



На правах рукописи

Шаламитский Максим Юрьевич

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
ВИНОМАТЕРИАЛОВ ИЗ ВИНОГРАДА СОРТА ЦИТРОННЫЙ
МАГАРАЧА НА ОСНОВЕ СВОЙСТВ СЕЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ
ДРОЖЖЕЙ**

Специальность 05.18.01 – Технология обработки, хранения и переработки
злаковых, бобовых, крупяных продуктов, плодоовощной продукции и
виноградарства

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата технических наук

Ялта – 2022

Работа выполнена в лаборатории микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН».

Научный руководитель: – **Загоруйко Виктор Афанасьевич**, доктор технических наук, профессор, чл.-корр. НААН, гл. науч. сотр., зав. лабораторией коньяка ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»

Официальные оппоненты: – **Шелудько Ольга Николаевна**, доктор технических наук, доцент, вед. науч. сотр., зав. научным центром «Виноделие», ФГБУН «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия»

– **Ермолин Дмитрий Владимирович**, кандидат технических наук, доцент, зав. кафедрой виноделия и технологий бродильных производств, Институт «Агротехнологическая академия» ФГАОУВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Защита диссертации состоится «01» сентября 2022 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 002.283.01 Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН» по адресу: 298600, Российская Федерация, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31, E-mail: dis@magarach-institut.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» по адресу: 298600, Российская Федерация, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31; адрес сайта: <http://magarach-institut.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор технических наук,
доцент

Аникина Надежда Станиславовна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из важных современных направлений виноделия является получение высококачественных вин с узнаваемой сортовой индивидуальностью. Основной задачей конкурентоспособного виноделия является повышение эффективности технологических процессов и создание продукции с уникальными характеристиками, которые в значительной степени обусловлены сортом винограда и применяемыми селекционными штаммами микроорганизмов.

В последние годы значительно расширились знания о биологическом (генетическом) разнообразии микроорганизмов, что определяет перспективность развития виноделия на основе биотехнологических подходов при формировании готовой продукции. Способность отдельных штаммов положительно или отрицательно влиять на качество вин определяет необходимость изучения физиолого-биохимических свойств конкретного штамма и определения его роли для производства с учетом технологических особенностей сырьевой и производственной баз. В этом аспекте перспективным является поиск и обоснованный отбор перспективных штаммов дрожжей для виноделия и разработка технологии их применения.

Одной из основных тенденций развития современного виноделия является увеличение производства вин с выраженными сортовым ароматом и вкусом. В данном аспекте наиболее привлекательными для потребителя являются вина из мускатных сортов винограда, среди которых заметно выделяется сорт винограда Цитронный Магарача, созданный во ВНИИВиВ «Магарач» в 1978 г. и рекомендованный для промышленного производства вин. Стабильно высокая урожайность, повышенная морозостойкость, высокая устойчивостью к возбудителям болезней способствуют широкому распространению сорта. В настоящее время посадки на территории РФ составляют 527 га, в том числе в Крыму – 54 га.

Вина из данного сорта винограда характеризуются специфическим ароматом и вкусом цитронного направления с медово-мускатными нотами, что делает актуальным применение селекционных штаммов дрожжей, способствующих сохранению и усилению сортового аромата.

К недостаткам сорта относится высокое накопление пектиновых веществ, до 600 мг/ 100 г, что затрудняет осветление виноградного сусла и приводит к потерям основных и увеличению расхода вспомогательных материалов. Вопросам интенсификации процессов осветления сусла путем гидролиза биополимеров с использованием гидролитического аппарата дрожжей посвящено ряд работ отечественных и зарубежных ученых (Е.Г. Сони́на, С.С. Покровская, Л.В. Лебедев, Е.Н. Датунашвили, А.В. Покровский, Л.А. Нгуен, А.

Eschstruth, P. Blanco, S. Gognies), показавших перспективность данного подхода.

Комплексное решение проблемы сохранения сортовых характеристик винограда сорта Цитронный Магарача и снижения пектиновых веществ в сусле на основе селекционных штаммов дрожжей является актуальным.

Цель исследований. Совершенствование технологии производства виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача на основе применения селекционных штаммов дрожжей для снижения содержания пектиновых веществ в сусле и влияния на формирование ароматического профиля виноматериалов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- исследование эндополигалактуроназной активности штаммов дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* и оценка перспективности их использования в виноделии в качестве активных продуцентов эндополигалактуроназы;

- скрининг конкурентоспособных штаммов с высокой активностью эндополигалактуроназы для эффективного осветления виноградного сусла;

- разработка технологических режимов культивирования отобранного штамма для получения дрожжевого фермента эндополигалактуроназы;

- разработка технологических режимов обработки сусла дрожжевым ферментом эндополигалактуроназы;

- скрининг штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* по способности формирования аромата и вкуса виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача;

- совершенствование технологии производства виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача на основе применения селекционных штаммов дрожжей.

Научная новизна. Получены новые научные знания об эндополигалактуроназной активности штаммов дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*. Впервые проведен филогенетический анализ генов *PGU*, отвечающих за синтез фермента эндополигалактуроназы, у дрожжей рода *Saccharomyces*. Установлены видовые особенности и подтверждено наличие нескольких генов *PGU* у дрожжей вида *S. bayanus* var. *ivarum*, что указывает на перспективность применения штаммов данного вида для снижения пектиновых веществ при ферментации виноградного сусла.

Проведен скрининг дрожжей вида *Kluyveromyces marxianus* по способности к гидролизу пектина в виноградном сусле. Селекционирован штамм *K. marxianus* (№ III-407), обеспечивающий выход фермента эндополигалактуроназы не менее 1500 ед. Обоснованы и установлены

закономерности изменения активности фермента и его влияния на осветление виноградного суслу в зависимости от технологических режимов. Научно обоснован способ получения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ) и его применения на стадии осветления виноградного суслу.

Показана принципиальная возможность применения на стадии осветления суслу фермента эндополигалактуроназы, полученного с использованием штамма *K. marxianus* № III-407, и штамма *S. cerevisiae* № I-76 на стадии ферментации для получения виноматериалов высокого качества из винограда сорта Цитронный Магарача.

Теоретическая и практическая значимость.

Усовершенствована технология производства виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача на основе применения селекционных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* (№ I-76) и *K. marxianus* (№ III-407). Селекционный штамм *K. marxianus* № 407 депонирован в КМВ «Магарач».

Разработан СТО 01586301.041-2022 «Метод получения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ) при культивировании штамма *K. marxianus* III-407».

Разработана технологическая инструкция по приготовлению виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием селекционных штаммов дрожжей (ТИ 9103063859.002:2016).

Новая технология прошла производственные испытания на винодельческом предприятии Республики Крым филиал «Ливадия» ФГУП «ПАО Массандра» (2016 г.). В 2019-2021 гг. технология была внедрена на базе ООО «АПК Мильстрим-Черноморские вина» в объеме 23 820 дал виноматериалов с экономическим эффектом 158,5 тыс. руб.

Апробация работы. Достоверность и обоснованность основных выводов и результатов работы обеспечена квалифицированным использованием математического анализа, статистической обработкой экспериментальных данных, апробацией разработанной технологии в условиях винзавода филиал «Ливадия» ФГУП «ПАО «Массандра» и внедрение на ООО «АПК Мильстрим-Черноморские вина». Основные научные положения и результаты исследований доложены на заседаниях секций Ученого совета ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» по виноделию (2012-2022 гг.). Материалы диссертации доложены на Международной научно-практической интернет-конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Г.Г. Валуйко (Ялта, 2014 г.), on International specialized symposium on yeasts (Perugia, Italy, 2015 г.), на 4-м Съезде микологов России (Москва, 2017 г.), на конференции «Перспективы инновационного развития аутентичного

виноградарства и виноделия» (Ялта, 2019 г.).

Личный вклад соискателя. Анализ специальной литературы, постановка задач исследования, планирование и постановка экспериментов, анализ и обработка полученных результатов, подготовка к печати научных трудов, разработка нормативных документов, организация и проведение производственных испытаний и внедрение новой технологии.

Положения, выносимые на защиту:

– оценка перспективности использования дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluveromyces* из КМВ «Магарач» в качестве активных продуцентов эндополигалактуроназы при производстве виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача на основе анализа данных биохимических и генетических исследований.

– селекционный штамм дрожжей *K. marxianus* № III-407 с высокой эндополигалактуроназной активностью для осветления виноградного сусла;

– способ получения и применения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы с использованием штамма дрожжей *K. marxianus* № III-407;

– скрининг штамма дрожжей рода *Saccharomyces* из КМВ «Магарач» и природных изолятов по способности формирования аромата и вкуса виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача;

– усовершенствованная технология по приготовлению виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей *S. cerevisiae* (№ I-76) и *K. marxianus* (№ III-407).

Степень достоверности полученных результатов подтверждается большим количеством лабораторных и производственных исследований, статистической обработкой полученных данных, публикацией основных результатов в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 научных трудов, в том числе 7 статей – в научных изданиях, рекомендуемых ВАК при Министерстве образования и науки России, 3 статьи в журналах базы данных Scopus, 3 – в материалах научно-практических конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена при использовании компьютерного текста на 178 страницах, включает введение, 3 основных раздела, заключение, список сокращений и условных обозначений, список использованной литературы и приложения. В диссертации содержится 13 таблиц, 23 рисунка и 17 приложений, в том числе акт внедрения результатов исследований в производство. Список использованной литературы содержит 277 источников, из которых 167 – являются иностранными.

Благодарности. Автор выражает признательность докторам биологических наук Г.И. Наумову и Е.С. Наумовой, доктору технических наук С.А. Кишковской, кандидатам технических наук Т.Н. Танащук, Е.В. Ивановой, С.Н. Червяк, С.С. Покровской за советы и ценные замечания при подготовке диссертации.

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Сусло и виноматериалы из винограда сорта Цитронный Магарача, дрожжи родов *Saccharomyces* и *Kluveromyces* из коллекции микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»), а также природные изоляты дрожжей рода *Saccharomyces*.

Проведение генетических исследований осуществляли в лаборатории молекулярной генетики дрожжей (зав. проф. Г.И. Наумов) Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Использовали дрожжи рода *Saccharomyces* из коллекции Г.И. Наумова (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва); гены *PGU 112* штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* из баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) и Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>).

Опытные ферментные препараты дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ), полученные с использованием селекционного штамма дрожжей *K. marxianus* (№ III-407, КМВ «Магарач»).

Методы исследований. В работе были использованы методы и подходы, общепринятые в энохимии и микробиологии виноделия (Гержикова В.Г., Бурьян Н.И.), хроматографические и генетические методы исследований. Основные физико-химические показатели виноградного сусла, виноматериалов и вина определяли по методам действующих ГОСТ и ГОСТ Р. Накопление биомассы исследуемых штаммов определяли колориметрическим методом с использованием фотоэлектроколориметра КФК-3; массовую концентрацию взвесей в сусле – гравиметрическим методом; кинематическую вязкость – вискозиметрическим методом (Лившиц Д.Б.); исследование качественного состава ароматобразующих компонентов – методом газохроматографического разделения компонентов на хроматографе Agilent Technology 6890; эндополигалактуроназную активность дрожжей определяли вискозиметрическим методом. При проведении микробиологических работ и селекции дрожжей использовали общепринятые методы экспериментальной микробиологии.

Филогенетический анализ генов *PGU* у дрожжей рода *Saccharomyces* осуществляли на основе нуклеотидные последовательности структурных генов

длиной 1086 пар нуклеотидов (п.н.) с помощью программы MEGA 6. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК и Саузерн гибридизацию проводили в соответствии с протоколами фирм производителей оборудования и реактивов. Определение видовой принадлежности дрожжей проводили с помощью ПДРФ-ПЦР (Esteve-Zarzoso B., Muir A.).

Данные экспериментов обрабатывали согласно общепринятым методам математической статистики с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics (v 17.0), Microsoft Excel.

Структурная схема исследований приведена на рисунке 1.

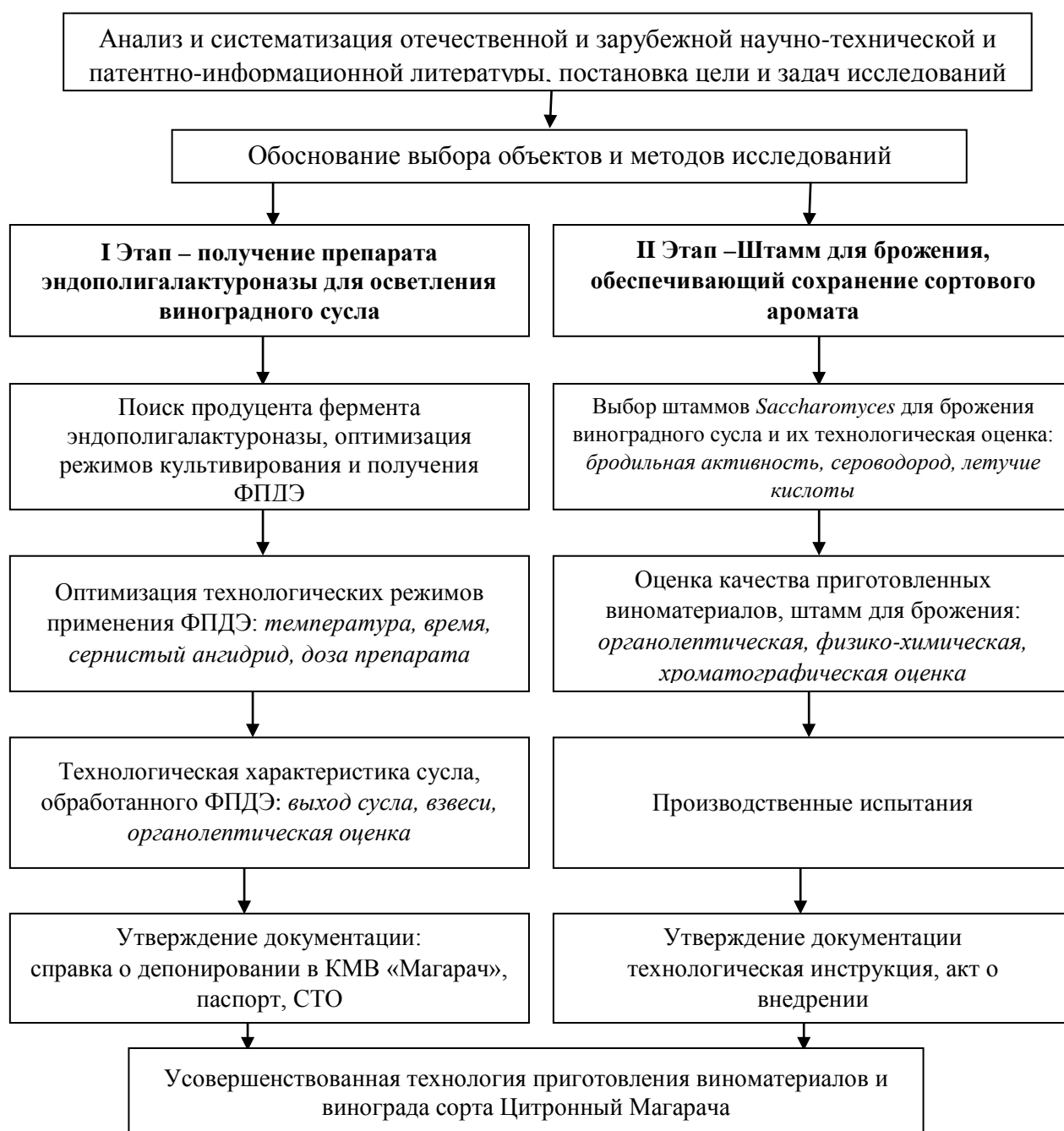


Рисунок 1 – Структурная схема исследований

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение способности дрожжей синтезировать внеклеточную эндополигалактуроназу. Для оценки эндополигалактуроназной активности штаммов дрожжей был проанализирован рост на плотной селективной среде 66 штаммов дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* из КМВ «Магарач». Анализ роста штаммов по проявлению зон лизиса, указывающего на наличие эндополигалактуроназной активности позволил выявить 34 штамма (15 штаммов рода *Kluyveromyces* и 19 штаммов рода *Saccharomyces*). Дальнейшая количественная оценка эндополигалактуроназной активности этих штаммов при культивировании на синтетической среде YPD показала, что штаммы дрожжей рода *Kluyveromyces* характеризовались активностью фермента в диапазоне от 278,3 до 1673,3 ед., а штаммы дрожжей *Saccharomyces* – от 0,6 до 128,0 ед.

Проведенное исследование подтвердило литературные данные о том, что дрожжи рода *Kluyveromyces* являются наиболее активными продуцентами эндополигалактуроназы, по сравнению с представителями рода *Saccharomyces*, и позволило для дальнейших исследований отобрать 8 штаммов рода *Kluyveromyces* с высокой активностью фермента в диапазоне от 1280,0 до 1673,3 ед.

Исследование эндополигалактуроназной активности штаммов дрожжей *Saccharomyces* показало, что из 19 штаммов только два штамма имели сравнительно высокие значения активности (64,0 и 128,0 ед.), остальные характеризовались низкими значениями (до 6,4 ед.). Эти данные указывают на нецелесообразность использования исследованных штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* в качестве продуцентов фермента. В то же время, полученные нами результаты позволяют предположить перспективность их использования в качестве стартовых культур, способствующих снижению содержания пектиновых веществ суслу на стадии брожения. Для подтверждения данного предположения нами были проведены генетические исследования.

Исследование показало наличие трех генов (рисунок 2), отвечающих за синтез эндополигалактуроназы у штаммов вида *S. bayanus* var. *ivarum*. У других видов данного рода был обнаружен только один ген. Наличие мультигенного семейства в пределах одного вида может свидетельствовать о высокой значимости соответствующего фермента, что указывает на перспективность отбора штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* для спиртового брожения суслу с высоким содержанием пектина.

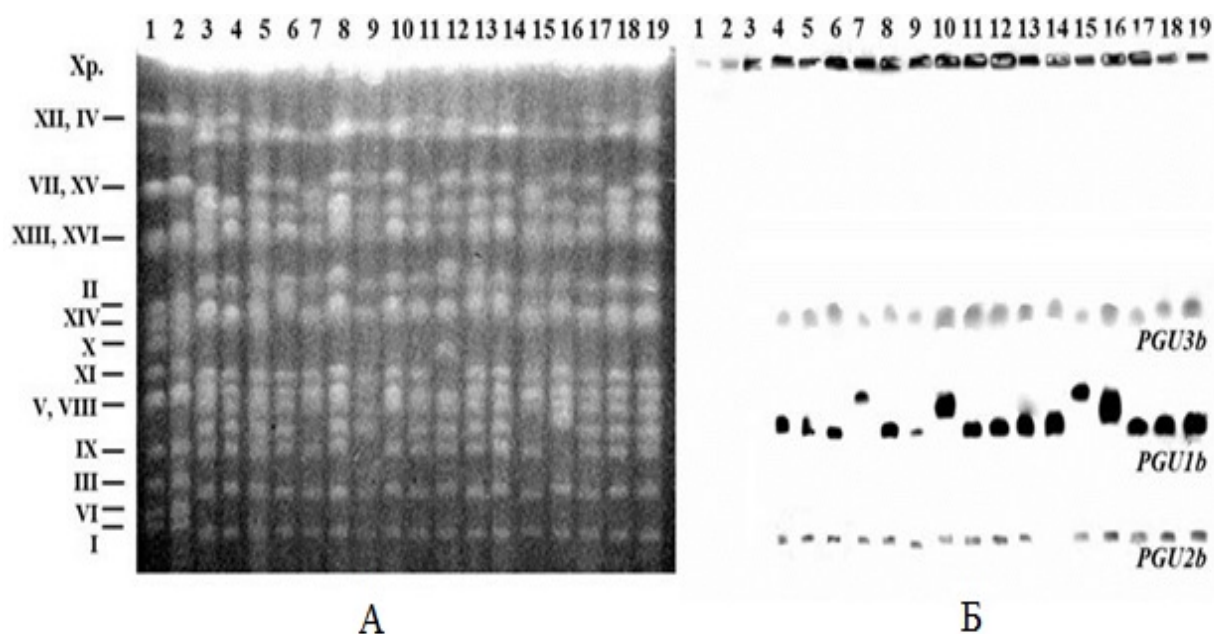


Рисунок 2 –Пулс-электрофорез (А) и Саузерн-гибридизация (Б) хромосомной ДНК дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* с зондом *PGU1b*. Дорожки: 3 – SSCP; 4 – 17el; 5 – DBVPG 1642; 6 – YПс2.93; 7 – СЕСТ 12636; 8 –ВКМ Y-1146; 9 –Т13/30; 10 – NCAIM Y.00677; 11 –М300; 12 – ТВШб13.92; 13 – DDI4.95; 14 – PJS1.94; 15 – PJS2.95; 16 – PJP1.95; 17 – SRC306; 18 – ССУ21-31-12; 19 – МСУС 623. Контрольные штаммы *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; 2 – S288С. Указаны размеры и порядок хромосом стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295

3.2. Скрининг штаммов по способности синтезировать эндополигалактуроназу при культивировании на виноградном сусле. Все отобранные штаммы первоначально были выделены из экологических природных ниш, не относящихся к виноделию. Виноградное сусло является высококислотной средой, значения рН которой, как правило, находятся в диапазоне 3,0-3,5. Поэтому при отборе наиболее перспективных для виноделия штаммов *Kluveromyces* нами было проведено исследование их способности к синтезу эндополигалактуроназы при культивировании на виноградном сусле со значением рН 3,4 (рисунок 3).

Анализ полученных данных показал, что при культивировании на виноградном сусле (рН 3,4) для всех штаммов наблюдалось снижение активности по сравнению со средой YPD (рН 5,0) на 4,0-28,5 %. Обобщая результаты проведенного скрининга, был сделан вывод, что минимальным расхождением по количеству накапливаемого фермента при культивировании на среде YPD и виноградном сусле характеризовался штамм дрожжей *K. marxianus* № III-358. Кроме того, он отличался максимальной активностью фермента (1253,7 ед.) при культивировании на виноградном сусле с рН 3,4. Это позволило выбрать его для дальнейшей селекционной работы.

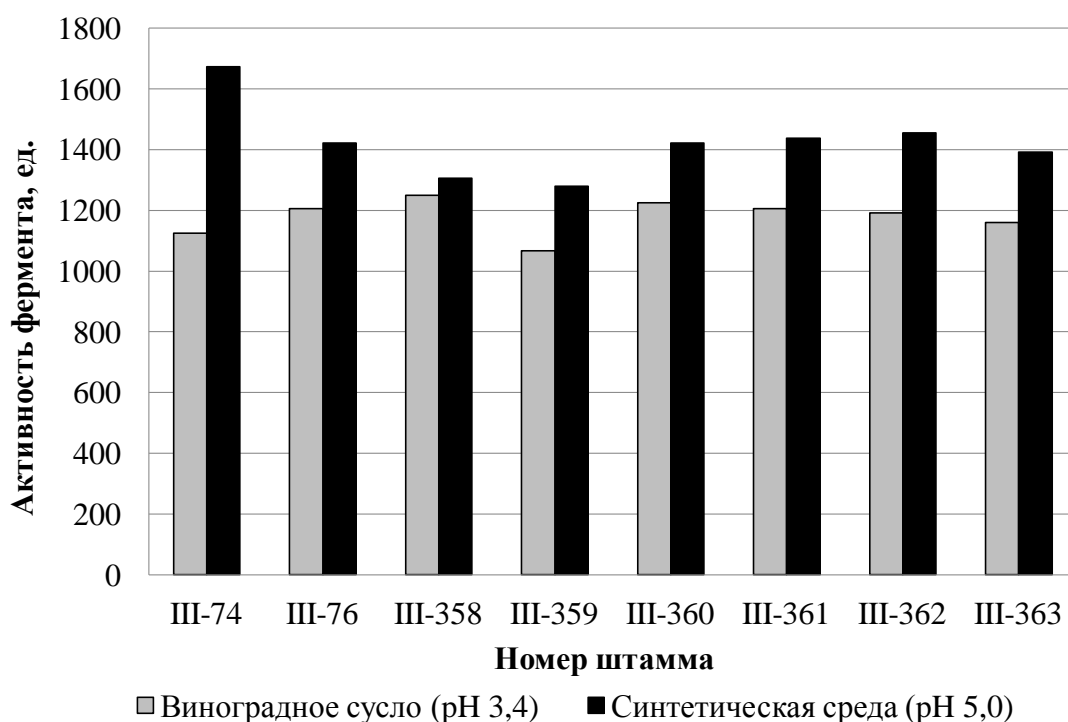


Рисунок 3 – Эндополигалактуроназная активность штаммов рода *Kluyveromyces* в зависимости от среды культивирования

3.3. Селекция штамма *K. marxianus* (№ III-358) методом улучшающего отбора. На основании предварительных исследований и выявления уменьшения количества синтезируемой эндополигалактуроназы при снижении кислотности среды культивирования логичным продолжением работы явилось изучение естественной изменчивости выбранного штамма № III-358 по количественному признаку (уровню продукции фермента) для отбора наиболее однородной популяции. По результатам проведенного исследования было выделено 10 штаммов с активностью фермента от 1495,6 до 1521,5 ед, что превышало активность исходного штамма на 19-21 %. На основании математической обработки данных с применением однофакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки был отобран штамм № III-358-60, проведена его паспортизация и депонирование в КМВ «Магарач» под номером III-407.

3.4. Оптимизация режимов синтеза внеклеточного фермента эндополигалактуроназы штаммом дрожжей *K. marxianus* № III-407. Для определения оптимальных режимов культивирования штамма было изучено влияние массовой концентрации сахаров виноградного сусла, pH среды и температуры культивирования (рисунки 4-6).

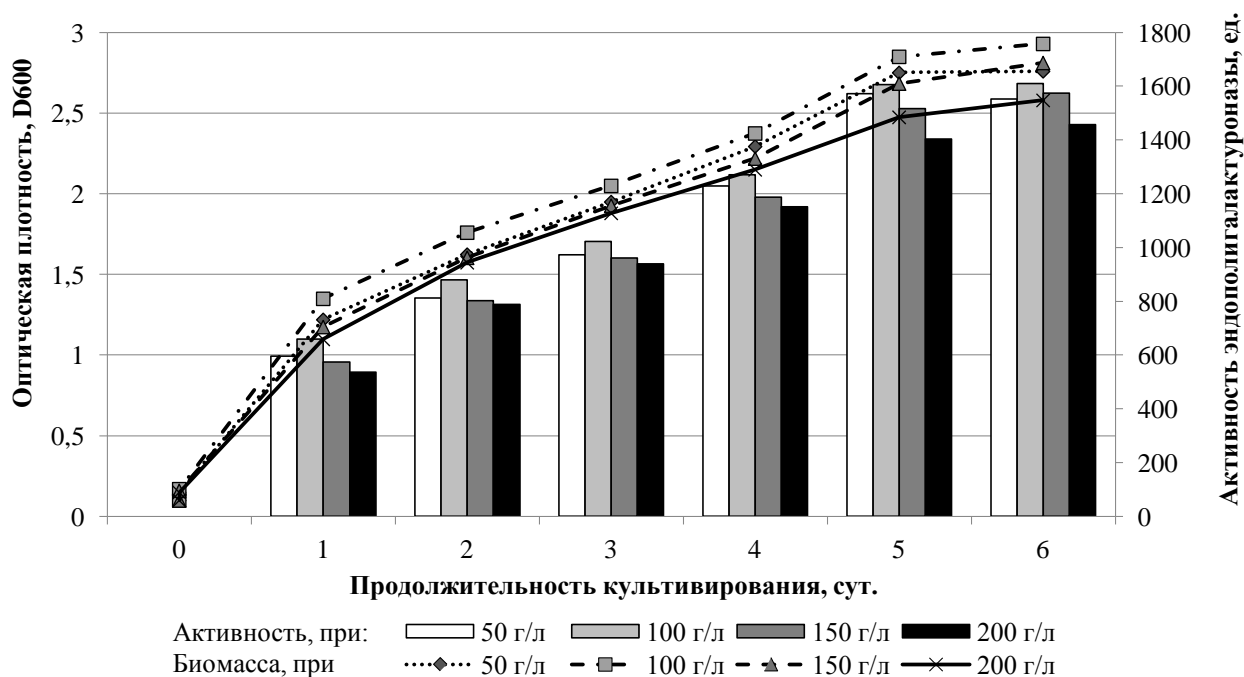


Рисунок 4 – Влияние массовой концентрации сахаров виноградного сусли на активность эндополигалактуроназы и накопление биомассы дрожжами *K. marxianus* № III-407

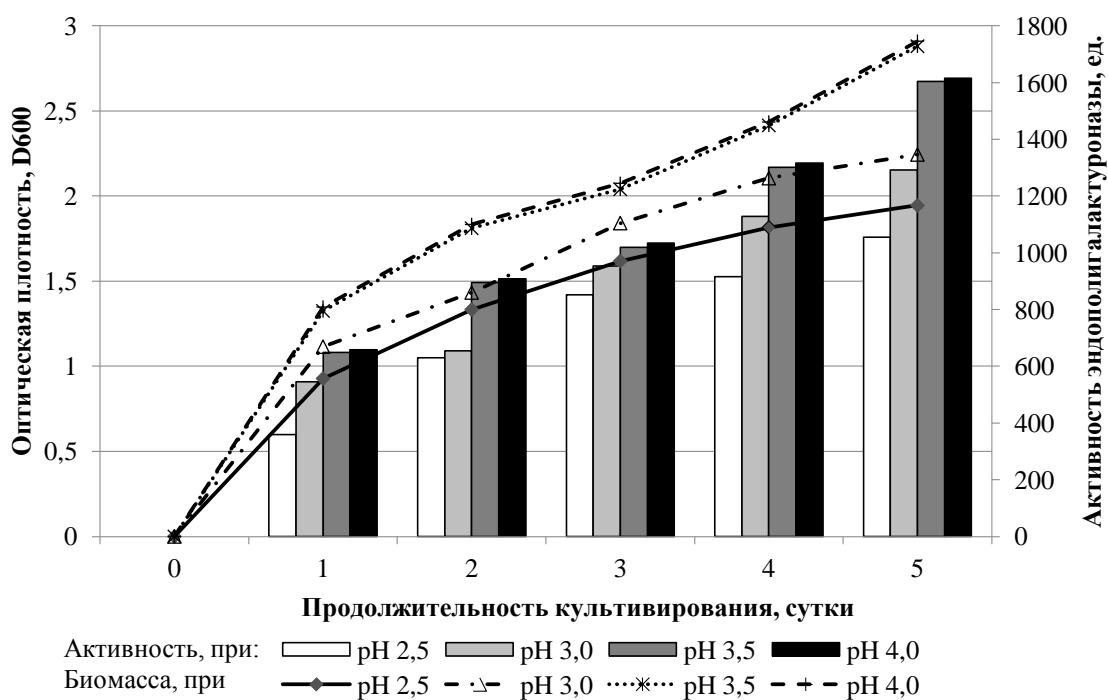


Рисунок 5 – Влияние pH среды культивирования на активность эндополигалактуроназы и накопление биомассы дрожжами *K. marxianus* № III-407

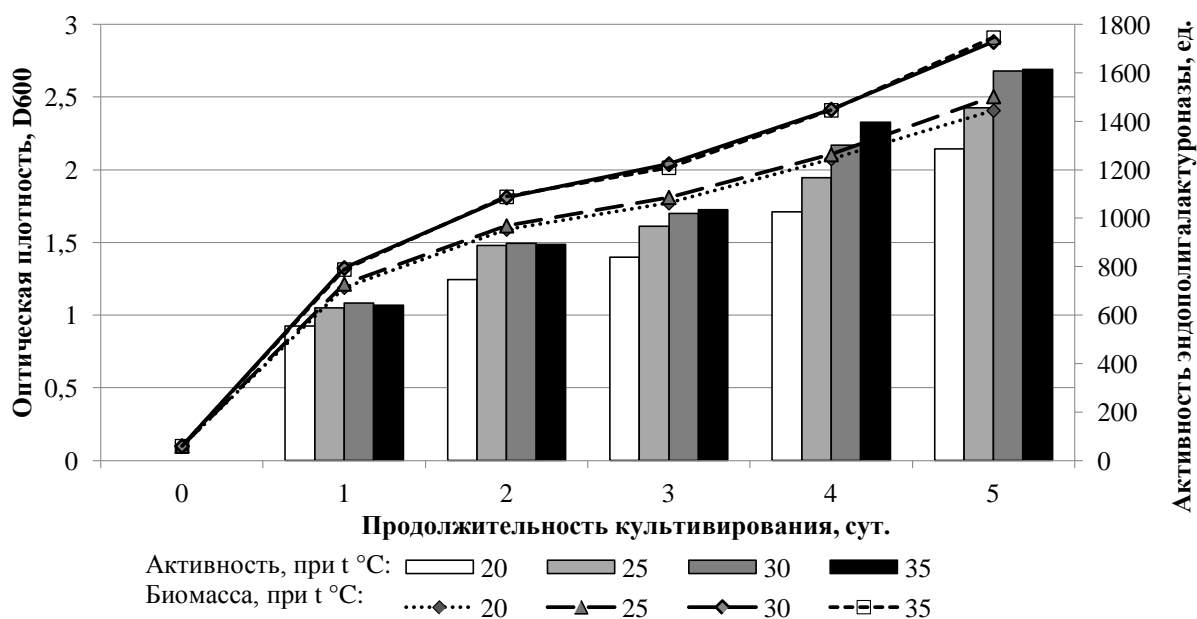


Рисунок 6 – Влияние температуры культивирования на активность эндополигалактуроназы и накопление биомассы дрожжами *K. marxianus* № III-407

Проведенная математическая обработка экспериментальных данных позволила получить уравнение регрессии (1) ($R = 0,911$), характеризующее влияние условий культивирования штамма *K. marxianus* № III-407 на накопление фермента в виноградном сусле:

$$A = -448,8 + 20,4 \times f_1 - 0,9 \times f_2 + 411,1 \times f_3, \quad (1)$$

где A – активность эндополигалактуроназы, ед./мл мин⁻¹;

f_1 – температура культивирования, °С;

f_2 – массовая концентрация сахаров сусла, г/л;

f_3 – активная кислотность сусла, ед.

На основании анализа полученных научных данных о динамике роста селекционного штамма № III-407 и накоплении им эндополигалактуроназной активности при культивировании в виноградном сусле оптимальными условиями выбраны: массовая концентрация сахаров 100 г/л, величина рН 3,5 и температура 30 °С. При данных условиях активность фермента в надосадочной жидкости достигала значения 1606,8 ед. на 5 сут. культивирования. Культивирование дрожжей при массовой концентрации сахаров 150 и 200 г/л, значениях рН 2,5 и 3,0, а также температурах 20 и 25 °С приводило к замедлению роста штамма и снижению количества накапливаемой эндополигалактуроназы.

На следующем этапе работы была поставлена задача обоснования режимов осветления виноградного сусла при его обработке ФПДЭ, протокол получения которого представлен на рисунке 7.

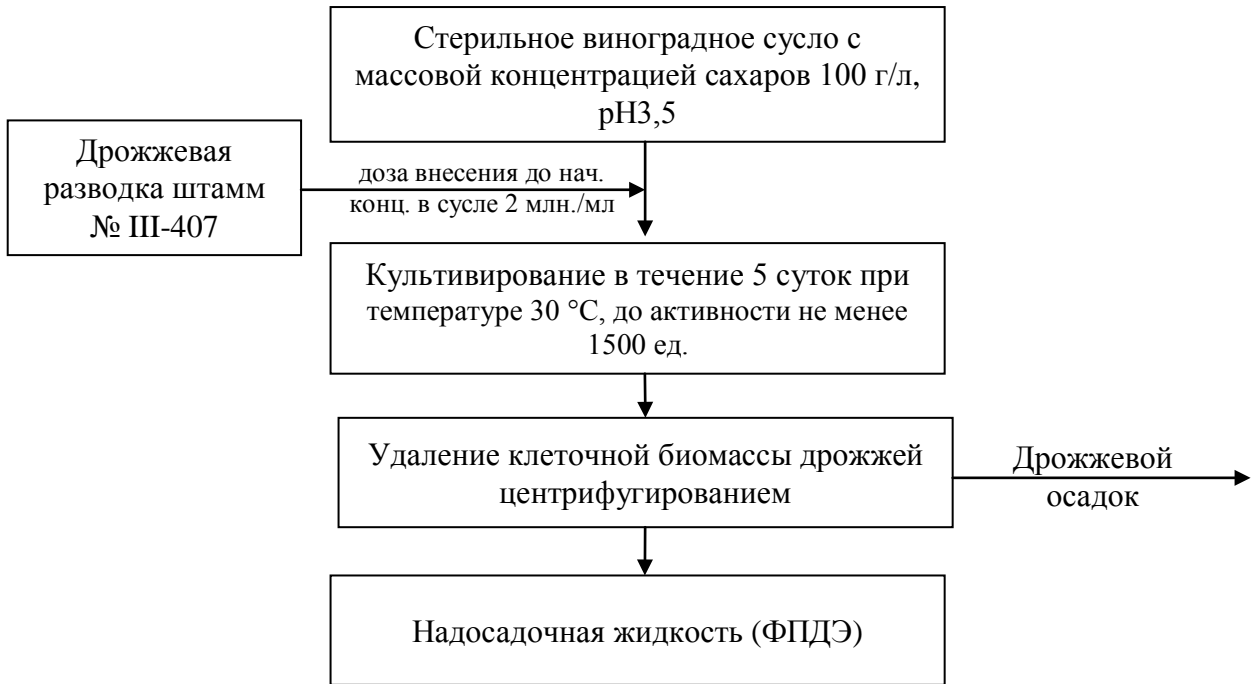


Рисунок 7 – Протокол приготовления ФПДЭ

3.3. Исследование влияния ФПДЭ на осветление виноградного сусла.

Проведены исследования по определению оптимальных условий применения ФПДЭ на стадии осветления виноградного сусла: вносимой дозы препарата, температуры и времени обработки. Обоснование параметров проводили в условиях, приближенных к производственным при температурах 10 °С и 20 °С и времени обработки до 4 ч (рисунки 8, 9).

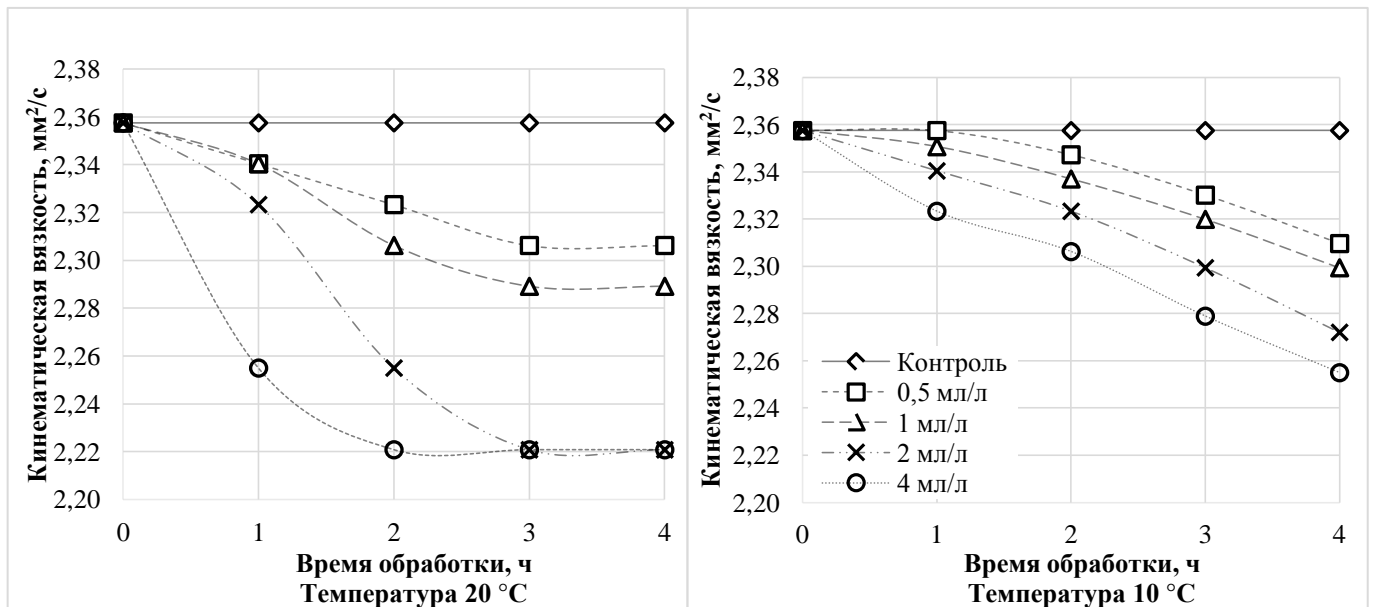


Рисунок 8 – Изменение вязкости сусла в зависимости от дозы ФПДЭ, температуры и времени обработки

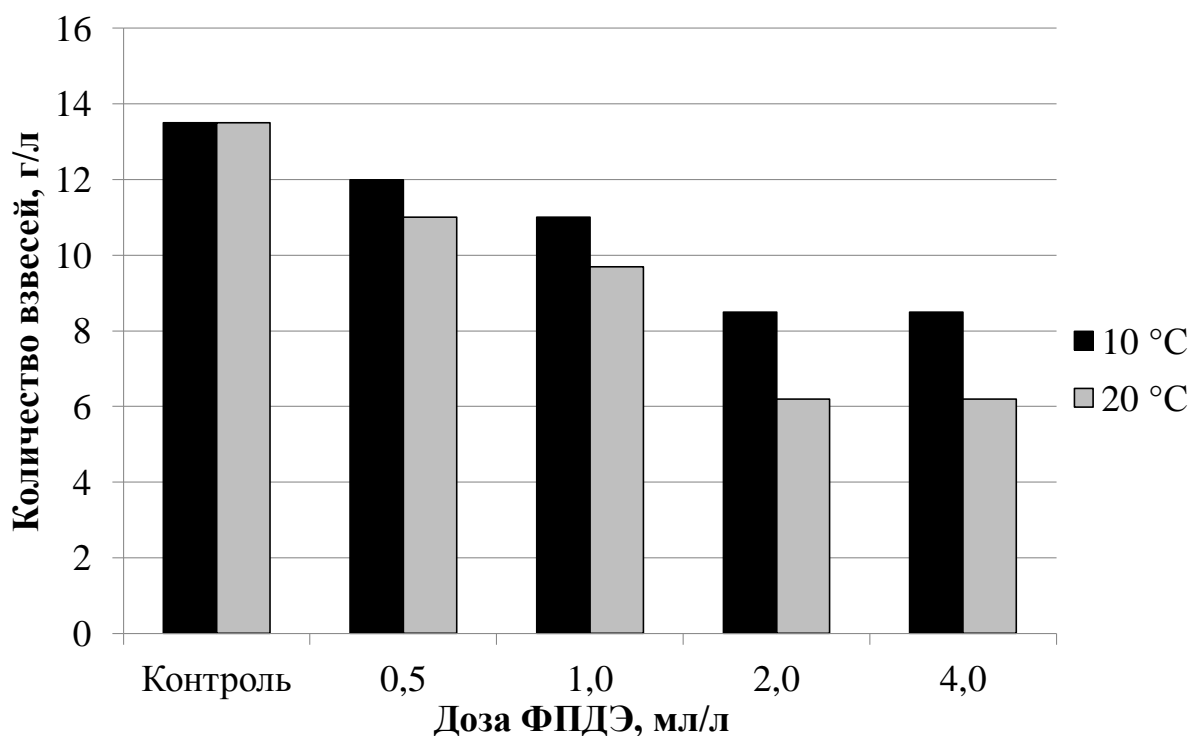


Рисунок 9 –Содержание взвесей в сусле в зависимости от дозы ФПДЭ при температуре обработки 10 и 20 °С

Исследование показало, что при температуре обработки 20 °С наибольшее снижение вязкости суслу на 5,8 % наблюдали через 2 ч, при дозе препарата 4 мл/л. При снижении температуры суслу до 10 °С наблюдали снижение эффективности препарата во всех вариантах опыта. При дозе препарата 4 мл/л снижение вязкости суслу на 4,7 % было достигнуто через 4 ч. Отмечено наибольшее снижения количества взвесей в сусле на 57 % при дозах 2 и 4 мл/л и температуре 20 °С. Однако при дозе 2 мл/л продолжительность обработки увеличилась на один час. При понижении температуры обработки до 10 °С количество взвесей снизилось на 43 %.

На основании анализа полученных данных выбраны оптимальные условия применения ФПДЭ: доза 4 мл/л, время обработки 2 ч при температуре 20 °С.

3.4. Выбор стартовой культуры для проведения процесса брожения.

Выбор стартовой культуры основывался на характеристике 108 штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* по морфолого-культуральным, физиолого-биохимическим и технологическим свойствам, что позволило отобрать 20 технологически значимых штаммов, принадлежащих к виду *S. cerevisiae*, характеризующихся высокой бродильной активностью, низкой способностью к синтезу сероводорода и летучих кислот.

Виноград сорта Цитронный Магарача был переработан по общепринятой технологической схеме при производстве сухих виноматериалов. Спиртовое брожение суслу проводили при температуре 17-20 °С с использованием

отобранных штаммов дрожжей. Виноматериалы соответствовали требованиям нормативной документации. Исследование ароматического комплекса виноматериалов с помощью газохроматографического анализа позволило идентифицировать 17 компонентов, относящихся к различным группам химических соединений: высшим и терпеновым спиртам, сложным эфирам.

Общая тенденция изменения концентрации терпеновых соединений (гераниола, α -терпинеола, линалоола) придающих вину мускатные оттенки, отражена на рисунке 10. Количественное содержание терпеновых соединений в виноматериалах варьировалось в диапазоне от 0,46 до 1,51 мг/л. Увеличение их концентрации по сравнению с исходным суслем обнаружено в девяти образцах.

Суммарное содержание высших спиртов (пропанол, изобутанол, гексанол, изоамиловый и β -фенилэтиловый спирт) в виноматериалах отмечено в диапазоне от 153,9 до 263,9 мг/л (таблица 1). Исследование показало, что штаммы отличались по способности к синтезу β -фенилэтилового спирта (от 25,8 до 80,7 мг/л), способствующего развитию в аромате оттенков меда и чайной розы. В 85 % образцов массовая концентрация β -фенилэтанола составляла более 40 мг/л. Остальные идентифицированные спирты (изобутанол, пропанол и гексанол) находились в количествах, значительно меньших, чем их пороговые концентрации, и не могли оказать влияния на формирование аромата виноматериалов.

Содержание сложных эфиров в опытных виноматериалах заметно отличалось в зависимости от использованного штамма и варьировало в диапазоне от 4,0 до 19,1 мг/л (таблица 2). Сравнительно высокой эфиروобразующей способностью характеризовались 7 штаммов: массовая концентрация сложных эфиров в виноматериалах составила более 15 мг/л. Для 11 штаммов накопление сложных эфиров варьировало в диапазоне от 6,9 до 14,6 мг/л.

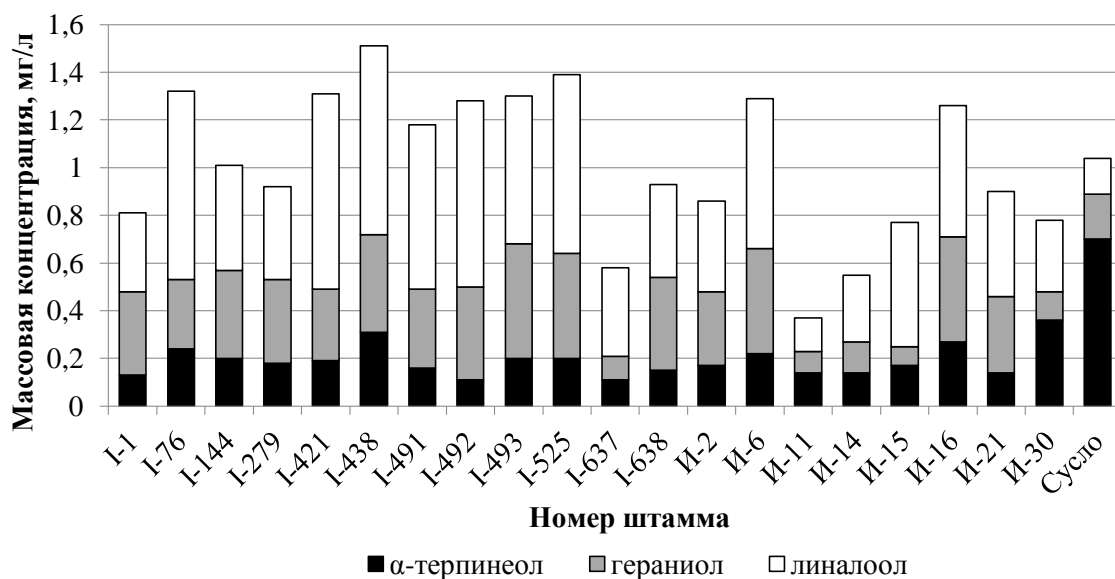


Рисунок 10 – Содержание терпеновых спиртов в виноматериалах

Таблица 1 – Содержание высших спиртов в опытных виноматериалах

| Номер штамма | Массовая концентрация, мг/л | | | | | |
|--------------|-----------------------------|------------|----------|-------------------|------------------------------|-------|
| | пропанол | изобутанол | гексанол | изоамиловый спирт | β -фенилэтиловый спирт | сумма |
| I-1 | 0,5 | 18,0 | 0,5 | 167,6 | 77,3 | 263,9 |
| I-76 | 0,7 | 9,5 | 0,7 | 94,8 | 59,4 | 165,1 |
| I-144 | 0,3 | 15,8 | 0,9 | 139,0 | 44,3 | 200,3 |
| I-279 | 0,9 | 12,1 | 0,8 | 142,0 | 51,8 | 207,6 |
| I-421 | 0,6 | 10,4 | 0,7 | 172,8 | 58,0 | 242,5 |
| I-438 | 0,9 | 13,2 | 0,9 | 155,7 | 79,2 | 249,9 |
| I-491 | 1,0 | 13,1 | 1,1 | 148,7 | 77,8 | 241,7 |
| I-492 | 1,2 | 13,4 | 0,7 | 98,5 | 45,9 | 159,7 |
| I-493 | 0,6 | 6,4 | 0,8 | 130,4 | 62,6 | 200,8 |
| I-525 | 0,5 | 7,4 | 1,0 | 161,7 | 80,7 | 251,3 |
| I-637 | 1,2 | 15,7 | 0,5 | 131,3 | 34,5 | 183,2 |
| I-638 | 0,5 | 8,5 | 0,6 | 99,1 | 54,8 | 163,5 |
| И2 | 1,3 | 10,4 | 0,7 | 129,3 | 49,7 | 191,4 |
| И6 | 0,8 | 8,1 | 0,7 | 143,0 | 64,3 | 216,9 |
| И11 | 0,0 | 6,6 | 0,6 | 130,6 | 45,8 | 183,6 |
| И14 | 2,2 | 8,0 | 0,4 | 140,5 | 41,5 | 192,6 |
| И15 | 1,3 | 18,4 | 0,5 | 120,1 | 25,8 | 166,1 |
| И16 | 1,8 | 16,5 | 1,5 | 151,5 | 54,7 | 226,0 |
| И21 | 0,4 | 7,9 | 0,7 | 100,7 | 44,2 | 153,9 |
| И30 | 1,7 | 11,8 | 0,5 | 130,8 | 30,5 | 175,3 |

Таблица 2 – Содержание сложных эфиров в опытных виноматериалах

| Номер штамма | Массовая концентрация, мг/л | | | | | | | | сумма |
|--------------|-----------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|-------------|----------------|-------------------|-------|
| | изоамил-ацетат | этилбутират | этил-каприлат | этил-капринат | этил-капронат | этил-лактат | этил-ллауринат | моноэтил-сукцинат | |
| I-1 | 4,1 | 0,0 | 1,5 | 1,3 | 0,6 | 1,7 | 0,2 | 8,9 | 18,3 |
| I-76 | 6,1 | 0,2 | 1,4 | 1,1 | 0,7 | 2,8 | 0,2 | 6,6 | 19,1 |
| I-144 | 3,0 | 0,0 | 1,0 | 0,4 | 0,6 | 0,9 | 0,0 | 4,1 | 10,0 |
| I-279 | 5,9 | 0,3 | 1,0 | 0,2 | 0,6 | 1,8 | 0,0 | 2,9 | 12,7 |
| I-421 | 7,8 | 0,2 | 1,3 | 0,5 | 1,0 | 1,4 | 0,1 | 2,1 | 14,4 |
| I-438 | 4,2 | 0,1 | 1,1 | 0,3 | 0,6 | 0,8 | 0,1 | 4,1 | 11,3 |
| I-491 | 0,6 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 | 2,9 | 0,1 | 3,3 | 7,5 |
| I-492 | 1,5 | 0,2 | 1,0 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | 0,1 | 3,0 | 7,1 |
| I-493 | 5,0 | 0,0 | 1,2 | 0,2 | 1,0 | 1,2 | 0,1 | 4,1 | 12,8 |
| I-525 | 3,6 | 0,1 | 0,8 | 0,3 | 0,7 | 0,5 | 0,0 | 3,4 | 9,4 |
| I-637 | 6,4 | 0,4 | 1,2 | 0,8 | 0,7 | 2,1 | 0,1 | 5,4 | 17,1 |
| I-638 | 0,4 | 0,0 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,7 | 0,1 | 3,9 | 5,7 |
| И-2 | 5,1 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,5 | 1,3 | 0,0 | 4,3 | 11,3 |
| И-6 | 5,7 | 0,0 | 1,2 | 0,3 | 0,8 | 1,3 | 0,1 | 5,2 | 14,6 |
| И-11 | 3,1 | 0,3 | 1,4 | 1,3 | 0,8 | 3,5 | 0,2 | 7,3 | 17,9 |
| И-14 | 0,1 | 0,0 | 0,3 | 0,1 | 0,0 | 1,1 | 0,0 | 2,4 | 4,0 |
| И-15 | 3,9 | 2,0 | 1,5 | 1,4 | 0,8 | 3,1 | 0,2 | 5,6 | 18,5 |
| И-16 | 3,2 | 0,4 | 1,5 | 0,1 | 1,5 | 3,1 | 0,2 | 6,8 | 16,8 |
| И-21 | 0,8 | 0,0 | 0,7 | 0,3 | 0,5 | 1,4 | 0,1 | 4,2 | 8,0 |
| И-30 | 2,4 | 0,3 | 1,7 | 1,4 | 1,0 | 2,6 | 0,2 | 7,5 | 17,1 |

В результате органолептической оценки полученных виноматериалов нами были отобраны 7 исследованных образцов, которые отличались сортовым ароматом мускатного направления с разной степенью проявления тонов цитрусовых и розы, приготовленных с использованием штаммов дрожжей I-1, I-76, I-279, I-438, I-492, I-637, I-638. При этом образцы, приготовленные с использованием штаммов I-76, I-637 отличались более полным и гармоничным вкусом с медово-цитрусовыми оттенками (таблица 3).

Таблица 3 – Сравнительная оценка виноматериалов, приготовленных на штаммах №I-76 и I-637

| Параметр | Штамм | |
|---|---|---|
| | № I-76 | № I-637 |
| Объёмная доля этилового спирта, % | 11,7 | 11,9 |
| Массовая концентрация сахаров, г/л | 2,1 | 1,9 |
| Массовая концентрация титруемых кислот, г/л | 7,5 | 6,9 |
| Массовая концентрация летучих кислот, г/л | 0,36 | 0,23 |
| Массовая концентрация α -терпинеола, мг/л | 0,22 | 0,11 |
| Массовая концентрация гераниола, мг/л | 0,31 | 0,11 |
| Массовая концентрация линалоола, мг/л | 0,78 | 0,36 |
| Массовая концентрация β -фенилэтанола, мг/л | 59,4 | 34,5 |
| Массовая концентрация изоамилового спирта, мг/л | 94,8 | 131,3 |
| Сумма сложных эфиров, мг/л | 19,1 | 17,1 |
| Органолептическая характеристика | Светло-соломенного цвета. Аромат тонкий, цветочного направления с тонами розы и цитрона. Вкус округлый, цветочно-фруктовый, с легкой горчинкой. | Светло-соломенного цвета. Аромат яркий, пряно-медовый, с цветочными тонами и цитроном. Вкус гармоничный, с горчинкой, медовой и цитроновой нотой. |

Анализируя данные, представленные в таблице 3, нами был выбран штамм № I-76 по его способности к синтезу больших количеств веществ, определяющих особенности сортового ароматического профиля винограда Цитронный Магарача и результатам дегустационной оценки.

3.5. Разработка усовершенствованной технологии производства виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача

На основании полученных результатов была усовершенствована технология производства виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача. Технология предусматривает обработку суслу на стадии осветления ФПДЭ, полученным при культивировании штамма дрожжей *K. marxianus* № III-407 и сбраживание на штамме *S. cerevisiae* № I-76.

Производственные испытания усовершенствованной технологии

осуществляли в 2016 г. на винзаводе филиал «Ливадия» ФГУП «ПАО «Массандра» по схеме, представленной на рисунке 11.



Рисунок 11 – Схема производства сортовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача

Характеристика полученных виноматериалов представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Органолептическая оценка виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача

| № п/п | Опыт | Характеристика | Дегустационная оценка, средний балл |
|-------|-----------------------------|--|-------------------------------------|
| 1 | № I-76, без обработки ФПДЭ | Легкий опал. Светло-соломенного цвета. Аромат яркий, пряно-медовый с цветочными тонами и цитроном. Вкус гармоничный, с горчинкой, медовой и цитронной нотой. | 7,75 |
| 2 | № I-527, без обработки ФПДЭ | Легкий опал. Светло-соломенного цвета. Аромат слабовыраженный мускатно-цветочного направления. Вкус полный, гармоничный с легкой горчинкой | 7,72 |
| 3 | № I-76, обработка ФПДЭ | Прозрачное. Светло-соломенного цвета. Аромат яркий, пряно-медовый с цветочными тонами и цитроном. Вкус гармоничный, с горчинкой, медовой и цитронной нотой. | 7,75 |
| 4 | № I-527, обработка ФПДЭ | Прозрачное. Светло-соломенного цвета. Аромат слабовыраженный мускатно-цветочного направления. Вкус полный, гармоничный с легкой горчинкой | 7,72 |

Виноматериалы, приготовленные с использованием штамма № I-76, характеризовались более ярким, пряно-медовым ароматом с цветочными и цитронными тонами. Применение ФПДЭ не оказало влияния на снижение качества виноматериалов.

По результатам производственных испытаний была утверждена технологическая инструкция (ТИ 9103063859.002:2016) по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей *S. cerevisiae* (№ I-76) и *K. marxianus* (№ III-407).

В сезоны виноделия 2019-2022 гг. на винзаводе ООО «АПК Мильстрим-Черноморские вина» проведено внедрение разработанной нами технологии приготовления сортовых виноматериалов с применением ФПДЭ, на стадии осветления виноградного сусла, и штамма № I-76 для проведения процесса брожения. С применением указанной технологии выработано 23 820 дал виноматериалов высокого качества с экономическим эффектом 158,5 тыс. руб.

Фактический экономический эффект внедрения составляет 6 660 руб. на 1000 дал виноматериалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. На основании анализа научно-технической и патентно-информационной литературы определены основные направления совершенствования технологии производства виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача.

2. Выполнены исследования эндополигалактуроназной активности штаммов дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*. Подтверждена перспективность использования штаммов дрожжей рода *Kluyveromyces* в качестве продуцентов эндополигалактуроназы.

3. Впервые проведен филогенетический анализ генов *PGU* у дрожжей рода *Saccharomyces*. Установлены видовые особенности и подтверждено наличие нескольких генов *PGU* у дрожжей вида *S. bayanus* var. *ivarum*, что указывает на перспективность применения штаммов данного вида для снижения пектиновых веществ при ферментации виноградного сусла.

4. Селекционирован и рекомендован для промышленного использования штамм дрожжей *K. marxianus* № III-407 (КМВ «Магарач») по способности продуцировать активную эндополигалактуроназу. Разработаны технологические условия получения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ), обеспечивающие максимальный выход фермента не менее 1500 ед./мл: разбавленное виноградное сусло до массовой концентрации сахаров 100 г/л, рН среды 3,5, температура 30 °С.

5. Оптимизированы условия применения ФПДЭ на стадии осветления виноградного сусла. Снижение вязкости на 5,8 % и количества взвесей в сусле до 57 % обеспечивается вносимой дозой препарата 4 мл/л при температуре

обработки 20 °С и продолжительность обработки 2 ч.

6. Разработан стандарт организации 01586301.041-2022 «Метод получения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы при культивировании штамма *Kluveromyces marxianus* III- 407».

7. Предложен подход к выбору штамма дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* для ферментации суслу, основанный на анализе данных органолептической оценки и количественной оценки веществ, обуславливающих аромат сорта Цитронный Магарача. Установлена перспективность применения селекционного штамма № I-76 (КМВ «Магарач») для производства виноматериалов с выраженным сортовым ароматом.

8. Усовершенствована технология по приготовлению виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и *Kluveromyces marxianus* (№ III-407). Разработана и утверждена технологическая инструкция по приготовлению виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и *Kluveromyces marxianus* (№ III-407) (ТИ 9103063859.002:2016).

9. Новая технология прошла производственные испытания на винзаводе филиал «Ливадия» ФГУП «ПАО «Массандра», объем опытной партии 1000 дал виноматериалов. Технология внедрена на ООО «АПК Мильстрим-Черноморские вина» (2019-2021 гг.), объем опытной партии составил 23 820 дал виноматериалов с экономическим эффектом 158,5 тыс. руб.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Иванова, Е.В. Инвентаризация и паспортизация культур дрожжей коллекции микроорганизмов виноделия «Магарач» / Е.В. Иванова, С.А. Кишковская, Т.К. Скорикова, Т.Н. Танащук, М.Ю. Шаламитский // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2016. – № 4. – С. 22-25.
2. Наумов, Г.И. Новое семейство пектиназных генов *PGU1b–PGU3b* у пектинолитических дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* / Г. И.Наумов, М.Ю. Шаламитский, Е.С. Наумова // Доклады Академии наук. – 2016. –Т. 467. – № 1. – С. 109.
3. Шаламитский, М.Ю., Танащук Т.Н., Загоруйко В.А. Влияние штаммов дрожжей на ароматический комплекс виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача / М.Ю. Шаламитский, Т.Н. Танащук, В.А. Загоруйко // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2021. – Т. 23. – № 1. – С. 66-71.
4. Скорикова, Т.К. Оценка способности дрожжей рода *Saccharomyces* использовать в качестве источника углеводов глюкозу и фруктозу / Т.К. Скорикова, Т.Н. Танащук, М.Ю. Шаламитский // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2017. – № 4. – С. 44-45.

5. Танащук, Т.Н. Влияние метода субкультивирования на сохранение свойств коллекционных культур / Т.Н. Танащук, Т.К. Скорикова, С.А. Кишковская, Е.В. Иванова, **М.Ю. Шаламитский**, Г.М. Ананченкова, В.И. Загоруйко, Чичинадзе Т.П. // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2016. – № 4. – С. 20-22.

Научные статьи в журналах БД Scopus

6. Наумов, Г.И. Молекулярная филогения пектиназных генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces* / Г.И. Наумов, **М.Ю. Шаламитский**, Н.Н. Мартыненко, Е.С. Наумова // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 6. – С. 703-712.
7. **Шаламитский, М.Ю.**, Наумов Г.И. Идентификация и полиморфизм пектиназных генов *PGU* в комплексе *Saccharomyces bayanus* / М.Ю. Шаламитский, Г.И. Наумов // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 5. С. 611.
8. Наумова, Е.С. Молекулярный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* / Е.С. Наумова, **М.Ю. Шаламитский**, Г.И. Наумов // Биотехнология. – 2019. – Т. 35. – № 2. – С. 30-37.

Научные статьи в журналах и сборниках:

9. Танащук, Т.Н. Скрининг природных изолятов дрожжей рода *Saccharomyces* для производства столовых виноматериалов / Т.Н.Танащук, **М.Ю. Шаламитский**, М.В. Ермихина, Л.А. Михеева// Виноградарство и виноделие. – 2018. – Т. 47. – С. 48-51.
- 10.**Шаламитский, М.Ю.** Селекция дрожжей для производства сортовых малоокисленных вин / М.Ю. Шаламитский, Т.Н. Танащук, В.А. Загоруйко // Виноградарство и виноделие. – 2013. – Т. 43. – С. 56-58.
- 11.**Шаламитский М.Ю.** Исследование эндо-полигалактуроназной активности разных видов дрожжей / М.Ю. Шаламитский // Инновации в науке. – 2014. – № 37. – С. 35-41.
- 12.**Шаламитский М.Ю.** Совершенствование приготовления вин из сорта «Цитронный Магарача» с использованием различных свойств микроорганизмов / М.Ю. Шаламитский // В книге: Инновационные технологии и тенденции в развитии современного виноградарства и виноделия. Тезисы докладов и сообщений Международной научно-практической интернет-конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Г.Г. Валуйко. 2014. С. 56-59.
- 13.**Shalamitskiy, M. Yu.**, Naumova E.S., Martynenko N.N., Naumov G.I. Phylogenetic analysis of pectinase genes *PGU* in the yeasts genus *Saccharomyces* / M. Yu. Shalamitskiy, E.S. Naumova, N.N. Martynenko, G.I. Naumov // 32th International specialized symposium on yeasts, Perugia, Italy, September 13-17, 2015– P. 219.

Шаламитский Максим Юрьевич

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Подписано в печать ____ . ____ . 2022. Заказ №
Формат 60×84/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Напечатано с оригинал-макета заказчика в типографии ИП Гальцовой Н.А.
Российская Федерация, Республика Крым,
г. Симферополь, пгт. Аграрное, ул. Парковая, 7, кв. 908.
Email: nisfo@mail.ru Тел.: +7(978)781-38-81