

Лаборатория микробиологии

Госзадание № 0833-2019-0008

«Исследование, научное формирование и поддержание генофонда штаммов микроорганизмов виноделия»

Руководитель темы: гл. науч. сотр., д-р техн. наук, проф. Кишковская С.А.
Ответственный исполнитель: вед. науч. сотр., канд. техн. наук Танащук Т.Н.
Исполнители: вед. науч. сотр., канд. техн. наук. Иванова Е.В.;
мл. науч. сотр. Шаламитский М.Ю.
вед. инженер Загоруйко В.И.

Этап 2021 года

Уточнить основные технологически значимые критерии оценки штаммов МКБ и их роль с учетом особенностей отечественного виноделия и современных требований к качеству и безопасности винодельческой продукции. Разработать технологический паспорт на штаммы МКБ.

Цель исследований

Провести скрининг природных штаммов МКБ – кислотопонижателей по устойчивости к технологически значимым стрессовым факторам: рН, температуре, спирту и их влияния на качество винопродукции; поддержание биоресурсной коллекции «КМВ «Магарач»

Научная новизна и задачи

➤ *Научная новизна* заключается в получении новых научных данных о видовом составе и физиолого-биохимических свойствах микроорганизмов виноделия, устойчивости природных штаммов МКБ к технологически значимым стрессовым факторам роста; о влиянии МКБ на хересные дрожжи при глубинном хересовании; о сохранности специфических свойств хересных дрожжей при длительном хранении в условиях низких температур (-86°C); селекции новых промышленно ценных штаммов

Для достижения поставленной цели необходимо было решить *следующие задачи:*

- изучить биологическое разнообразие природных изолятов молочнокислых бактерий виноделия с использованием генетических методов анализа;
- провести отбор природных штаммов МКБ по их способности сбрасывать яблочную кислоту при низком значении рН среды культивирования;
- исследовать устойчивость природных штаммов МКБ с высокой декарбоксилирующей способностью к рН, температуре, спирту;
- установить оптимальные условия культивирования хересных дрожжей на лабораторной установке CGQ;
- определить возможные риски процесса в зависимости от влияния МКБ на физиологию хересных дрожжей;
- обеспечить поддержание и пополнение КМВ «Магарач».

Объекты исследования - природные изоляты МКБ и штаммы дрожжей ЦКП КМВ «Магарач»

Методы исследования

- При проведении исследований применяли подходы и методы, общепринятые в микробиологии виноделия и энохимии [Бурьян, 2003; Гержикова, 2002].
- Для определения видовой принадлежности МКБ и оценки их чистоты применяли генетические методы исследований [Looke et al., 2011; Benga L. et al., 2014], обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения BioEdit 7.2 и NCBI BLAST.
- Оценку активности роста штаммов в реальном времени осуществляли с использованием технологии CGQ [Bruder et al., 2016]. Математическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistic v.17.0 (IBM, США). За критерий значимости отличий между группами данных принимали критерий вероятности $P < 0,10$.
- Получение и обработка цифровых изображений микроорганизмов проводили при помощи программы «Image Scope M».
- Для хранения микроорганизмов использовали низкотемпературную морозильную камеру Panasonic MDF-U33V (- 86 °C).

Первая стадия отбора штаммов МКБ, перспективных для проведения ЯМБ (по результатам 2019-2021 гг)

1

- 88 штаммов МКБ – принадлежность к виду и чистота

2

- 27 чистых линий – 9 штаммов отнесены к виду *O. Oeni*; 7 штаммов - к виду *L. hilgardii*; 11 – к виду *L. casei/paracasei*. Наличие декарбоксилирующей способности

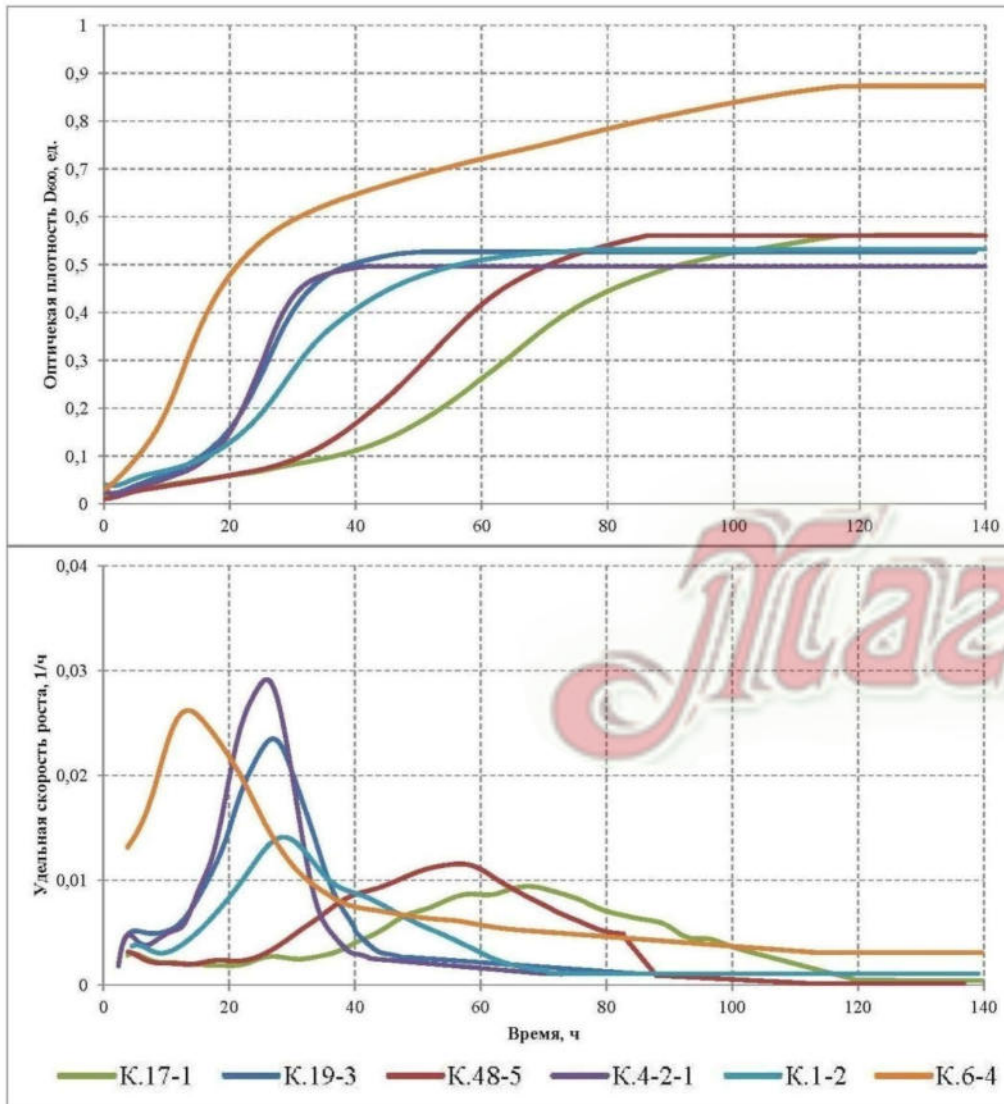
3

- 13 штаммов, сохранившие активность усваивать L-яблочную кислоту при низких значениях рН (3,2)

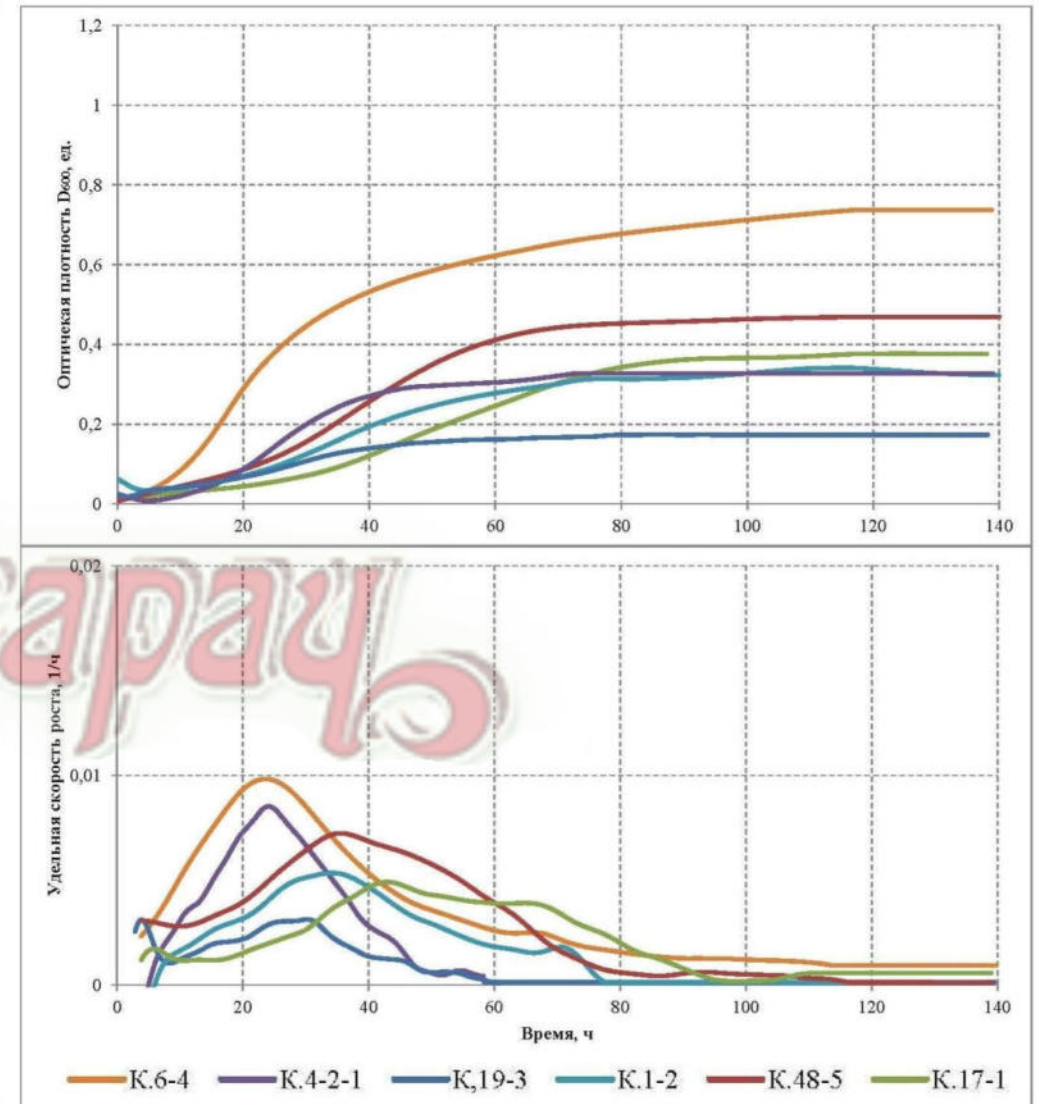
Физиолого-биохимические свойства штаммов МКБ

Номер штамма	Количество штаммов	Потребление L-яблочной кислоты, %		Время экспоненциального роста, ч	D ₅₉₀	Массовая концентрация летучих веществ, г/л
		рН среды 4,5	рН среды 3,2			
<i>Oenococcus oeni</i>						
К.1-2, К.3-1, К.4-2, К.6-4, К.17-4, К.19-3, К.24-3, К.25-10, К.48-5	9	95,0 - 82,5	75,3 - 35,3	71,5 - 20,0	0,815 – 0.215	0,66-1,5
<i>Lacticaseibacillus group</i>						
П.4, П.39-2, П.41-2,	3	87,5	58,6 - 54,7	34,0 - 33,5	1,850 – 0,950	0,22-0,24
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>						
П.83-1	1	48,0	19,2	55,0	3,601- 2,050	0,33-0,27

Рост штаммов рода *Oenococcus* на виноградном сусле и MRS

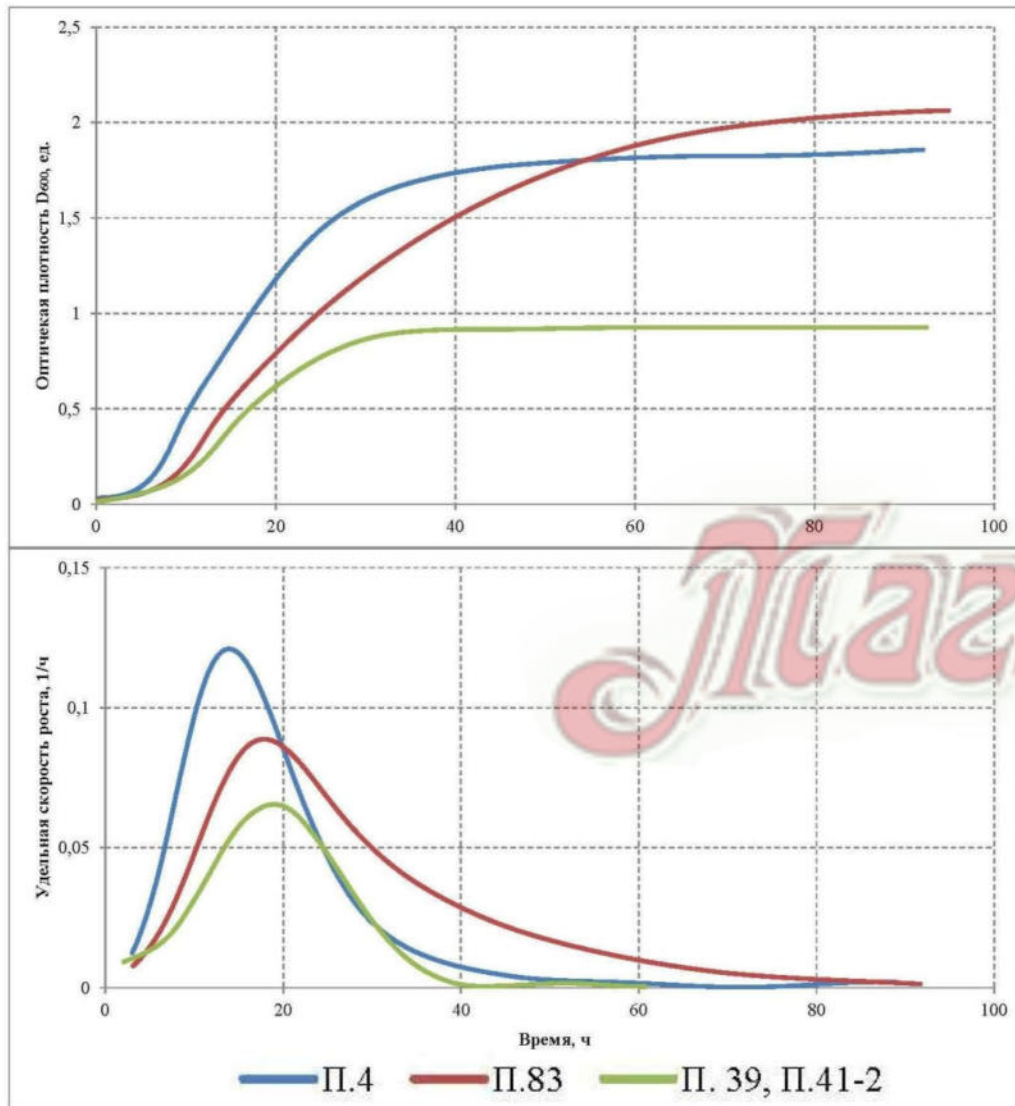


5% виноградное сусло +
1% дрожжевого экстракта

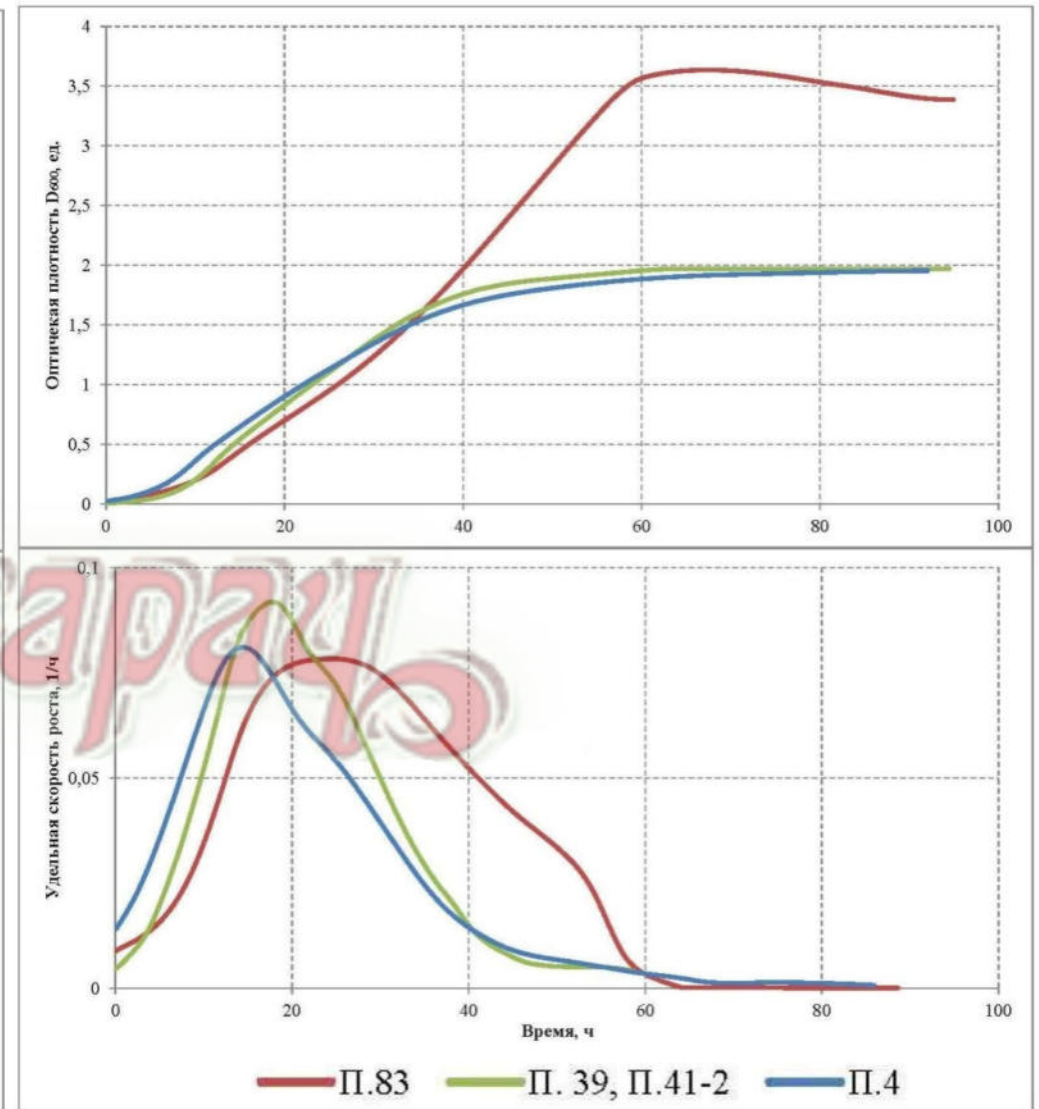


MRS (pH 4.5)

Рост штаммов родов *Lacticaseibacillus* и *Lentilactobacillus* на виноградном сусле и MRS

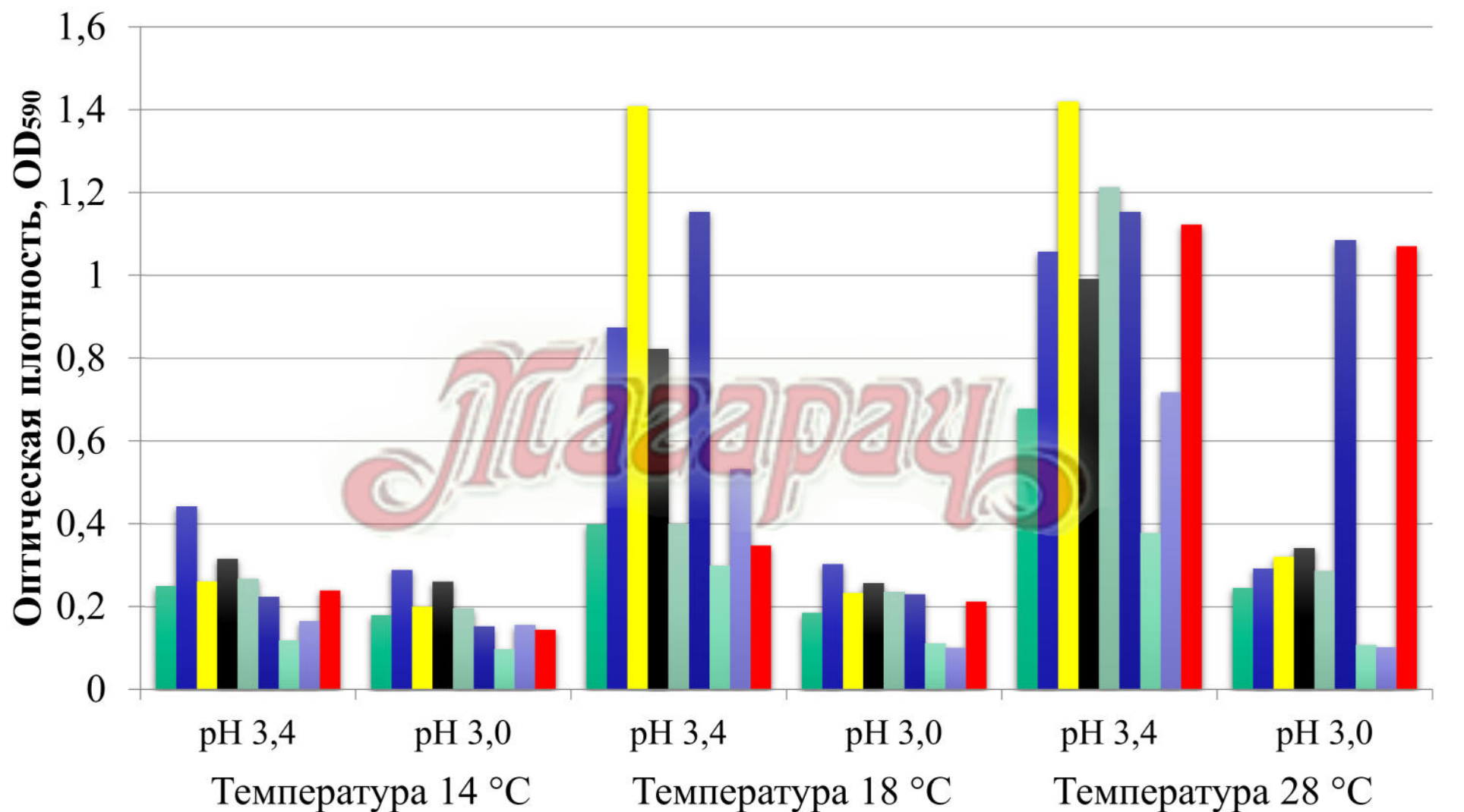


5% виноградное сусло +
1% дрожжевого экстракта



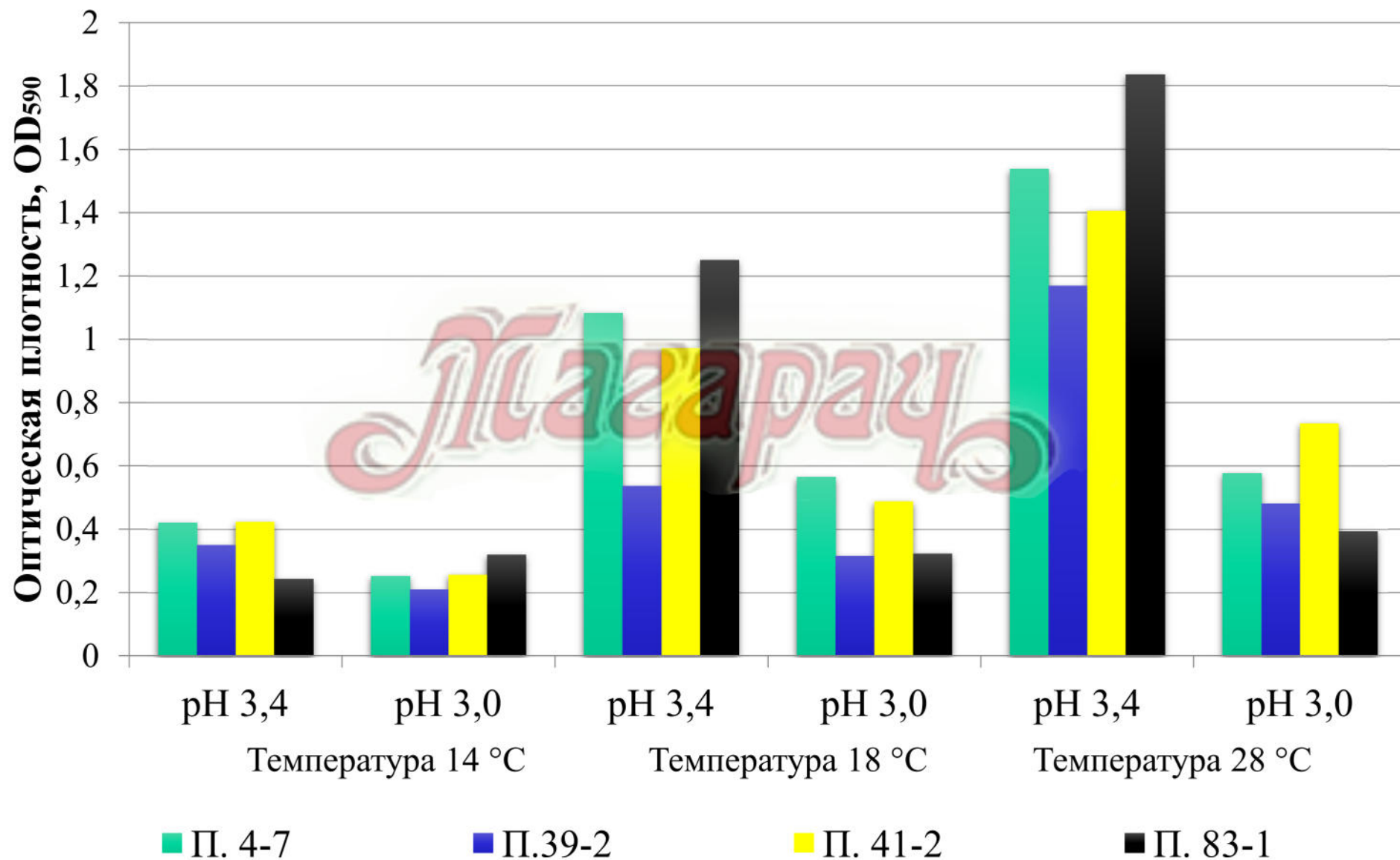
MRS (pH 4.5)

*Влияние pH среды и температуры культивирования на накопление биомассы МКБ рода *Oenococcus**

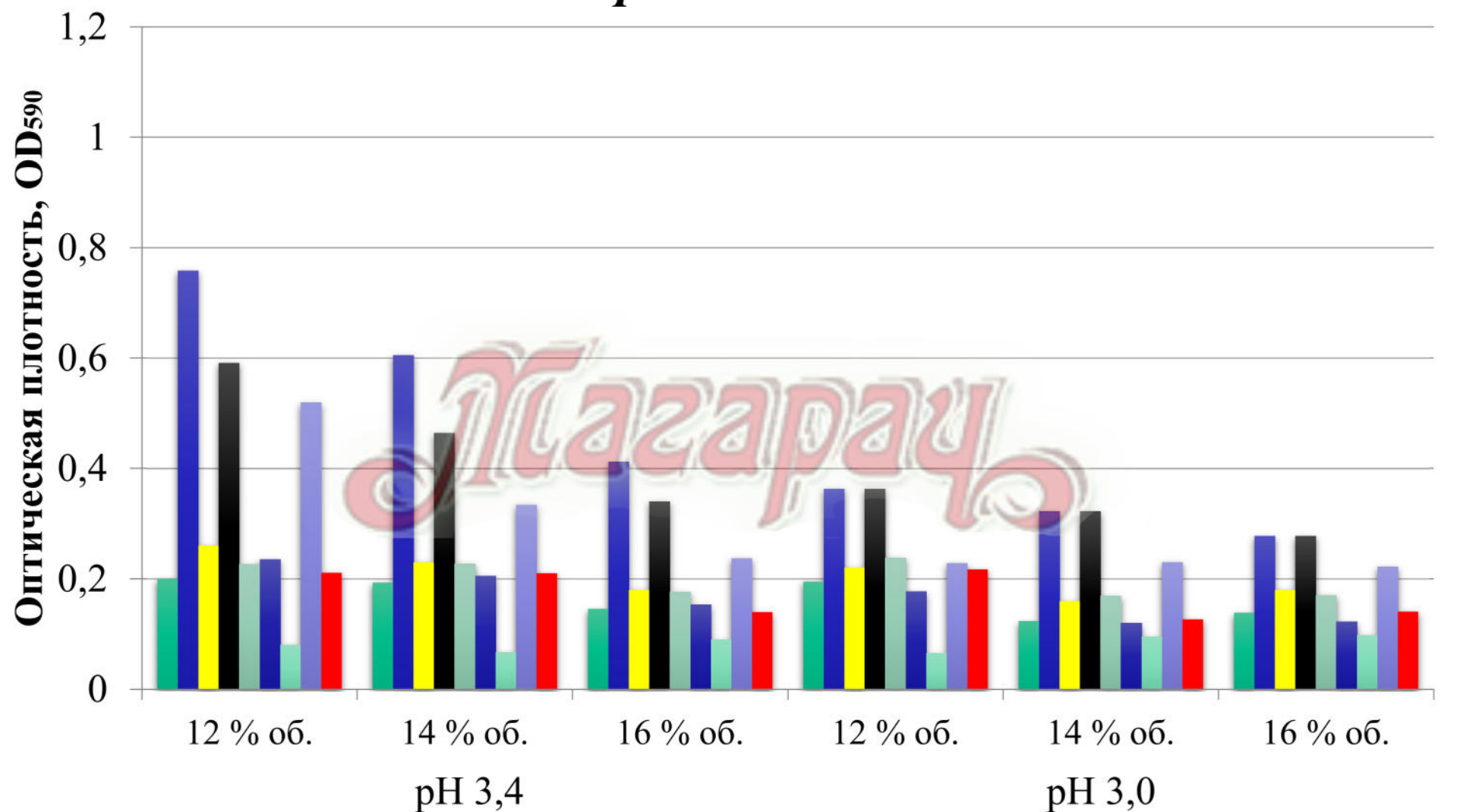


■ К. 1-2
 ■ К. 3-1
 ■ К. 4-2
 ■ К. 6-4
 ■ К. 17-4
 ■ К. 19-3
 ■ К. 24-3
 ■ К. 25-10
 ■ К. 48-5

Влияние pH среды и температуры культивирования на накопление биомассы МКБ родов *Lacticaseibacillus* и *Lentilactobacillus*

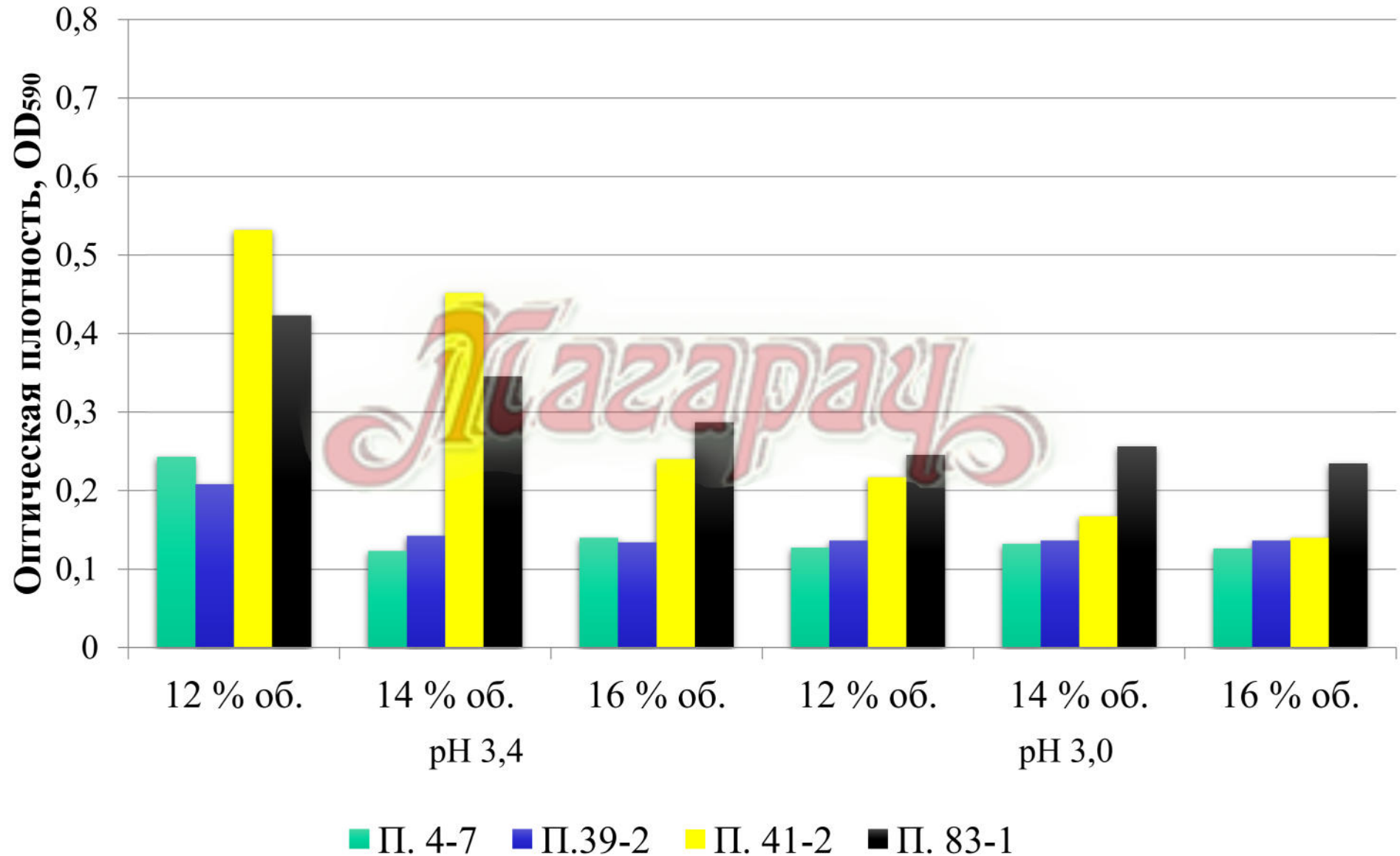


Влияние pH среды и объемной доли этилового спирта при температуре культивирования 18 °С на накопление биомассы МКБ рода *Oenococcus*

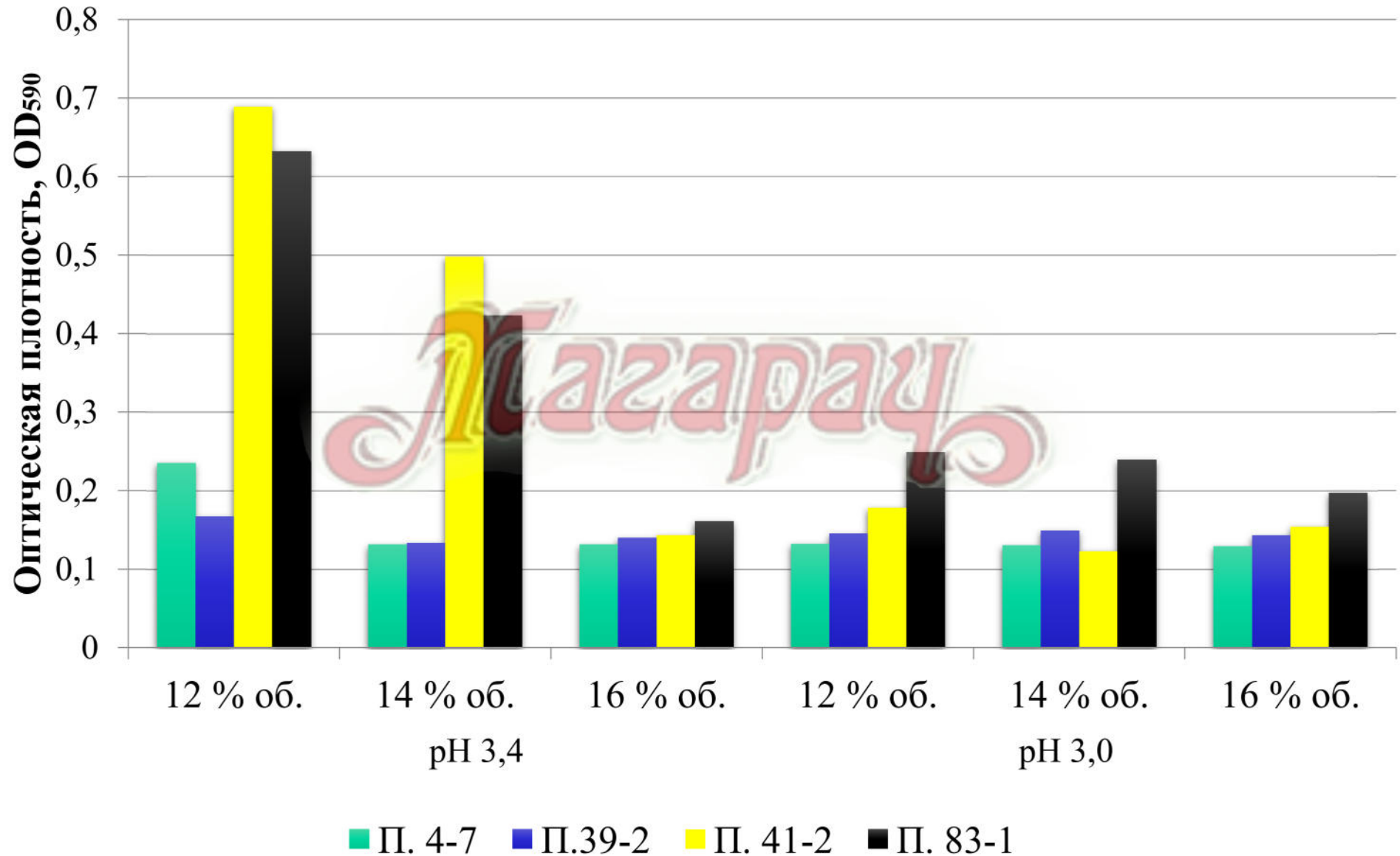


■ К. 1-2 ■ К. 3-1 ■ К. 4-2 ■ К. 6-4 ■ К. 17-4 ■ К. 19-3 ■ К. 24-3 ■ К. 25-10 ■ К. 48-5

Влияние pH среды и объемной доли этилового спирта при температуре культивирования 18 °С на накопление биомассы МКБ родов *Lacticaseibacillus* и *Lentilactobacillus*



Влияние pH среды и объемной доли этилового спирта при температуре культивирования 28 °С на накопление биомассы МКБ родов *Lacticaseibacillus* и *Lentilactobacillus*



**Статистическая оценка отклика штаммов МКБ на изменение условий
культивирования (коэф. корреляции Пирсона)**

Штамм	pH	Температура	Объемная доля этилового спирта
<i>Oenococcus oeni</i>			
К 1-2	0,390	0,226	-0,558
К 3-1	0,736	0,153	-0,198
К 4-2	0,365	0,065	-0,543
К 6-4	0,670	0,168	-0,259
К 17-1	0,315	0,222	-0,487
К 19-3	0,191	0,234	-0,643
К 24-3	0,728	0,417	-0,564
К 25-10	0,646	0,249	-0,014
К 48-5	0,092	0,344	-0,575
<i>Lacticaseibacillus group</i>			
П 4-7	0,220	0,105	-0,764
П 39-2	0,258	0,157	-0,671
П 41-2	0,481	0,158	-0,627
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>			
П 83-1	0,419	0,184	-0,492

Влияние МКБ на рост хересных дрожжей (х.д.) при глубинном хересовании виноматериалов (в/м)

Отношение разводок Х.Д. : МКБ	Фаза роста микроорганизмов, ч			Хересованный виноматериал			Начало роста хересных пленок, сут.
	ЛАГ-фаза		Стационарная, начало	Число отраженных частиц, (а.у)	Микроскопическая картина		
	Продолжительность	Соотношение роста (P) и осветление в/м			Хересные дрожжи	МКБ	
Хересные дрожжи (монокультура), 2%	9	$P \gg O_c$	35	67	Количество живых $\approx 30\%$ из них почкующихся 6%	отсутствуют	14
Хересные дрожжи из пленки, 2%	105	$P \ll O_c$	168	160	Мертвых около 40%, почкующихся 3%	отсутствуют	16
МКБ, 4% (монокультура)	52	$P \ll O_c$	105	88	отсутствуют	МКБ одиночные короткие палочки в парах и цепочках	пленки нет
Хересные дрожжи: МКБ = 1 : 4	110	$P \geq O_c$	140	450	Живые единичные не в каждом п.з., мертвые вытянутые, зернистые. Автолизированные $\approx 5\%$, конгломераты. Много продуктов автолиза, осадок черного цвета	Огромное множество палочек одиночных, в парах и цепочках. Есть единичные длинные изогнутые, в т.ч. огромных размеров, до 10 мкм	роста нет
Х.Д.:МКБ = 1 : 2	58	$P \gg O_c$	91	140	Мертвые $\approx 35\%$, Живые округлые, почкующихся $\approx 3\%$	Много МКБ в парах и цепочках	17
Х.Д.:МКБ = 2 : 1	7	$P \gg O_c$	40	90	79% мертвые, живые овальные, есть почкующиеся	В поле зрения небольшое к-во МКБ $\approx 25-30$ шт. в п.з.короткие палочки	15
Исходный виноматериал	0	O_c	O_c исх $-O_c$ в/м хересованного =80 а.у.		нет	нет	нет

Изучение биологического разнообразия природных изолятов МКБ

Проанализирован 51 изолят МКБ из природных
ниш: (перечислить)

Выделена общая ДНК для всех изолятов

Для 32 изолятов получен фрагмент 16S рДНК

Идентифицировано 5 штаммов до рода
Lacticaseibacillus и 1 штамм до вида
Lentilactobacillus hilgardii

Обнаружен 1 штамм *Acetobacter* spp.

Поддержание Коллекции микроорганизмов виноделия «Магарач» (ЦКП КМВ «Магарач»)

- Проведена инвентаризация и осуществлен плановый пересев 119 промышленно ценных штаммов (217 пробирок), хранящихся методом субкультивирования.
- Продолжены работы по выделению дрожжевой и бактериальной микрофлоры винограда, культивируемого в Крыму. Пополнена рабочая коллекция дрожжей (около 800 изолятов), выделенных при исследовании 141 сортов винограда из разных климатических зон Крыма.
- Получены новые данные о сохранности бродильной и пленкообразующей способностях 16 штаммов хересных дрожжей после двух лет хранения при температуре -86 °С. Дана сравнительная оценка двух способов хранения коллекционных хересных дрожжей: традиционным субкультивированием и новым (глубокое замораживание) по этим показателям.
- Проведена генетическая идентификация, исследование морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств 3-х природных штаммов дрожжей *Lachancea thermotolerans*.
- Проведены технологические испытания в условиях микровиноделия двух штаммов: *Saccharomyces cerevisiae* (I -76) и *Kluveromyces marxianus* (III-407), депонированных КМВ «Магарач» в 2020 г.

Выводы

- Получены новые научные данные о декарбоксилирующей активности природных штаммов МКБ при низком значении рН и их устойчивости к рН, температуре и спирту; показано, что влияние каждого фактора или их совокупности на ростовую активность МКБ может избирательно зависеть от культивируемого штамма. Отобраны 9 штаммов МКБ, перспективные для проведения ЯМБ
- Получены новые научные знания и пополнена база данных о видовом составе природных штаммов МКБ; определены основные методические подходы к идентификации МКБ виноделия генетическими методами
- получены новые данные об особенностях совместного культивирования хересных дрожжей и молочнокислых бактерий при беспленочном методе хересования, обозначены возможные технологические риски этого процесса. разработан проект технологического паспорта штамма МКБ, начаты работы по депонированию в КМВ «Магарач» 9 штаммов МКБ
- рекомендованы режимы культивирования хересных дрожжей при глубинном хересовании.

Спасибо за внимание!

Дизайн