

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*,  
ВЫДЕЛЕННЫХ С ВИНОГРАДНИКОВ ДАГЕСТАНА

© 2016 Д.А. Абдуллабекова, Е.С. Магомедова, Г.Г. Магомедов

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, г. Махачкала

Статья поступила в редакцию 22.05.2016

Изучены физиолого-биохимические свойства дрожжей-сахаромицетов, ассоциированных с виноградом различных сортов, произрастающих в условиях Дагестана. Выявлена встречаемость среди природных популяций *S.cerevisiae* активных штаммов, биотехнологический потенциал которых перспективен для использования в виноделии при производстве натуральных вин. Исследована способность дрожжей к активному сбраживанию повышенных концентраций углеводов, продуцированию компонентов, влияющих на формирование качества вин. Полученные результаты показали целесообразность поиска среди природных дрожжей перспективных для использования в производстве спиртосодержащих напитков.

Ключевые слова: дрожжи, биопотенциал, виноград, вино

Виноградное растение является одним из естественных местообитаний дрожжевых грибов, среди которых встречается ценный и востребованный ресурсный вид *Saccharomyces cerevisiae*. Изоляция этих дрожжей из природных локусов – реальный путь для поиска штаммов, способных эффективно воздействовать на формирование качества натуральных вин. Республика Дагестан располагает богатейшими виноградными насаждениями, культивируемыми в разнообразных почвенно-климатических условиях, которые могут влиять на качество винограда, а также свойства ассоциированных с ним дрожжей, что свидетельствует о целесообразности исследования их биоразнообразия и дальнейшего скрининга перспективных для биотехнологии штаммов.

Исследовали дрожжевые сообщества, приуроченные к винограду, произрастающему в условиях микрорайона, отличающегося обилием тепла и благоприятными для виноградного растения свойствами почвы, совокупное влияние которых способствует высокому накоплению углеводов в ягодах. Вызывало интерес изучение потенциала природных дрожжей, адаптированных к этому винограду при ферментации полученного из него высокосахаристого сусла, что важно в технологии различных категорий вин, в том числе натуральных.

**Цель работы:** исследование метаболизма дрожжей *S.cerevisiae*, выделенных из виноградников Дагестана в биотехнологическом аспекте.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили дрожжевые грибы, ассоциированные с виноградом сортов Траминер, Ркацителли и Пино-гри. Грозди собирали и извлекали сок непосредственно на местах сбора с соблюдением необходимых мер стерильности, предусмотренных по микробиологии [1, 2]. Для выделения дрожжей спонтанно забродившее сусло рассевали на твердую питательную среду виноградное сусло-агар в чашках Петри и инкубировали при 18-20°C. Выросшие изолированно колонии дрожжей с

помощью бинокулярной лупы разделяли на морфологические типы. При снятии результатов посева производили выделение только колоний, вероятно относящихся к роду *Saccharomyces*, в работе не рассматривались изоляты, характер роста которых на плотных средах (цвет, консистенция, форма колоний и штриха, а также размер колоний) явно не соответствовал описаниям представителей этого рода в специальной литературе и определителях [3].

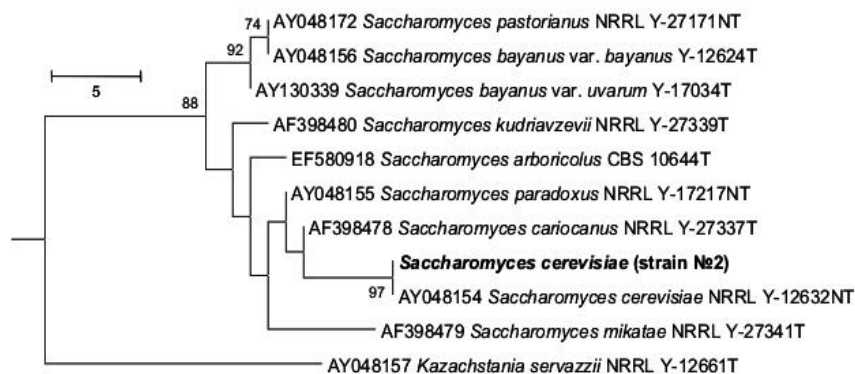
Принадлежность выделенных культур к виду *S. cerevisiae* была подтверждена генетической идентификацией проведенной на основе анализа нуклеотидных последовательностей ITS1–5.8S–ITS2 региона и D1/D2 доменов региона 26S (LSU) рДНК. Выделение ДНК и проведение ПЦР осуществляли по ранее описанной методике [4]. Для амплификации использовали праймеры ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA) и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG). Секвенирование амплифицированного региона производили в Научно-производственной компании «Синтол» (Москва). Видовая идентификация осуществлялась сравнением полученных нуклеотидных последовательностей с данными размещенными в генбанке NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных CBS (cbs.knaw.nl). Полученную нуклеотидную последовательность D1/D2 доменов региона 26S (LSU) рДНК для одного из опытных штаммов *S.cerevisiae* использовали для построения филогенетического дерева (см. рис. 1). Филогенетический анализ выполняли с помощью программ MAFFT6 и MEGA4.

Изучение изолятов с последующим скринингом потенциально перспективных для виноделия штаммов проводили по свойствам, играющим важную роль в формировании качества натуральных вин. В сброженных субстратах определяли концентрацию этанола, остаточных сахаров, титруемых и летучих кислот, диоксида серы и редуктонов. Использовались методы анализов, принятые в энохимии и описанные в специальной литературе [5]. Комплекс летучих компонентов определяли на газовом хроматографе «Кристалл-200М» с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке HP – FFAP (50м X 0,32 мм) с 10%-ным диэтиленгликольсукцинатом, газ-носитель-азот (1,8-2,7 дм/ч<sup>3</sup>).

Абдуллабекова Динаханум Абиляевна, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail: dina2407@mail.ru  
Магомедова Елена Селимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail: milena2760@rambler.ru  
Магомедов Гаджи Гасайникадиевич, научный сотрудник. E-mail: magas1951@mail.ru

**Результаты и обсуждение.** Одна из важных характеристик метаболической активности дрожжевой культуры – энергия брожения. Существует мнение, что клетки, выделенные из природы, не обладают высокой бродильной активностью, поэтому часто проводят направленную селекцию с целью ее повышения за счет снижения аэробного дыхания. Для определения скорости разложения сахаров природных культур, опыты ставили на 5 штаммах в склянках, вместимостью 100 см<sup>3</sup>, закрытых пробками с отверстием, куда вставляли трубку с тонко оттянутым концом для выхода углекислого газа и предотвращения испарения бродящего

сусла. Двухсуточные дрожжевые разводки инокулировали в склянки с виноградным суслом из расчета 3 млн. клеток на 1 см<sup>3</sup> и по ежедневной убыли в массе, соответствующей количеству выделившегося диоксида углерода судили о скорости сбраживания сахаров. Объем сусла в склянках составлял 70 мл, массовая концентрация сахаров в первом варианте была на уровне 21,5 г/100 см<sup>3</sup>(контроль), а во втором концентрация сахаров за счет введения глюкозы доводилась до 27,7 г/100 см<sup>3</sup>(опыт). Температура брожения колебалась в пределах 25-27°C.



**Рис. 1.** Филогенетическое положение штамма *S. cerevisiae* (№2) полученное методом максимальной экономии (Maximum Parsimony analysis) на основании выровненных нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов 26SpДНК. Номера, данные над разветвлениями, соответствуют частоте (>55%) соединения таксонов при 1000 построений. Шкала показывает число замен на длину используемых для анализа нуклеотидных последовательностей (567 п.н.). *U72163 Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229T – скрытая внешняя группа

Согласно полученным результатам, энергия брожения зависела от индивидуальных физиологических свойств штаммов и массовой концентрации сахаров в среде. Динамика процесса выявила общую закономерность – первые трое суток скорость разложения сахаров в контрольных образцах превышала опытные в 1,5-1,9 раза, далее в опыте она была выше, чем в контроле, а через 15-18 суток уровень выброженных сахаров в обоих вариантах практически совпадал. Высокая бродильная активность у штаммов, наблюдаемая в контроле и опыте в течение 6 и 9 суток, соответственно, сменялась медленным дображиванием. Количество сброженных углеводов за этот период составило – в опыте 76,5-82,5%, в контроле – 86-90%. В контрольном варианте все штаммы, кроме одного завершили брожение насухо через 15-18 суток, а в опыте через 39 суток при остаточных сахарах от 3,8-5,4 г/100 см<sup>3</sup>, что объяснимо анаэробными условиями, созданными в эксперименте и образующимся спиртом, угнетающим жизнедеятельность дрожжей. Таким образом, физиологическая активность клеток в условиях высокой концентрации сахаров, степень проявления которой зависит от индивидуальных особенностей исследованных штаммов, свидетельствовала об их быстрой адаптации к факторам, ингибирующим метаболизм дрожжей – осмотическому давлению и спирту.

Согласно полученным данным, среди сахаромицетов, выделенных с винограда, встречаются культуры, обладающие достаточно высокой энергией брожения, что, возможно, возникает в процессе естественной селекции дрожжей при акклиматизации к среде обитания. Изучение штаммовых признаков природных изолятов включало также определение их

способности к синтезу летучих соединений, играющих важную роль, как в обмене веществ дрожжевой клетки, так и в создании ароматообразующего комплекса вин. Известно, что дрожжи способны продуцировать летучие соединения различного химического состава – эфиры, кетоны, альдегиды, кислоты и спирты, каждое из которых индивидуально или в сочетании друг с другом может создавать нюансы аромата. Качественный состав, общая сумма и доля в ней каждого из этих компонентов, в определенной мере являются индикатором характера брожения. Механизм биосинтеза летучих соединений дрожжевой клеткой сложен, протекает по различным схемам и зависит от многих факторов – физико-химического состояния сбраживаемого сусла, в значительной мере обусловленного сортом винограда, индивидуальных физиолого-биохимических свойств штамма, условий и режимов протекания брожения.

Наша задача состояла в изучении способности опытных дрожжей, выделенных с винограда, к продуцированию летучих соединений при их культивировании на высокосахаристом сусле, используемом для производства натуральных вин. Дрожжевые клетки культивировали на пастеризованном сусле из двух сортов винограда – Ркацители и Таминер с концентрацией сахаров 28,0 г/100 см<sup>3</sup>, для достижения которой вводили глюкозу. Двухсуточные дрожжевые разводки инокулировали в количестве 3% и проводили брожение до его естественной остановки. Концентрация остаточных сахаров в сброженном субстрате колебалась в пределах 0,4-2,4 г/100 см<sup>3</sup>, в зависимости от индивидуальных свойств штаммов.

Исследования биосинтезирующей способности дрожжей по изучаемому признаку, проведенные на 4

разных штаммах, два из которых - №№1,2, вводили в сусло Ркацители, а два других - №№3,4 – в Траминер, показали, что качественный состав идентифицированных альдегидов, кетонов, сложных эфиров и высших спиртов во всех образцах был идентичен и характерен для белых вин, полученных на дрожжах вида *S. cerevisiae*, а их количество варьировало по вариантам (табл. 1). Согласно полученным данным, карбонильные соединения представлены ацетальдегидом и ацетоном, продуцируемыми в количествах, мг/дм<sup>3</sup> - 13,5-24,2 и 0,3-1,2, соответственно. В группе сложных эфиров, образуемых при брожении под действием эстераз дрожжей, этилацетат закономерно превалировал во всех вариантах в 9-17 раз по отношению к метилацетату. Высшие спирты, наряду с этанолом синтезируемые при брожении, с одной стороны способствующие образованию аромата вин, а с другой, являясь токсичными примесями, значительно преобладали во всех образцах. Основная доля в их сумме приходилась на изоамиловый спирт, за ним следовали изобутанол и 1-пропанол, что в основном характерно для сивушных спиртов. Из алифатических спиртов также обнаружены 1-бутанол и гексанол, в практически равных количествах, мг/дм<sup>3</sup>: 1,2-2,1 и 1,4-1,8, соответственно. Штаммы незначительно различались по способности к продуцированию ароматического спирта фенолэтанола, наличие которого отмечалась в пределах 27,5–34,2 мг/дм<sup>3</sup>.

Вопрос об участии того или иного компонента в аромате и букете вин обычно рассматривается в тесной связи с его запахом, уровнем в среде и пороговой концентрацией. Известно, что из идентифицированных продуктов брожения неблагоприятное воздействие, в силу их резких неприятных, удушливых запахов могут оказать ацетальдегид и высшие спирты алифатического ряда - изоамилол, изобутанол, 1-бутанол. Другим спиртам - гексанолу и 1-пропанолу присущи фруктовый аромат и сладкий эфирный запах. Значительно

облагораживает букет вин спирт с бензольным ядром 2-фенилэтанол, придающий ему оттенки розы, мёда. Эфирный, фруктово-ягодный запах присущ этилацетату, как всем сложным эфирам, образованным из алифатических кислот и спиртов. Подвижные жидкости с приятным ароматом представляют из себя низшие алифатические кетоны, представителем которых является ацетон. Приводимые в литературе значения пороговых концентраций летучих компонентов, образующих букет брожения, значительно колеблются, так как зависят от состава вин. Поэтому, выявление возможности влияния исследуемых соединений в количествах, продуцируемых опытными штаммами на органолептику вин, провели в сравнении с пороговыми концентрациями на воде [6]. Так, например, для эфиров она составляет 1,0 мг/ дм, вследствие чего даже малые количества этих соединений могут значительно отразиться на органолептической характеристике вина. Из идентифицированных высших спиртов, главным образом на аромат вин могут влиять изоамилол, гексанол и фенолэтанол, синтезируемые в количествах (табл. 1), значительно превышающих их пороговые концентрации - 3,0;7,0; 5,0 мг/дм<sup>3</sup>, соответственно. Низкие концентрации 1-пропанола,1-бутанола и изобутанола, у которых пороговые концентрации по воде составляют, мг/ дм<sup>3</sup> 300,0; 100,0 и 80,0, вероятно, в меньшей мере могут быть значимыми составляющими аромата. В сумме, количество высших спиртов во всех образцах варьировало незначительно, от 202,4 мг/дм<sup>3</sup> до 236,9 мг/дм<sup>3</sup>, приближаясь к среднему уровню - 250 мг/дм<sup>3</sup>, характерному для сивушных спиртов, образующихся при сбраживании виноградного сусла [7]. Таким образом, летучий ароматообразующий комплекс, синтезируемый исследуемыми штаммами при естественном доступе кислорода, pH и температуре, благоприятных для броидильной активности дрожжей, в определенной мере свидетельствует об их нормальной метаболической деятельности в высокосахаристом сусле.

**Таблица 1.** Состав компонентов летучего комплекса сброженных субстратов

| Показатели           | Массовая концентрация, мг/ дм <sup>3</sup> |             |            |            |
|----------------------|--------------------------------------------|-------------|------------|------------|
|                      | сусло / штамм                              |             |            |            |
|                      | Ркацители-1                                | Ркацители-2 | Траминер-3 | Траминер-4 |
| альдегиды            |                                            |             |            |            |
| ацетальдегид         | 13,5                                       | 16,4        | 18,2       | 24,2       |
| кетоны               |                                            |             |            |            |
| ацетон               | 0,3                                        | 0,6         | 1,2        | 1,2        |
| сложные эфиры        |                                            |             |            |            |
| метилацетат          | 1,2                                        | 1,3         | 2,1        | 1,9        |
| этилацетат           | 17,2                                       | 21,7        | 19,3       | 23,5       |
| высшие спирты        |                                            |             |            |            |
| пропанол-1           | 23,4                                       | 19,3        | 21,7       | 18,4       |
| изобутанол           | 30,8                                       | 31,5        | 28,1       | 19,6       |
| бутанол-1            | 2,1                                        | 1,6         | 1,2        | 1,2        |
| изоамилол            | 145,5                                      | 150,0       | 132,5      | 127,6      |
| гексанол             | 1,5                                        | 1,6         | 1,8        | 1,4        |
| фенилэтанол          | 27,5                                       | 32,9        | 29,3       | 34,2       |
| сумма высших спиртов | 230,8                                      | 236,9       | 214,6      | 202,4      |

Известно, что исходная концентрация углеводов и аминокислот, участвующих в биосинтезе высших спиртов, а также их количество, утилизируемое при брожении, способны воздействовать на сумму и качественный состав образующихся высших спиртов, однако не все авторы подтверждают прямую коррелятивную связь между ними. Идентифицированные в условиях наших экспериментов сивушные спирты, образованные при утилизации 25,6-27,6 г/100 см<sup>3</sup> сахаров, в

зависимости от штамма, в количественном и качественном отношении находились в пределах, отмечаемых обычно в сухих белых виноматериалах, полученных из сусел с кондиционной для них сахаристостью [8]. Исследование опытных виноматериалов, полученных из сортов винограда Траминер и Пино-гри (сахаристость сусла 28,2 г/100 см<sup>3</sup>) по основным физико-химическим показателям показало варьирование их значений, свидетельствующее о различной степени проявления

физиолого-биохимической активности опытных штаммов. Концентрации компонентов колебались в следующих пределах: этанол 14,2-14,7% об., остаточные сахара 0,4-1,2 г/100 см<sup>3</sup>, титруемые кислоты 7,0-8,1 г/дм<sup>3</sup>, летучие кислоты 0,4-0,9 мг/дм<sup>3</sup>, диоксид серы 7,3-12,8 мг/дм<sup>3</sup>, редуктоны 4,9-11,4 мг/дм<sup>3</sup>. Виноматериалы, полученные на основе жизнедеятельности опытных штаммов, способных к сбраживанию высокосахаристых сред имели хорошие органолептические характеристики и высокие дегустационные оценки. Экспериментальные образцы вин, были прозрачными, имели соломенный цвет, гармоничный вкус, тонкий нежный аромат с тонами, присущими данным сортам.

**Выводы:** исследования, направленные на поиск дрожжей-сахаромицетов, ассоциированных с виноградом, показали их целесообразность для скрининга ресурсных штаммов *S.cerevisiae*. Выявлена встречаемость среди природных популяций этого вида культур, способных к активному сбраживанию сред с повышенной концентрацией углеводов и формированию состава и качества сброженного субстрата,

отвечающего требованиям, предъявляемым к натуральным винам различных типов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Бурьян, Н.И. Микробиология виноделия. 2-е изд. Доп.- Симферополь: «Таврия», 2002. 403 с.
2. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей / И.П. Бабьева, В.И. Голубев. – М.; Пищевая промышленность, 1979. 116 с.
3. Kurtzman, C.P. The yeasts, a taxonomic study / C.P. Kurtzman, J.W Fell (eds.) – Amsterdam et al.: Elsevier, 2011. 2080 p.
4. Качалкин, А.В. Новые данные о распространении некоторых психрофильных дрожжевых Грибов в Московской области // Микробиология. 2010. Т. 79, №6. С. 843- 847.
5. Методы теххимического контроля в виноделии / под ред. В.Г. Гержаковой. - Симферополь: Таврида, 2009. 309 с.
6. Шприцман, Э.М. Влияние приёмов стабилизации на летучие компоненты вин / Э.М. Шприцман, И.В. Аронина // Виноградарство и виноделие СССР. 1978. №4. С. 24-27.
7. Родопуло, А.К. Основы биохимии виноделия. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 239 с.
8. Нилов, В.И. Химия виноделия / В.И. Нилов, И.М. Скурихин. – М.: «Пищевая промышленность», 1967. 441 с.

### BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, SELECTED FROM VINEYARDS IN DAGESTAN

© 2016 D.A. Abdullabekova, E.S. Magomedova, G.G. Magomedov

Pre-Caspian Institute of Biological Resources DSC RAS, Makhachkala

Physiological and biochemical properties of grapes-associated *S. cerevisiae* gathered from Daghestan vineyards are studied. It is revealed the occurrence of active strains among the natural population of *S. cerevisiae*, which have a promising biotechnological potential for natural wine making. It is investigated the ability of yeasts to active fermentation of high concentration carbohydrates and production of components influencing on a wine quality. Obtained data show the expedience to search strains among natural yeasts feasible for alcoholic beverage production.

Key words: yeasts, biopotencial, grapes, wine

Dinahanum Abdullabekova, Candidate of Technical Sciences, Leading Research Fellow. E-mail: dina2407@mail.ru  
Elena Magomedova, Candidate of Biology, Leading Research Fellow. E-mail: milena2760@rambler.ru  
Gadji Magomedov, Research Fellow. E-mail: magas1951@mail.ru