

УДК 579.25:579.6:663.252

## ПРИРОДНЫЕ ШТАММЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВИН ТИПА ХЕРЕС

© 2020 г. С. А. Кишковская<sup>1</sup>, Т. Н. Танащук<sup>1</sup>, М. Ю. Шаламитский<sup>1</sup>, В. И. Загоруйко<sup>1</sup>, М. И. Ширяев<sup>2</sup>, Д. А. Авданина<sup>2</sup>, М. А. Эльдаров<sup>2</sup>, Н. В. Равин<sup>2</sup>, А. В. Марданов<sup>2</sup>, \*

<sup>1</sup>Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “Магарач” РАН, Ялта, 298600 Россия

<sup>2</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

После доработки 20.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Предложен методический подход к поиску перспективных для производства вина типа херес природных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, основанный на их первичном отборе с использованием генетических маркеров и последующем изучении их энологических свойств. Из образцов винограда выделено 96 штаммов дрожжей *S. cerevisiae*. Генотипирование штаммов выявило у 82 характерную для “винных” штаммов аллель спейсера ITS1 генов рибосомной РНК, а 14 имели аллель, характерную для французских “хересных” штаммов. Аллели, специфичной для испанских “хересных” дрожжей, не были обнаружены. У 11 штаммов в промоторе гена адгезина *FLO11* найдена типичная для “хересных” дрожжей делеция размером 111 п. н., а специфическая аллель гена *YDR379C-A* выявлена у 20. В целом, 28 штаммов обладали хересной аллелью хотя бы для одного из трех локусов, а 21 из них образовывал пленку на поверхности сброженного виноградного сусла. По результатам генетических исследований и оценки энологических свойств были отобраны 5 штаммов, характеризующихся наличием хересных аллелей для трех локусов, а также способных к пленкообразованию. Испытание штаммов в условиях микровиноделия позволило рекомендовать 2 штамма в качестве наиболее перспективных для дальнейшей производственной селекции.

**Ключевые слова:** хересные дрожжи, *Saccharomyces cerevisiae*, ITS, Flo11, генотипирование, физиолого-биохимические свойства, пленкообразование, альдегидообразование

DOI: 10.31857/S055510992003006X

Херес – вино с уникальными особенностями букета и вкуса, которые приобретаются в результате длительной биологической выдержки вино-материала под дрожжевой пленкой. Важная роль хересных дрожжей в производстве вин типа херес хорошо известна [1–3], так как в промышленном масштабе это вино без специальных штаммов дрожжей получить невозможно. Традиционно для этих целей используют дрожжи, относящиеся по принятой в виноделии систематике В.И. Кудрявцева [4] к виду *Saccharomyces oviformis* var. *chervisiensis*. По современной систематике [5] они относятся к *Saccharomyces cerevisiae*.

В сравнении с бродильными штаммами *S. cerevisiae* хересные дрожжи имеют отличительные характеристики. Основными из них являются их способность формировать пленку на поверхности вино-материала и в этих условиях роста окислять этанол в ацетальдегид под действием алкогольдегидрогеназы. Пленкообразование и окислитель-

ный метаболизм являются адаптационными механизмами, которые позволяют клеткам выживать при таких условиях.

Сведения о свойствах хересных дрожжей получены в основном при изучении производственных хересных популяций [1, 2, 6, 7]. Однако вопросы происхождения и распространения хересных дрожжей остаются не решенными. Так не было известно, встречаются ли они на винограде в природе или их можно обнаружить только в производственных условиях, в которых они сформировались в результате длительной селекции.

Использование современных геномных и постгеномных инструментов способствует углублению представлений о природе молекулярных различий, лежащих в основе фенотипического разнообразия дрожжей-сахаромицетов, связи между их молекулярно-генетическими данными и биотехнологическими свойствами [8, 9]. Следует ожидать, что эти знания будут способствовать

разработке стратегий отбора и селекции новых промышленно ценных штаммов хересных дрожжей *S. cerevisiae*, направленных на совершенствование технологии производства вин типа Херес.

Цель работы – выделение природных штаммов дрожжей и отбор на основании изучения их молекулярно-генетических и энтологических свойств перспективных штаммов для производства вин типа Херес пленочным способом.

## МЕТОДИКА

**Объекты исследования.** Объектами исследования служили природные изоляты дрожжей, выделенные в сезоны виноделия 2016 и 2018 гг. из 101 пробы винограда, произрастающего в виноградо-винодельческих хозяйствах шести климатических зон Республики Крым [10] и Ростовской области (Россия). Количество отобранных штаммов дрожжей зависело от количества исследованных виноградных участков климатической зоны и сортового состава винограда. Контролем служил селекционный штамм I-329 из коллекции микроорганизмов виноделия “Магарач” (КМВ “Магарач”, Россия), применяемый в производстве вин типа Херес.

**Выделение природных штаммов дрожжей.** Здоровые неповрежденные ягоды винограда отделяли от гребней, дробили и оставляли на 4 ч. Полученную мезгу отжимали, сусло разливали в склянки, закрытые ватно-марлевой пробкой. Через 48 ч после начала брожения пробы сусла высевали на агаризованное виноградное сусло и инкубировали при  $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Характерные для дрожжей-сахаромилцетов колонии переносили в пробирки с виноградным суслом и культивировали при температуре  $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$  до появления признаков брожения.

**Среда и условия культивирования.** Среда и условия культивирования описанные ранее [7] соответствовали требованиям и рекомендациям по приготовлению вин типа херес [11]. Дрожжи культивировали при  $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$  в пастеризованном виноградном сусле из винограда сорта Алиготе с массовой концентрацией сахаров 210 г/л, титруемых кислот 7.0 г/л и рН 3.2. Для инокуляции использовали 2-суточную дрожжевую разводку в физиологически активном состоянии, содержащую 60–80 млн кл/мл, количество почкующихся клеток не менее 30% и мертвых клеток не более 2% [1].

Морфологию и физиологическое состояние клеток описывали при микроскопировании на стадии активного роста (2–3-суточная культура), осадок – визуально на стадии осветления выбродившего сусла. Размеры клеток определяли по цифровым изображениям, используя световой микроскоп XY-B2 (“Ningbo Sunny Instruments”, Китай) и компьютерную программу “Image Scope M”.

**Бродильная способность штаммов.** Бродильную способность оценивали при культивировании на пастеризованном виноградном сусле в колбах объемом 100 мл. В сусло вносили дрожжевую разводку из расчета  $2 \times 10^6$  кл/мл, закрывали бродильными затворами и инкубировали при  $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , ежедневно взвешивая. По окончании процесса брожения (отсутствие изменения массы) в виноматериалах определяли концентрацию сахаров, спирта, летучих кислот и альдегидов.

**Способность штаммов образовывать сероводород.** Способность к выделению сероводорода изучали на плотной питательной среде BIGGY (“Merck”, Германия) [12]. Посевы культивировали в течение 24 ч при температуре  $30^\circ\text{C}$ . Присутствие  $\text{H}_2\text{S}$  в среде оценивали визуально, используя следующую шкалу: белый цвет – сероводород не образуется; светло-коричневый цвет – низкое образование сероводорода; темно-коричневый цвет – среднее образование сероводорода; черный цвет – высокое образование сероводорода.

**Способность штаммов к пленкообразованию.** Способность штаммов к пленкообразованию определяли по росту пленки на поверхности сброженного сусла. В лабораторных условиях пастеризованное виноградное сусло сбраживали в склянках объемом 100 мл, в условиях микровиноделия использовали свежееотжатое сусло, которое сбраживали в 3-литровых баллонах. Образцы закрывали ватно-марлевыми пробками и инкубировали при  $18 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Разводку дрожжей вносили в количестве 2%. Рост пленки на поверхности фиксировали ежедневно после окончания брожения: начало роста – при наличии первых островков, окончание – при зарастании всей поверхности. Состояние пленки оценивали визуально [7].

**Энтологические свойства.** При проведении исследований были использованы подходы и методы, общепринятые в микробиологии виноделия. Дрожжи оценивали по показателям, принятым при проведении селекции промышленных штаммов дрожжей для производства виноградных вин [11].

**Аналитические исследования.** Массовую концентрацию летучих кислот определяли по ГОСТ 32001-2012, массовую концентрацию альдегидов по ГОСТ 12280-75. Содержание остаточных сахаров и этилового спирта определяли высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке Supelcogel C610H на хроматографе LC Prominence (“Shimadzu”, Япония).

**Таксономическая идентификация природных штаммов и их генотипирование по ITS маркерам.** Предварительную идентификацию изолятов на принадлежность к роду *Saccharomyces* проводили классическими методами по стандартным характеристикам: морфология клеток, способ вегетативного размножения, способность к спорообразованию, морфология аскоспор [13]. Выделение

препаратов ДНК из клеток дрожжей осуществляли по методике, описанной ранее [7]. Для молекулярно-генетической идентификации и отнесения к “винным” или “хересным” штаммам дрожжей использовали метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) ПЦР-фрагментов участков повтора рДНК, включающих два “внутренних транскрибируемых спейсера” (ITS1 и ITS2) и ген 5.8 рРНК [14]. Для ПЦР использовали праймеры *Its1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и *Its4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазой *HaeIII* и после анализа электрофореграмм относили штаммы к “винным” или к “хересным”. Для “винных” штаммов дрожжей *S. cerevisiae* характерно образование фрагментов размером 311, 230, 172 и 128 п.н., а для “хересных” – 311, 230, 148 и 129 п.н. Для отнесения “хересных” штаммов дрожжей *S. cerevisiae* к “французскому” или “испанскому” типу проводили обработку ПЦР-фрагментов рестриктазой *HhaI*. Для “испанских” аллелей характерно образование фрагментов размером 342, 340 и 133 п. н., для “французских” – 364, 336 и 132 п. н. [14]. Если полученные в результате ПДРФ анализа фрагменты по длинам не были характерны для дрожжей вида *S. cerevisiae*, то эти ПЦР-фрагменты секвенировали по методу Сенгера на ABI 3730 (“Applied Biosystems”, США) и проводили таксономическую идентификацию штамма на основе анализа полученных последовательностей.

**Анализ полиморфизма промотора гена *FLO11*.** Штаммы, несущие “полноразмерный” и “укороченный” (делеция размером 111 п. н.) варианты промотора гена *FLO11*, выявляли методом ПЦР-анализа с праймерами *Flo11D.REV* (5'-TTTGGGCGACATTTCTTGT-3') и *Flo11D.FOR* (5'-CCACGGGTGAGATTGTTCT-3'). Регистрировали образование фрагментов размером около 400 или 300 п. н., характерных для этих двух аллелей гена *FLO11*, “хересного” и “винного” соответственно [15].

**Анализ полиморфизма гена *YDR379C-A*.** Для выявления штаммов с винными и хересными аллельными вариантами данного гена использовали ПДРФ-анализ ПЦР-фрагментов, полученных с праймерами *F\_sdh6* (5'-TCGCGTCAACTTGTTTTGGAG-3') и *R\_sdh6* (5'-ATTCGTCAGTTCAGGGTG TGA-3'). Фрагменты, имевшие длину 885 п. н., обрабатывали рестриктазой *AflIII* [16]. Для “хересных” аллелей наблюдали образование фрагментов 500 и 385 п. н. У “винных” аллелей размер фрагмента оставался неизменным.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Идентификация природных изолятов дрожжей и формирование рабочей коллекции штаммов рода *Saccharomyces*.** Из 101 пробы винограда выделено

и проанализировано 626 изолятов дрожжей. По результатам оценки их морфолого-культуральных свойств на принадлежность к роду *Saccharomyces* отобрали 102 штамма дрожжей (табл. 1), для которых отмечена морфологическая однородность и спорообразование. Клетки дрожжей округлой, яйцевидной и овальной формы, средних и крупных размеров, округлые –  $(5.35 \pm 0.34)$  мкм; яйцевидные –  $(4.05 \pm 0.85) \times (5.65 \pm 0.5)$  мкм и овальные –  $(7.15 \pm 0.66) \times (3.54 \pm 0.58)$  мкм; размножение почкованием, споры округлые гладкие, от 1 до 4 в аске. Необходимо отметить, что многие природные штаммы дрожжей отличаются дефектами споруляции, а в асках часто содержится менее 4 спор [17].

**Генотипирование отобранных штаммов дрожжей.** Генотипирование на основании анализа участка межгенного спейсера рДНК подтвердило принадлежность 96 из 102 отобранных штаммов к виду *S. cerevisiae*. По данным секвенирования ITS последовательностей остальные 6 штаммов были отнесены к видам *Starmerella bacillaris* (1 штамм), *Lachancea thermotolerans* (3 штамма) и *Torulaspota delbrueckii* (2 штамма). Эти виды часто встречаются в природе на поверхности ягод винограда [18]. Таким образом, была сформирована рабочая коллекция из 96 штаммов дрожжей *S. cerevisiae*.

По данным анализа ITS локуса 82 штамма имели последовательность, характерную для “винных” штаммов и 14 – для “французских хересных” [14], а “испанских хересных” аллелей у анализируемых штаммов обнаружено не было (табл. 2).

Для многих “хересных” штаммов характерна делеция размером 111 п. н. в положении от [–1313] до [–1203] промотора гена адгезина *FLO11*, приводящая к усилению его экспрессии [15]. Такая делеция присутствовала у 4 штаммов, а еще 7 штаммов были гетерозиготными (табл. 2). Повидимому, штаммы с гетерозиготными аллелями были диплоидами или полиплоидами, что достаточно широко распространено среди природных и промышленных штаммов [19].

Также для генотипирования использовали ПДРФ маркер локуса *YDR379C-A*, разработанный на основании сравнения геномов хересных и винных штаммов. Данный локус, кодирующий SDH6-субъединицу митохондриальной сукцинатдегидрогеназы, содержит полиморфизмы, характерные для хересных штаммов дрожжей [16]. Один из SNP приводит к образованию у хересных штаммов сайта *AflIII*, что позволяет отличать “хересные” аллели от “винных” методом ПДРФ. Специфические для хересных дрожжей аллели гена *YDR379C-A* были выявлены у 17 штаммов, при этом 3 штамма были гетерозиготными (табл. 2).

Пять штаммов (№ 3, 23, 109, 111, 113) оказались “хересными” по всем трем маркерам и могли ока-

**Таблица 1.** Происхождение выделенных штаммов дрожжей

Регион выращивания винограда		Номера штаммов, выделенных в 2016 г.	Номера штаммов, выделенных в 2018 г.
Ростовская область Бегаевский р-н		1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 24, 25, 27, 29, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 49, 50, 51, 54, 55, 56, 57, 58	—
Республика Крым	Южный берег Крыма	7, 9, 13, 22, 26, 30, 35, 52	76, 87, 88, 89, 90, 91, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 108, 109, 110, 111, 112, 113
	Предгорный район	16, 17, 19, 21, 23, 28, 42, 43, 45, 46, 47, 53	—
	Западный предгорно-приморский район	39	60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 92, 93, 94, 95, 96, 106, 107
	Горно-долинный приморский район	11	—
	Горно-долинный	—	70, 71, 74, 75, 105
	Западный приморско-степной район	—	84, 85, 86

**Таблица 2.** Генотипирование природных штаммов дрожжей *S. cerevisiae*\*

Число штаммов	Номер штамма	ITS	FLO11	YDR379C-A
68	1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 29, 30, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 47, 50, 51, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 80, 81, 82, 83, 87, 88, 89, 91, 92, 95, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105, 106, 107	W	W	W
1	53	W	F/W	W
2	52, 90	W	F	W
5	45, 49, 78, 79, 112	W	W	F
3	71, 97, 108	W	W	F/W
1	110	W	F	F
2	46, 54	W	F/W	F
5	19, 28, 74, 75, 76	F	W	W
4	4, 18, 27, 77	F	W	F
4	3, 109, 111, 113	F	F/W	F
1	23	F	F	F
Контроль	I-329	F	F	F

\* Показано распределение аллелей, характерных для винных (W) и хересных (F) штаммов; F/W, — гетерозиготы.

заться перспективными для дальнейшей селекционной работы.

**Энологическая характеристика выделенных штаммов дрожжей на стадии сбраживания виноградного суслу.** Паспортизация промышленно-ценных культур винных дрожжей, наряду с общеприняты-

ми микробиологическими подходами, предполагает исследование их свойств, соответствующих технологии получения вин определенного типа. При рекомендации штаммов для виноделия, прежде всего, исследуют их бродильную способность и образование ими летучих кислот. Низкая

Таблица 3. Энологическая характеристика отобранных штаммов *S. cerevisiae*

Штамм, №	Способность к синтезу H <sub>2</sub> S*	Пленкообразование**	Концентрация в вино материале			Объемная доля этилового спирта, %	Изменение количества альдегидов после выдержки на осадке, мг/л
			сахаров, г/л	летучие кислоты, г/л	альдегиды, мг/л		
3	++	+	1.9	0.78	65.9	12.6	+64.6
4	++	–	2.9	0.75	67.8	12.7	0
18	++	–	1.7	0.45	134.0	13.2	0
19	–	++	0.2	0.37	71.3	13.0	+79.4
23	++	++	2.3	0.46	105.6	13.1	+143.4
27	++	–	1.9	0.56	98.7	12.9	0
28	–	+++	0.9	0.35	73.0	12.8	+723.4
45	+	+++	1.9	0.64	84.5	12.2	+751.5
46	++	++	2.1	0.54	95.6	12.3	+25.0
49	++	++	2.8	0.72	91.9	12.3	+88.3
52	++	+	1.8	0.6	27.8	12.3	+68.9
53	–	+++	1.1	0.21	34.3	12.9	+748.9
54	+	++	0.1	0.59	148.7	12.7	+704.9
71	+	+	0.2	0.5	75.7	12.6	+95.9
74	–	+	0.4	0.6	37.8	12.7	+120.6
75	–	–	0.1	0.69	128.5	12.5	0
76	+	–	0.6	0.81	124.9	12.5	0
77	–	+	0.8	0.8	184.0	12.6	+26.0
78	–	+	0.6	0.75	154.9	12.6	0
79	–	++	2.1	0.7	91.5	12.9	+66.9
90	+	–	2.1	0.3	45.6	12.1	0
97	–	+	0.8	0.4	202.4	12.9	0
108	+	+	0.5	0.24	183.0	12.7	0
109	–	+	0.3	0.72	283.4	12.7	+42.2
110	–	+	0.7	0.9	253.4	12.5	+10.6
111	+	+++	0.6	0.66	279.8	12.9	+130.0
112	–	–	1.6	0.54	176.0	12.3	0
113	–	++	1.2	0.87	176.0	12.6	+83.6
Контроль I-329	+	+++	1.2	0.1	179.6	12.7	+335.2

\* Способность к образованию сероводорода: – отсутствует, + – слабая, ++ – средняя.

\*\* Способность к пленкообразованию: – отсутствие пленки, + – пленка в виде единичных островков, ++ – пленка до 2/3 площади поверхности, +++ – пленка на всей поверхности.

бродильная активность штаммов, связанная с неполным выражением сахаров виноградного сула, может быть одним из факторов, отрицательно влияющим на формирование пленки [20]. Активность гена адгезина *FLO11*, играющего ключевую роль в формировании дрожжевой пленки, подавляется, когда в среде присутствует глюкоза [21].

Энологические характеристики определяли для 28 штаммов, имевших “хересный” аллель хотя бы в одном из трех локусов, по которым проводили генотипирование (табл. 2). Исследование их

бродильной способности показало, что штаммы в оптимальные для виноделия сроки полностью сбраживали сахар с образованием спирта в диапазоне 12.1–13.1 об. %. Отмечены существенные отличия штаммов по синтезу летучих кислот, количество которых в вино материале варьировало от 0.21 до 0.90 г/л (табл. 3).

Одним из основных критериев при выборе штамма дрожжей для первичного виноделия является его способность при брожении образовывать сероводород. Образование сероводорода при

**Таблица 4.** Скорость образования пленок природными штаммами дрожжей

Штамм, №	Продолжительность брожения на виноградном сусле, сут	Рост пленки, сут			
		на сброженном сусле		на виноматериале	
		начало	по всей поверхности	начало	по всей поверхности
3	15	8	20	2	7
23	15	10	20	4	9
111	17	10	20	8	18
113	18	12	25	8	20
I-329 (контроль)	11	10	18	2	6

брожении виноградного сула во многом зависит от штамма дрожжей и относится к наследственным признакам [23]. Однако присутствие сероводорода в вине в количествах, превышающих порог вкусовой чувствительности, может привести к появлению посторонних тонов [22]. Способность к образованию сероводорода при брожении виноградного сула во многом зависит от штамма дрожжей и является наследственным признаком [23]. Исследование способности выделенных штаммов к образованию  $H_2S$  (по его наличию в питательной среде) показало, что 13 изолятов не проявляли заметной способности к его синтезу, 7 изолятов являлись слабыми продуцентами, а 8 изолятов характеризовались как среднеактивные продуценты.

Важной отличительной особенностью хересных дрожжей является их способность к поверхностному росту на виноматериале. Исследование этой способности у 28 отобранных штаммов показало, что 21 штамм из них образовывал пленку на поверхности сброженного сула (табл. 3).

Для хересных виноматериалов основным технологическим показателем является концентрация альдегидов, количество которых при удалении виноматериала из-под пленки должно составлять не менее 350 мг/дм<sup>3</sup>. Штаммы хересных дрожжей могут значительно отличаться по образованию альдегидов и способствовать накоплению в виноматериале альдегидов, содержание которых может достигать 900 мг/дм<sup>3</sup> [7]. Исследуемые штаммы обладали различной способностью к синтезу альдегидов. Так, в сброженном сусле содержание альдегидов составляло от 27.8 (№ 52) до 283.4 мг/л (№ 109). При последующей двухмесячной выдержке образцов наблюдали увеличение количества альдегидов у 17 штаммов дрожжей, проявивших способность к поверхностному росту (табл. 3). Максимальный прирост альдегидов в образцах (около 700 мг/л) был отмечен для дрожжей с высокой пленкообразующей способностью, а отсутствие заметных изменений – дрожжей, не образовавших пленку.

**Отбор перспективных штаммов *S. cerevisiae* для производства вин типа Херес.** Для выбора перспек-

тивных для производства хересных вин штаммов дрожжей-сахаромицетов были проанализированы результаты молекулярно-генетических исследований (табл. 2) и энологические характеристики (табл. 3) 28 штаммов, имеющих “хересные” аллели.

Исследование энологических свойств образцов виноматериалов показало, что все они соответствовали требованиям, предъявляемым к виноматериалам для получения вин типа Херес.

Из 11 штаммов, имеющих хересные аллели (в гомо- или гетерозиготном состоянии) по гену *FLO11*, 10 проявляли способность к образованию пленки на поверхности виноматериала. Из 20 штаммов, имеющих хересные аллели по маркеру *YDR379C-A*, 16 – также обладали способностью образовывать пленку. При выдержке под пленкой штаммы проявляли различную способность к накоплению альдегидов.

По результатам генетических исследований и оценки энологических свойств из 28 генетически “хересных” штаммов было отобрано 5 (№ 3, 23, 109, 111 и 113), характеризующихся наличием хересных аллелей для трех локусов, способностью к поверхностному росту на сброженном виноградном сусле и образованию альдегидов в процессе выдержки.

**Апробация штаммов дрожжей в условиях микро-виноделия.** Отобранные в лабораторных условиях штаммы № 3, 23, 109, 111 и 113 были испытаны в условиях микровиноделия. Проводили контроль выбраживания сахаров, начала роста пленки и момента полного покрытия ею поверхности сброженного сула. На данном этапе штамм № 109 был снят с эксперимента из-за появления при брожении сула посторонних тонов. Показатели скорости поверхностного роста у штаммов оказались близкими (табл. 4). Так, начало поверхностного роста дрожжей с момента окончания брожения составило в среднем 10 сут, а полное зарастание поверхности сброженного сула – 10–13 сут. По пленкообразующей способности опытные штаммы были близки к контрольному, за исключением штамма № 113, сформировавшего пленку на 7 сут позднее. По химическому составу и органолепти-

**Таблица 5.** Химический состав виноматериалов биологически выдержанного сброженного суслу в условиях микроиноделия сезона виноделия 2019 г.

№ штамма	Объемная доля этилового спирта, %	Концентрация			Дегустационная оценка, балл	Соответствие типу
		титруемых кислот, г\л	летучих кислот, г\л	альдегидов, мг\л		
3	11.4	5.9	0.5	492	7.8	Соответствует
23	11.7	5.8	0.5	768	7.7	Соответствует
111	11.7	5.7	0.5	817	7.6	Соответствует
113	11.6	6.2	0.7	693	7.7	Соответствует
I-329 (контр.)	11.7	5.7	0.5	838	7.8	Соответствует

ческой оценке виноматериалы, выдержанные под пленкой, отвечали требованиям, предъявляемым к биологически выдержанным виноматериалам (табл. 5).

В дальнейшем пленки с поверхности сброженного виноградного суслу были использованы в качестве посевного материала на поверхность виноматериала, сброженного винными дрожжами. Такой способ инокуляции предусматривается технологией производства вина типа Херес пленочным способом. У всех 4 штаммов подтвердилась способность к пленкообразованию и в таких условиях (табл. 4).

С учетом энологических исследований в условиях микроиноделия сезона 2019 г. из 5 штаммов два (№ 3 и 23) были отнесены к наиболее перспективным для дальнейшей производственной селекцией. Таким образом, подход, основанный на первичном отборе штаммов, имеющих генетические маркеры “хересных” дрожжей, с последующим изучением их энологических свойств, можно предложить в качестве перспективного при селекции новых штаммов хересных дрожжей для совершенствовании технологии производства вин типа Херес.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 16-16-00109).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Саенко Н.Ф., Козуб Г.И., Авербух Б.Я., Шур И.М. Вино херес и технология его производства. Кишинев: Картя Молдавеняскэ, 1975. 160 с.
2. Alexandre H. // Int. J. Food Microbiol, 2013. V. 167. № 2. P. 269–275.
3. Legras J.-L., Moreno-Garcia J., Zara S., Zara G., Garcia-Martinez T., Mauricio J.C., Mannazzu I., Coi A.L., Bou Zeidan M., Dequin S., Moreno J., Budroni M. // Front. Microbiol. 2016. V. 14. № 7. P. 503.
4. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 428 с.
5. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. The Yeasts: a Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 2010. 178 p.
6. Наумова Е.С., Иванникова Ю.В., Наумов Г.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 656–661.

7. Кишковская С.А., Эльдаров М.А., Думина М.В., Танащук Т.Н., Равин Н.В., Марданов А.В. // Прикл. биохимия и микробиология, 2017. Т. 53. № 3. С. 323–332.
8. Legras J.-L., Galeote V., Bigey F., Camarasa C., Marsit S., Nidelet T., Sanchez I., Couloux A., Guy J., Franco-Duarte R., Marcet-Houben M., Gabaldon T., Schuller D., Sampaio J.P., Dequin S. // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 7. P. 1712–1727.
9. Eldarov M.A., Beletsky A.V., Tanashchuk T.N., Kishkovskaya S.A., Ravin N.V., Mardanov A.V. // Front. Microbiol. 2018. V. 15. № 9. P. 965.
10. Дикань А.П., Вильчинский В.Ф., Верновский Э.А., Заяц И.Я. Виноградарство Крыма / Ред. А.П. Диканя. Симферополь: “Бизнес-Информ”, 2001. 405 с.
11. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия. Симферополь: Таврида, 2003. 560 с.
12. Suárez Valles B., Pando Bedriñana R., Lastra Queipo A., Mangas Alonso J.J. // Food Microbiol. 2008. V. 25. № 5. P. 690–697.
13. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 221 с.
14. Charpentier C., Colin A., Alais A., Legras J.L. // Anton. Leeuw. Int. J. G. 2009. V. 95. № 3. P. 263–273.
15. Fidalgo M., Barrales R.R., Ibeas J.I., Jimenez J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006. V. 103. № 30. P. 11228–11233.
16. Strobe P.K., Skelly D.A., Kozmin S.G., Mahadevan G., Stone E.A., Magwene P.M., Dietrich F.S., McCusker J.H. // Genome Res. 2015. V. 25. № 5. P. 762–774.
17. Codón A.C., Gasent-Ramírez J.M., Benítez T. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 2. P. 630–638.
18. König H., Uden G., Fröhlich J. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Luxembourg: Springer Science & Business Media, 2009. 522 p.
19. Borneman A.R., Forgan A.H., Kolouchova R., Fraser J.A., Schmidt S.A. // G3 (Bethesda). 2016. V. 7. № 6(4). P. 957–971.
20. Martínez P., Pérez Rodríguez L., Benítez T. // Am. J. Enol. Vitic., 1997. V. 48. № 1. P. 55–62.
21. Verstrepen K.J., Klis F.M. // Mol. Microbiol. 2006. V. 60. № 1. P. 5–15.
22. Giudici P., Zambonelli C., Kunkee R.E. // Am. J. Enol. Vitic., 1993. V. 44. № 1. P. 17–21.
23. Huang C.W., Walker M.E., Fedrizzi B., Gardner R.C., Jiraneek V. // FEMS Yeast Res. 2017. V. 17. № 6.

## Natural Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts, Promising for Production of Sherry-Like Wines

S. A. Kishkovskaya<sup>a</sup>, T. N. Tanashchuk<sup>a</sup>, M. Yu. Shalamitskiy<sup>a</sup>, V. I. Zagoryiko<sup>a</sup>, M. I. Shiryaev<sup>b</sup>,  
D. A. Avdanina<sup>b</sup>, M. A. Eldarov<sup>b</sup>, N. V. Ravin<sup>b</sup>, and A. V. Mardanov<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Federal State Institution of Science Russian National Research Institute Viticulture and Winemaking "Magarach" RAS,  
Republic of Crimea, Yalta, 298600 Russia

<sup>b</sup>Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia  
\*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru

A methodological approach to identification of natural flor strains of *S. cerevisiae*, promising for production of sherry-like wines is presented. This approach is based on the initial selection of strains using genetic markers and subsequent study of their enological properties. Ninety six strains of *S. cerevisiae* were isolated from grape samples. The IST1 spacer allele specific for wine strains was found in 82 strains and 14 strains carried the allele characteristic of French flor strains. Specific alleles characteristic of Spanish sherry yeast strains was not found. A deletion of 111 bp in the promoter of the FLO11 adhesin gene, typical for flor strains, was detected in 11 strains, and a flor yeast specific allele of the *YDR379C-A* gene was detected in 20 strains. In total, 28 strains carried a flor yeast allele for at least one of the three loci. 21 of these strains formed a flor on the surface of the fermented grape must. Based on the results of genetic research and assessment of oenological properties, 5 strains characterized by the presence of flor yeast specific alleles for three loci and capable of flor formation were selected. Testing the strains in winemaking allowed us to recommend 2 strains as the most promising for further selection.

**Keywords:** sherry yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, ITS, *Flo11*, genotyping, physiological and biochemical properties, flor formation, aldehyde formation