strain belongs to the species *S. cerevisiae*. Morphological, physiological and cultural properties of the strain were investigated. It was found that *Y-3980* was capable to excrete aromatic components: higher alcohols, higher boiling esters, terpene compounds, fatty acids and essential amino acids that enhance the quality, flavor and aroma of the wine. The wine manufactured with the above strain contained smaller quantities of isobutanol, ethyl acetate and larger quantities of high boiling esters, e. g. ethyl lactate, diethyl suctsinate, geraniol acetate, β-phenyl acetate, diethyl malate, ethyl linoleate. Champagne brand «Brut» produced with the use of a strain of *S. cerevisiae Y-3980,* has a delicate aroma, harmonious taste, high sparkling and foaming properties, long game, an average fine-dispersed foaming. The strain is of interest for use in the production of sparkling wines.

Keywords: selection; wine yeast S. cerevisiae Letto-Levure Champansky CHA, S. cerevisiae Y-3980, aroma-forming compounds

В настоящее время актуальность представляют прикладные и фундаментальные исследования по селекции перспективных штаммов винных дрожжей, способных улучшить качество игристых вин [8]. Наиболее распространенными винными дрожжами являются *Saccharomyces cerevisiae* благодаря их толерантности к относительно высокому содержанию спирта (свыше 10–12 % об.), углекислому газу (6–7 г/дм^3); pH (2,8–3,2), сернистому ангидриду (50–200 мг/дм^3), повышенному давлению (до 0,5 МПа), холодостойкости (8–15 °С), диоксиду серы. Количество биохимически активных компонентов, содержащихся в вине, зависит от многих факторов: генетических особенностей дрожжей; содержания предшественников вкуса и аромата (аминокислот, ферментов, липидов, полисахаридов, фенольных веществ и других соединений) в составе среды брожения; наличия киллер-фактора, технологии производства игристого вина и других факторов.

Известны отечественные культуры дрожжей, используемые для производства шампанского, *S. vini*: Ш-39, ШП-1, МШ, 5/82, Штейнберг-1892, Харьковская-39, Ш-2, Ш-5, М-1 и расы зарубежной селекции *S. cerevisiae MC001* и *MC002, Litto-Levure* [3, 6, 10]. Однако штаммы сухих дрожжей зарубежных производителей не всегда адаптированы к особенностям отечественного шампанского производства, что отражается негативно на качестве продукции. Кроме того, практика показала, что штаммы, применявшиеся в промышленности несколько десятков лет, постепенно теряют свои ценные признаки и свойства. Поэтому большое

значение придается селекции дрожжей, применяемых в производстве шампанского, адаптированных к условиям предприятия.

Цель настоящей работы – получение штамма дрожжей *S. cerevisiae*, обладающего высокой бродильной активностью, способного сохранять биохимические и технологические свойства в процессе шампанизации.

Материалы и методы исследований

В работе были использованы винные штаммы *Saccharomyces cerevisiae Y-3980* (Всеросссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИГенетика), выделенный из шампанизируемого вина на ОАО «Дербентский завод игристых вин» (г. Дербент), и исходный *Saccharomyces cerevisiae Litto-Levure,* который служил в качестве контроля.

Селекция и морфо-физиологические свойства выделенных штаммов**.** Выделение чистой культуры из резервуаров на стадии дображивания бродильной смеси периодическим способом на брют осуществлялось путем последовательных рассевов в чашки Петри на плотную питательную среду, содержащую 2 % агара и виноградное сусло. Отбор дрожжей проводился методом Линдлера из более 260 колоний по морфологическим, культуральным, физиолого-биохимическим свойствам (бродильная способность, холодостойкость, устойчивость к сернистому ангидриду и повышенному давлению). Бродильную активность исследуемых штаммов оценивали по скорости сбраживания тиражной смеси с pH 3,3, содержащей 2,5 % углеводов в колбах с бродильными затворами до полной остановки брожения. Морфологию клеток (форма, величина клеток, способ вегетативного размножения) изучали в световом микроскопе «Olympus CX21 FS1» (Япония). Спорообразование дрожжей индуцировали через двое суток на стандартной ацетатной среде, г/л: бактоагар – 20; CH_3COONa – 10; KCL – 5. Диагностическая характеристика (способность усваивать азотистые вещества, органические кислоты, углеводы) штамма проводилась согласно общеизвестным методам [5].

Дрожжи культивировали в тиражной среде из следующих виноматериалов, %: Пино – 40, Рислинг – 20, Али – Готе – 20, Шардоне – 20. Бродильная смесь содержала 2,5 % углеводов, 11,2 % спирта; имела титруемую кислотность 9,1 г/дм^3, летучую – 0,17 г/дм^3; фенольные вещества составляли – 0,3 г/дм^3, редуктоны – 17,8 г/дм^3. Посевной материал, выросший на агаризованной среде и после 48 ч роста в глубинной культуре на виноградном сусле, составлял, 3 % от обьема среды. Шампанизация виноматериалов проводилась периодическим способом в акротофоре при 9–10 °С и давлении 0,4–0,5 МПа, pH 3,3–3,5 в течение 20 дней.

Молекулярно-генетические исследования. Таксономическую принадлежность штамма определяли по фенотипическим признакам до вида по определителям Кудрявцева [5]. Видовую идентификацию штамма *Y-3980* проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей ITSI-5.8S-ITS2 региона рДНК. Выделение ДНК и проведение ПЦР выполняли по стандартной методике, описанной в работе [2]. Для амплификации использовали праймеры ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGAAGTA) и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG). Секвенирование амплифицированного фрагмента ДНК проводили в научно-производственной компании «Синтол» (Москва). Видовую идентификацию осуществляли сравнением полученных нуклеотидных последовательностей с данными, размещенными в генбанке NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных CBS (cbs.knaw.nl).

Ароматические вещества определяли методами масс-спектрометрии (ГХ МС) на ГХ МС НД 5988 А фирмы «Hewlett-Packard» (США) и газовой хроматографии – пламенно-ионизационным детектором (ГХ – ПИД) на ГХ ПИД НД – 5710 фирмы «Hewlett-Packard» (США) с платой сбора информации «Multichrom» фирмы «Ampersand» (Россия).

Свободные аминокислоты в шампанских винах определяли в стандартном режиме анализа белковых гидролизатов, используя высокоэффективные ионообменные колонки и специальный нингидриновый реагент для детектирования элюирующих аминокислот на жидкостном хроматографе L-8800 (Hitachi, Япония) по методике [9].

Жирные кислоты. Для получения метиловых эфиров жирных кислот из триглицеридов использовали метод прямой переэтерификации с метанольным раствором метилата натрия как описано [1]. Фракционирование метиловых эфиров жирных кислот в этаноле осуществляли методом газовой хроматографии на хроматографе «TRACE-2000» (Италия) с пламенно ионизационным детектором (PID) на капиллярной газохроматографической колонке HP-FFAP (США) (50 м×0,32 мм×0,52 мкм) с 10 % диэтиленгликоль – сукцинатом (США). Температура колонки 185 °С, испарителя – 230 °С. В качестве газоносителя использовали азот (1,8–2,7 дм^3/ч).

Результаты рассчитывали как среднее арифметическое из трех повторных опытов с учетом средней ошибки.

Результаты исследования и их обсуждение

Культуральные свойства, морфология**.** В результате промышленной селекции выделен новый штамм дрожжей, который депонирован в Всеросссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИГенетика, под номером *S. cerevisiae Y-3980.* В тиражной смеси клетки нового штамма округлой формы размером 9,2×9,4 μкм, *S. cerevisiae Litto-Levure* – овально-округлые, удлиненные 8,3×10,1 μкм. Диаметр двадцатисуточной культуры *S. cerevisiae Y-3980* составляет 4,3×3,8 см, *S. cerevisiae Litto-Levure* – 3,5×3,3 см. Штамм *S. cerevisiae Y-3980* размножается почкованием, обладает способностью к спорообразованию и на 5–6-е сутки образует по 1–2 споры в клетке, форма спор шаровидная с гладкой стенкой, от одной до четырех в аске, размеры 2,5–2,9 μкм. После сбраживания тиражной смеси образуется зернистый осадок. *S. cerevisiae Y-3980* формирует на поверхности агаризованной среды округлые макроколонии с волнистым краем, выпуклые, кремового цвета, с гладкой блестящей поверхностью, с врастающим в субстрат темно-палевым центром, небольшой радиальной складча-

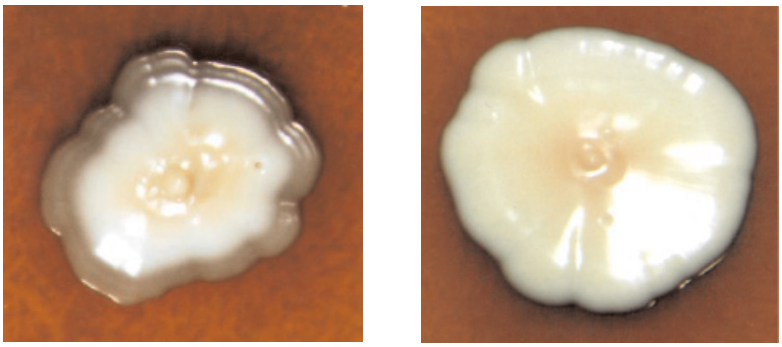
тостью (рисунок). Макроколония исходного штамма (контроль) *S. cerevisiae Litto-Levure* имеет форму цветка неправильной формы с бежевыми концентрическими кругами, волнистым краем, с врастающим в субстрат темно-палевым центром; поверхность блестящая. Колонии имеют гомогенную структуру и мажущуюся консистенцию. Следует отметить, что некоторое изменение пигментации и аромата колоний дрожжей, возможно, имеет тесную корреляцию с образованием вторичных метаболитов, образованных в процессе спиртового брожения. Это летучие примеси, составляющие комплекс ароматических компонентов, количество которых формирует характерные сенсорные свойства конечного продукта брожения – этилового спирта.

Бродильная активность. Штамм *S. cerevisiae Y-3980* обладает высокой бродильной активностью, сбраживает тиражную смесь на 48 ч быстрее контрольного штамма и образует спирт 11,3 об.%.

Биохимические свойства. Высшие спирты**.** Обнаружено, что при использовании штамма *S. cerevisiae Y-3980* суммарное количество высших спиртов, составляющих основу в формировании букета шампанского, на 24% больше по сравнению с контролем (табл. 1). Количество β-фенилэтанола с ароматом розы и пропанола в опытном шампанском выше в 1,4 и 1,6 раз, чем в контроле соответственно. Содержание изобутанола, оказывающего отрицательное влияние на букет шампанского, в 2,2 раза меньше в опытном шампанском по сравнению с контролем.

Терпеновые соединения. Выделенный штамм синтезирует вдвое больше, чем контрольный, такие терпеновые соединения, как гераниол, цис-фарнезол и транс-фарнезол, придающие аромату шампанского цитронные тона и оттенки аромата розы (табл. 2), что характерно для лучших образцов шампанского.

Сложные эфиры, являющиеся важнейшей ароматической составляющей, представлены 8 компонентами (табл. 3). Содержание этиллактата, гераниолацетата, диэтилмалата, улучшающих вкус, аромат и формирование в букете вина подсолнечных тонов, в опытном вине выше на 46,7; 50,0 и 20,7% соответственно. Обнаружена более высокая доля высококипящих сложных эфиров в опытном варианте (66,1:73,7%, контроль:опыт) по сравнению с легкокипящими, что является необходимым условием качества букета шампанского вина.



а б

Макроколонии штаммов:
а – S. cerevisiae Litto-Levure (исходный);
б – S. cerevisiae Y-3980 (опытный) на сусло-агаре на 20-е сутки (натуральная величина)

Таблица 1

Содержание спиртов в шампанских винах, мг/дм^3

Компоненты	Штаммы	
	Контроль Штамм *S. cerevisiae Litto-Levure*	Опыт *S. cerevisiae Y-3980*
Пропанол	22,50	35,40
Изобутанол	1,12	0,51
н-Бутанол	следы	следы
Изопентанол	82,46	103,52
Гексанол	1,03	0,98
β-Фенилэтанол	12,04	17,00
Сумма	119,15	157,41

Таблица 2

Содержание терпеновых соединений в шампанских винах, мг/дм^3

Компоненты	Штаммы	
	Контроль *S. cerevisiae Litto-Levure*	Опыт *S. cerevisiae Y-3980*
Окись линалоола-1	0,03	0,05
Окись линалоола-2	0,19	0,22
Линалоол	0,12	0,45
Гераниол	1,83	3,51
Цис-фарнезол	1,13	1,96
Транс-фарнезол	0,08	0,19
Сумма	3,38	6,38

Таблица 3

Содержание сложных эфиров в шампанских винах, мг/дм^3

Сложные эфиры	Штаммы	
	Контроль Штамм *S. cerevisiae Litto-Levure*	Опыт *S. cerevisiae Y-3980*
Этилацетат	6,70	3,49
Этилкапронат	0,21	0,16
Этиллактат	10,31	15,12
Диэтилсукцинат	5,38	7,94
Гераниолацетат	0,08	0,12
β-Фенилэтилацетат	0,18	0,62
Диэтилмалат	12,45	15,03
Этиллинолеат	0,28	0,92
Сумма	35,59	43,40

При использовании селекционированных винных рас дрожжей важная роль принадлежит полиненасыщенным жирным кислотам в качестве предшественников ряда биологически активных соединений и ответственных за травяной аромат шампанского. Большее накопление жирных кислот может оказывать влияние на игристые и пенистые свойства шампанского [7]. Доминирующее положение занимают пальмитиновая $C_{16:0}$, линолевая $C_{18:2\omega-6}$ и линоэладиковая $C_{18:2}$ кислоты, составляющие до 35,0; 30,0 и 14,0 % от общей суммы жирных кислот, соответственно. Содержание жирных кислот $C_{10:0}$ и $C_{12:0}$, обуславливающих маслянисто-цветочный запах в шампанском, в 2 раза меньше, чем в контроле, что характеризует качество вина. Суммарное количество ненасыщенных жирных кислот ($C_{14:1\omega-9}$, $C_{17:1}$, $C_{18:2,}$ $C_{18:2\omega-6}$, $C_{24:1\ \omega-9}$) на 40,9 % выше в опытных вариантах, в основном, за счет линолевой $C_{18:2\omega-6}$ и линоэладиковой $C_{18:2}$ кислот, соответственно на 45,3 и 36,1 %. Количество полиеновых кислот в опытном шампанском в 1,4 раза выше контрольного.

Исследование аминокислот, улучшающих аромат игристых вин, показало, что количество аминокислот в опытном варианте с использованием нового селекционного штамма превышает аналогичные показатели контроля почти в 1,3 раза. Количество незаменимых аминокислот (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, лизин) в шампанском вине при использовании штамма *S. cerevisiae Y-3980* вдвое выше контрольного образца. Как правило, содержание пролина доминирует в пуле аминокислот [8], концентрация его во всех вариантах шампанских вин составляет 49,0–55,2 % от суммы аминокислот. Количество метионина, цистеина и аланина в качестве антиоксидантов, оказывающих протекторный эффект на клеточные мембраны живого организма, выше в опытном вине в 1,5; 2,2 и 1,4 раза соответственно.

Шампанское марки «Брют», полученное с использованием штамма *S. cerevisiae Y-3980,* светло-соломенного цвета, с тонким ароматом, гармоничным вкусом, высокими игристыми и пенистыми свойствами, длительной игрой, средним мелкодисперсным пенообразованием. Шампанское имеет высокую оценку (9,2 балла). Получен Патент РФ № 2526493 [4].

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении селекционных работ

и полупроизводственных испытаний нового штамма для производства шампанского генеральному директору ОАО «Дербентский завод игристых вин» (г. Дербент) М.М. Садулаеву, зам. генерального директора Ю.Л. Пальян и сотрудникам научно-производственной компании «Синтол» (Москва) в проведении генетических исследований.

Список литературы

1. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии. – М.: Высшая школа. 2002. ISBN 5-06-003560-3. – 481 с.

2. Качалкин А.В. Новые данные о распространении некоторых психрофильных дрожжевых грибов в Московской области // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 6. – С. 843–847.

3. Котенко С.Ц., Халилова Э.А., Гасанов Р.З. Биологически активные соединения шампанского, полученного с использованием нового штамма Sacharomyces cerevisiae Y-3980 // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2014. – № 2. – С. 13–16.

4. Котенко С.Ц., Садулаев М.М., Пальян Ю.Л., Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Аливердиева Д.А. Штамм дрожжей Sacharomyces cerevisiae для производства шампанского // Патент РФ № 2526493. – 2014. – Бюл. № 23.

5. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. – М.: Изд-во АН СССР. 1954. – 426 с.

6. Мартыненко Н.Н., Грачева И.М. Иммобилизованные шампанские дрожжи. Физиолого-биохимические особенности и участие в шампанизации вин (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 5. – С. 501–508.

7. Неппер D.H. Some aspects of physical chemistry, bubble and foam phenomena in sparkling wine // Proceedings of the sixth Australian wine industry technical conference. – 2006. – P. 237–246.

8. Martinez-Rodriguez A.J., Carrascosa V., Martin-Alvarez P.J., Moreno-Arribas V., Polo M. C. // Journal of industrial microbiology and biotechnology. – 2002. – Т. 29, № 6. – P. 314–322.

9. Moore S., Spackman D.H., Stein W.H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system // Anal. Chem. – 1958. – Vol. 30, № 7. – P. 1185–1190.

10. Perrot L., Charpentier M., Charpentier C., Feuillat M., Chassagne D. // Journal of industrial microbiology and biotechnology. – 2002. – № 29. – P. 134–139.

References

1. Zolotov Ju.A. Osnovy analiticheskoj himii. M.: Vysshaja shkola. 2002. ISBN 5-06-003560-3. 481 c.

2. Kachalkin A.V. Novye dannye o rasprostranenii nekotoryh psihrofilnyh drozhzhevyh gribov v Moskovskoj oblasti // Mikrobiologija. 2010. T. 79, no. 6. pp. 843–847.

3. Kotenko S.C., Halilova Je.A., Gasanov R.Z. Biologicheski aktivnye soedinenija shampanskogo, poluchennogo s ispolzovaniem novogo shtamma Sacharomyces cerevisiae Y-3980 // Proizvodstvo spirta i likerovodochnyh izdelij. 2014. no. 2. pp. 13–16.

4. Kotenko S.C., Sadulaev M.M., Paljan Ju.L., Halilova Je.A., Islammagomedova Je.A., Aliverdieva D.A. Shtamm drozhzhej Sacharomyces cerevisiae dlja proizvodstva shampanskogo // Patent RF no. 2526493. 2014. Bjul. no. 23.

5. Kudrjavcev V.I. Sistematika drozhzhej. M.: Izd-vo AN SSSR. 1954. 426 p.

6. Martynenko N.N., Gracheva I.M. Immobilizovannye shampanskie drozhzhi. Fiziologo-biohimicheskie osobennosti i uchastie v shampanizacii vin (obzor) // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. 2003. T. 39, no. 5. pp. 501–508.

7. Неппер D.H. Some aspects of physical chemistry, bubble and foam phenomena in sparkling wine // Proceedings of the sixth Australian wine industry technical conference. 2006. pp. 237–246.

8. Martinez-Rodriguez A.J., Carrascosa V., Martin-Alvarez P.J., Moreno-Arribas V., Polo M. C. // Journal of industrial microbiology and biotechnology. 2002. T. 29, no. 6. pp. 314–322.

9. Moore S., Spackman D.H., Stein W.H. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system // Anal. Chem. 1958. V. 30, no. 7. pp. 1185–1190.

10. Perrot L., Charpentier M., Charpentier C., Feuillat M., Chassagne D. // Journal of industrial microbiology and biotechnology. 2002. no. 29. pp. 134–139.

Рецензенты:

Аджиев А.Н., д.с.-х.н., профессор, генеральный директор Дагестанский научно-исследовательский, проектно-технологический институт виноградарства, садоводства и мелиорации «Агроэкопроект», г. Махачкала;

Омаров К.З., д.б.н., профессор, зав. лабораторией экологии, ФГБУН «Прикаспийский институт биологических ресурсов» Дагестанского научного центра Российской академии наук, г. Махачкала.