

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Всероссийский национальный научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН»

На правах рукописи

Шаламитский Максим Юрьевич

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

05.18.01 – технология обработки, хранения и переработки злаковых, бобовых культур, крупяных продуктов, плодоовощной продукции и виноградарства

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель
доктор технических наук,
профессор, чл.-кор. НААН
Загоруйко Виктор Афанасьевич

Ялта – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1.Состояние виноградарской отрасли Республики Крым и характеристика перспективных сортов винограда для производства виноматериалов.....	12
1.2.Агротехническая и технологическая характеристика сорта винограда Цитронный Магарача.....	14
1.3.Влияние степени осветления сусла на качество виноматериалов.....	16
1.4.Способы осветления виноградного сусла.....	20
1.5.Пектолитические ферменты дрожжей и их роль в виноделии.....	26
1.6.Генетические особенности эндополигалактуроназы у дрожжей рода <i>Saccharomyces</i>	29
1.7.Влияние штаммов дрожжей на формирование органолептических показателей виноматериалов с мускатным ароматом.....	31
1.8.Выводы из обзора литературы и обоснование задач исследований.....	35
РАЗДЕЛ 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	37
2.1.Объекты исследований.....	37
2.2.Методика проведения экспериментальных исследований.....	38
2.2.1. Скрининг штаммов дрожжей родов <i>Kluyveromyces</i> и <i>Saccharomyces</i> по способности к синтезу внеклеточной эндополигалактуроназы.....	38
2.2.2. Изучение влияния условий культивирования на эндополигалактуроназную активность селекционного штамма дрожжей <i>K. marxianus</i> (№ III-407, КМВ "Магарач").....	40
2.2.3. Приготовление ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ) с использованием селекционного штамма дрожжей <i>K. marxianus</i> (№ III-407, КМВ "Магарач").....	41

2.2.4. Определение оптимальной дозы ФПДЭ для обработки виноградного сусла.....	42
2.2.5. Филогенетический анализ генов <i>PGU</i> дрожжей рода <i>Saccharomyces</i>	42
2.2.6. Приготовление виноматериалов в условиях микровиноделия из винограда сорта Цитронный Магарача.....	43
2.3. Методы анализа.....	43
2.3.1. Общие методы анализа.....	43
2.3.2. Микробиологические методы анализа.....	46
2.3.3. Генетические методы анализа.....	47
2.3.3.1. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК и Саузерн гибридизация.....	47
2.3.3.2. Определение видовой принадлежности природных изолятов дрожжей <i>Kluveromyces</i> и <i>Saccharomyces</i>	50
2.4. Математическая обработка и интерпретация полученных результатов.....	53
2.5. Приборное обеспечение экспериментов.....	53
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	55
3.1. Скрининг штаммов дрожжей родов <i>Kluveromyces</i> и <i>Saccharomyces</i> по способности к синтезу эндополигалактуроназы.....	55
3.1.1. Изучение способности дрожжей синтезировать внеклеточную эндополигалактуроназу.....	55
3.1.2. Скрининг штаммов по способности синтезировать эндополигалактуроназу при культивировании на виноградном сусле.....	58
3.1.3. Селекция штамма <i>K. marxianus</i> (№ III-358) методом улучшающего отбора.....	59
3.2. Оптимизация режимов синтеза внеклеточного фермента эндополигалактуроназы штаммом дрожжей <i>K. marxianus</i> № III-407.....	62
3.2.1. Исследование влияния массовой концентрации сахаров виноградного сусла на синтез фермента эндополигалактуроназы.....	62

3.2.2. Исследование влияния величины pH виноградного сусла на синтез фермента эндополигалактуроназы.....	64
3.2.3. Изучение влияния температуры культивирования на синтез фермента эндополигалактуроназы.....	65
3.3. Исследование влияния ФПДЭ на осветление виноградного сусла.....	67
3.4. Выбор стартовой культуры для проведения процесса брожения сусла из винограда сорта Цитронный Магарача.....	70
3.4.1. Молекулярный и фенотипический отбор штаммов продуцентов эндополигалактуроназы для виноделия.....	70
3.4.2. Выбор штамма дрожжей рода <i>Saccharomyces</i> для сбраживания виноградного сусла.....	75
3.4.3 Изучение влияния штаммов дрожжей на ароматический комплекс виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача.....	78
3.5. Разработка усовершенствованной технологии производства виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	93
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	94
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	123

ВВЕДЕНИЕ

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.

Тенденцией развития современного виноделия является увеличение производства легких столовых вин с выраженными ароматом и вкусом, характеризующих сорт винограда.

В данном аспекте наиболее привлекательными для потребителя являются вина из мускатных сортов винограда, среди которых заметно выделяется сорт винограда Цитронный Магарача, посадки которого на территории РФ составляют 527 га, в том числе в Крыму – 54 га.

Сорт характеризуется стабильно высокой урожайностью, повышенной морозостойкостью, достаточно высокой устойчивостью к возбудителям болезней, с выраженными специфическими мускатными оттенками. Однако сорт накапливает большое количество пектиновых веществ до 600 мг/100 г, что

затрудняет осветление виноградного сусла.

Степень разработанности темы. Поиск и селекция штаммов для проведения процесса брожения виноградного сусла является важной задачей, так как от технологических характеристик конкретного штамма дрожжей во многом зависит качество получаемых виноматериалов. Поиском и селекцией штаммов дрожжей для виноделия занимались многие ученые: Бурьян Н.И., Иванова Е.В., Кишковская С.А., Одинцова Е.Н., Саенко Н.Ф., Сербинова Н.И., Скорикова Т.К., Тюрина Л.В. и др. Однако в научных трудах этих исследователей отсутствует достаточное количество данных по поиску и селекции штамма дрожжей для конкретного сорта винограда, что очень важно для усиления или сохранения аромата винограда в виноматериалах. В этой связи, для производства и продвижения на рынок вин ЗГУ и ЗНМП данный вопрос становится еще актуальнее.

В то же время обширное внедрение новых сортов винограда с устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды, в виноградной ягоде которых содержится большое количество биополимеров, также требует решения задачи снижения данных веществ в сусле и вине. Изучению пектолитических ферментов дрожжей посвящено множество работ как отечественных (Датунашвили Е.Н., Лебедева В.В., Мунгиевой Н.А., Нгуен Л.А., Покровского А.В., Скориковой Т.К., Тюриной С.С. и др), так и зарубежных (Blanco P., Gognies S., Schwan R.F., Wimborne M. и др.) авторов. Однако на данный момент ферментные препараты дрожжей пектолитического действия менее распространены по сравнению с пектиназами, получаемыми из других микроорганизмов. Учитывая высокую вариабельность этой характеристики в зависимости от штамма-продуцента представляется важным и актуальным исследование дрожжей для поиска продуцента и оптимизации условий его культивирования для получения максимального количества секретируемого фермента.

Связь работы с научными программами, темами, планами. Диссертационная работа выполнялась в рамках госбюджетных исследований в

соответствии с планом НИР ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» по теме «Исследование, научное формирование и поддержание генофонда штаммов микроорганизмов виноделия» (ГЗ №№ 0833-2019-0008, 0833-2015-0005), грантов РФФИ № 15-34-50040 (Эволюционная генетика и селекция пектолитических ферментов дрожжей рода *Saccharomyces*) и № 17-04-00309 (Сравнительная генетика и геномика видов-двойников дрожжевого рода *Saccharomyces*, важного для фундаментальных и прикладных исследований), выполненных на базе Государственного научно-исследовательского института генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

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.

Задачи исследований:

1. исследование эндополигалактуроназной активности штаммов дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluveromyces* и оценка перспективности их использования в виноделии в качестве активных продуцентов эндополигалактуроназы;
2. скрининг конкурентоспособных штаммов с высокой активностью эндополигалактуроназы для эффективного осветления виноградного сусла;
3. разработка технологических режимов культивирования отобранного штамма для получения дрожжевого фермента эндополигалактуроназы;
4. разработка технологических режимов обработки сусла дрожжевым ферментом эндополигалактуроназы;
5. скрининг штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* по способности формирования аромата и вкуса виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача;
6. разработка технологических режимов сбраживания сусла отобранным штаммом дрожжей рода *Saccharomyces*;

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

Предмет исследования. Виноград, виноградное сусло, виноматериалы, штаммы дрожжей, ферменты.

Объекты исследования. Оптимизация приемов и режимов осветления и ферментации виноградного сусла, усовершенствование технологии производства виноматериалов с использованием селекционных штаммов дрожжей.

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

Проведен скрининг дрожжей вида *Kluveromyces marxianus* по способности к гидролизу пектина в виноградном сусле. Селекционирован штамм *Kluveromyces marxianus* (№ III-407), обеспечивающий максимальный выход фермента. Обоснованы и установлены закономерности изменения активности фермента и его влияния на осветление виноградного сусла в зависимости от технологических режимов. Научно обоснован способ получения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроказы (ФПДЭ) и его применения на стадии осветления виноградного сусла.

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

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

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

Разработана технологическая инструкция по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием селекционных штаммов дрожжей.

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 "Мильтрим-Черноморские вина" в объеме 23 820 дал столовых виноматериалов с экономическим эффектом 158,5 тыс. руб.

Методология и методы исследования. Методологической основой диссертации являются труды отечественных и зарубежных учёных, их разработки в области технологии виноделия, селекции микроорганизмов по заданным свойствам, генетических исследований микроорганизмов.

При выполнении работы использовались общепринятые методы физико-химических, биохимических, микробиологических, органолептических исследований.

Личный вклад соискателя в разработку научных результатов, вынесенных на защиту, состоит в анализе специальной литературы, постановке задач исследования, планировании и постановке экспериментов, анализе и обработке полученных результатов, подготовке к печати научных трудов, разработке нормативных документов, организации и проведении производственных испытаний новой технологии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Оценка перспективности использования дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* из КМВ "Магарач" в качестве активных продуцентов эндополигалактуроназы при производстве виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача на основе анализа данных биохимических и генетических исследований.

2. Селекционный штамм дрожжей *K. marxianus* № III-407 с высокой эндополигалактуроназной активностью для осветления виноградного сусла.

3. Способ получения и применения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы с использованием штамма дрожжей *K. marxianus* № III-407.

4. Скрининг штамма дрожжей рода *Saccharomyces* из КМВ "Магарач" и природных изолятов по способности формирования аромата и вкуса виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача.

5. Новые научные данные о физиолого-биохимических свойствах 12 промышленно ценных штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* из КМВ «Магарач» при ферментации сусла из сорта винограда Цитронный Магарача.

6. Перспективность применения штамма *S. cerevisiae* № I-76 для производства виноматериалов с выраженным ароматом из сорта винограда Цитронный Магарача.

7. Усовершенствованная технология по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и *Kluyveromyces marxianus* (№ III-407).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность и обоснованность основных выводов и результатов работы обеспечена квалифицированным использованием математического анализа, статистической обработкой экспериментальных данных, апробацией технологий разработанной продукции в условиях винзаводов филиал «Ливадия» ФГУП «ПАО «Массандра», и АПК "Мильтрим-Черноморские вина". Основные научные положения и результаты исследований доложены на заседаниях секций Ученого совета ФГБУН

«ВНИИВиВ «Магарач» РАН» по виноделию (2012-2014 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.).

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 – 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.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Состояние виноградарской отрасли Республики Крым и характеристика перспективных сортов винограда для производства виноматериалов

Производство винограда относится к одному из основных и значимых направлений агропромышленного комплекса. По состоянию на 2021 год только в Крыму возделывалось более 100 технических сортов винограда [61, 86]. Сортимент виноградных насаждений представлен преимущественно интродуцированными сортами западноевропейской группы (Алиготе, Каберне-Совиньон, Шардоне, Мерло, Рислинг рейнский и др.), доля которых составляет 46 %, и бассейна Черного моря (Ркацители, Кокур белый, Саперави и др.), на которые приходится 44 % [60, 266]. Лидирующие положение среди крымских автохтонных сортов занимают: Кокур белый, Шабаш (общая площадь 1010,4 га, 5,7 %) и Кефесия. Доля селекционных сортов (внутривидовых и межвидовых гибридов) составляет около 4 % площади всех виноградных насаждений Крыма. Большая часть из этих сортов характеризуется невысокой устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды, что в условиях постоянных изменений природно-климатических условий не гарантирует получение стабильного урожая и качественного сырья [57, 59]. Климатические условия в Крыму в целом благоприятны для успешного возделывания винограда, однако в отдельные периоды повреждения, вызванные различными эпифитотиями и заморозками, способствовали резкому сокращению урожайности, а иногда и гибели самого растения. Следовательно, производство продуктов переработки винограда, способных составить конкуренцию на внутреннем и мировом рынках как уникального продукта местности, становится проблематичным.

В связи с этим актуальной задачей виноградо-винодельческой отрасли является выведение и внедрение в производство новых сортов винограда – аналогов крымских автохтонов, обладающих генетически обусловленной

сопряженностью качественных и количественных признаков в сочетании с устойчивостью к стресс-факторам внешней среды. Отделом селекции института «Магарач» выведены высокоурожайные сорта винограда с повышенной устойчивостью к болезням и гармоничным мускатным ароматом, такие как Цитронный Магарача, Рислинг мускатный, Алиготе мускатное [12]. Сорта Первенец Магарача и Подарок Магарача отличаются повышенной устойчивостью к ряду неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе к низким температурам и корневой форме филлоксеры, а также характеризуется стабильно высокой урожайностью [87]. Литературные данные свидетельствуют о том, что по ряду показателей сорта винограда селекции института «Магарач» не уступают, а в некоторых случаях превосходят традиционные.

На данный момент существует необходимость реконструкции сортового состава технического винограда и одним из путей решения данной задачи является расширение сортимента высококачественных виноградных насаждений, устойчивых к абиотическим и биотическим стресс-факторам за счет сортов местной селекции, а также корнесобственной культуры [49, 61]. Так, с 2014 г. на территории Республики Крым было заложено более 6000 га новых виноградников. Значительная доля саженцев, используемых при закладке, приходилась на указанные сорта. Выведение новых сортов винограда, обладающих высоким потенциалом продуктивности и качества, сопряженного с устойчивостью к стресс-факторам биосферы, является актуальной проблемой виноградарства, над решением которой работают виноградары многих стран [103].

Начало работ по селекции таких сортов винограда связывают массовым распространением филлоксеры и грибных болезней, завезенных из Америки в Евразию, что привело к появлению нового метода создания новых сортов – межвидовой гибридизации, благодаря которой новые сорта сочетали в себе устойчивость американских видов и качество европейских. На первом этапе селекционная работа, проведенная рядом исследователей, привела к появлению большого числа гибридов, однако полученные сорта винограда имели низкое

качество урожая. Большой вклад в развитие данного направления внесли советские ученые И.В. Мичурин, П.Я. Голодрига, Я.И. Потапенко [103, 105] и др., которые в процессе длительной и кропотливой работы получили новые сорта, отличающиеся высокими показателями устойчивости, наряду с высоким качеством получаемого сырья.

Непрерывное проведение работ в данном направлении и отбор лучших сортов позволил расширить сортимент винограда [24, 69–71]. Многие из полученных сортов проходят испытания в различных эколого-географических зонах. Часть сортов уже введена в Реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, и площадь их возделывания в промышленных насаждениях постоянно расширяется [10, 16, 103, 105]. Так, отечественными селекционерами выведены перспективные сорта винограда, например, Кефесия Магарача, Морозко относят к зимостойким и морозоустойчивым. Среди сортов, обладающих устойчивостью к болезням и вредителям, можно отметить также Рислинг Магарача, Цитронный Магарача и другие [63].

По литературным данным возделывание таких селекционных сортов имеет экономическое преимущество за счет их высокой урожайности и сокращения количества обработок в период вегетации и созревания [6, 48, 50, 55].

Актуальной тенденцией развития современного виноделия является увеличение производства легких столовых вин с выраженными ароматом и вкусом, характеризующих конкретный сорт винограда. В данном аспекте наиболее привлекательными для потребителя являются вина из мускатных сортов винограда, среди которых заметно выделяется сорт винограда Цитронный Магарача, посадки которого на территории РФ составляют 527 га, в том числе в Крыму – 54 га.

1.2. Агротехническая и технологическая характеристика сорта винограда Цитронный Магарача

Цитронный Магарача создан во ВНИИВиВ «Магарач» в 1978 г. опылением

сорта Мадлен Анжевин смесью пыльцы двух контрастирующих генотипов – столового сорта Новоукраинский ранний (Джура узюм х Жемчуг Саба) и технической селекционной формы Магарач №124-66-26 (сибс сортов Первенец Магарача и Подарок Магарача). Авторы: В.А. Волюнкин, П.Я. Голодрига, Л.К. Киреева, В.П. Клименко, Ю.А. Мальчиков, Н.П. Олейников, Л.П. Трошин, В.Т. Усатов [104]. Введен в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, и относится к универсальным сортам, рекомендуемым для производства столовых и десертных виноматериалов [35, 64, 73, 98]. Характеризуется стабильно высокой урожайностью, повышенной морозостойкостью, достаточно высокой устойчивостью к возбудителям болезней. Мякоть нежная, сочная с выраженными специфическими оттенками цитрона и муската [68] Отмечается сопоставимость его ароматического профиля с сортом винограда Мускат белый [12].

Срок созревания: раннесредний с быстрым сахаронакоплением (20-25 г/100 мл), содержанием титруемых кислот в диапазоне 6,0-7,0 г/л. Средний выход сусла: 70 дал из 1 т винограда [110]. К недостаткам сорта следует отнести повышенное накопление пектиновых веществ, что затрудняет осветление виноградного сусла и приводит к увеличению расхода вспомогательных веществ. Массовая доля пектиновых веществ в ягодах является сортовой особенностью винограда и может зависеть от зоны произрастания. Исследованиями Бареевой Н.Н. и Донченко Л.В. [11] показано, что содержание пектина в таких сортах винограда как Цитронный Магарача, Первенец Магарача, Виорика в Краснодарском крае может варьировать от 1,85 до 2,03 %. По данным других авторов этот показатель у сорта винограда Цитронный Магарача, произрастающего в Крыму, довольно высокий и может достигать уровня до 600 мг/100 г, что превышает его содержание в винограде сорта Мускат белый в 2,4 раза [72]. Количественное содержание и качественный состав компонентов фенольного комплекса у данных сортов сопоставимы. Отличительной особенностью винограда сорта Цитронный Магарача является способность к накоплению на 50 % больше водорастворимого белка [65, 67].

Вина, полученные из данного сорта винограда, характеризуются специфическим ароматом и вкусом цитронного направления с медово-мускатными нотами и полным гармоничным вкусом. В целом, данный сорт является перспективным для производства высококачественных вин с мускатным ароматом, но требует комплексного подхода к его переработке в связи с высоким содержанием пектиновых веществ.

Решение проблемы сохранения и усиления сортовых характеристик винограда сорта Цитронный Магарача, а также решение задачи по уменьшению пектиновых веществ в сусле, делает его перспективным для производства высококачественных белых сортовых вин с мускатным ароматом.

1.3. Влияние степени осветления сусла на качество виноматериалов

Осветление сусла – это технологическая операция, предназначенная для удаления посторонних микроорганизмов и взвешенных частиц, образующихся во время дробления виноградной ягоды. На данных частицах локализовано большое количество окислительных ферментов, которые при длительном контакте с суслом придают готовому продукту не характерные цветовые и вкусовые оттенки [7, 26]. Вина, полученные при сбраживании осветленного сусла, получают более легкими и ароматными, также повышается их биологическая стабильность.

Степень осветления сусла перед брожением рекомендуется оценивать по содержанию мелкодисперсных взвешенных частиц мути. Оптимальным значением данного показателя является диапазон 10 – 30 г/л. При более высокой степени осветления сусла (содержание взвешенных частиц менее 10 г/л) брожение сусла замедляется, что может привести к недобродам. Если концентрация взвесей высокая, процесс брожения проходит излишне интенсивно, вследствие чего виноматериалы получают грубыми, простыми и часто с посторонними тонами в аромате и вкусе.

Из литературных данных известно, что основными коллоидными компонентами виноградной ягоды являются пектиновые и белковые вещества,

доля которых составляет 50 и 15 % соответственно [42, 256]. Содержание растворимого пектина сусла может достигать до 50 % от общего количества пектиновых веществ, а пектиновой и пектовой кислоты – 30 и 20 % соответственно [53]. Различные авторы указывают на то, что высокие концентрации компонентов пектинового комплекса препятствуют осветлению сусла и обработке виноматериалов [81]. Негативной стороной наличия большого количества пектиновых веществ в сусле является то, что в процессе брожения происходит их деметоксилирование и это способствует обогащению виноматериалов метанолом [113]. Количество пектина в виноградном сусле может варьировать от 0,1 до 3,5 г/л [25, 36, 257]. Тюриной С.С. [106] было показано, что для успешного прохождения процесса осветления сусла за счёт собственных ферментов виноградной ягоды, содержание суммы биополимеров не должно превышать 0,12 %, в т.ч. пектина – не более 0,03 %.

Установлено положительное влияние осветления сусла при низких температурах на качество винопродукции, что приводит к снижению образования высших спиртов при интенсификации образования сложных эфиров [118, 134, 136, 221, 222, 262]. Многие виноделы и исследователи отмечали улучшение аромата белых сухих вин, получаемых из осветленного сусла [134]. В данных образцах были обнаружены высокие концентрации этиловых эфиров жирных кислот и ацетатов высших спиртов, обладающих приятным ароматом. В то же время высшие спирты идентифицированы в меньших количествах, по сравнению с винами, приготовленными из неосветленного сусла. Опыты по анализу сусла из гущевых осадков показали, что в них присутствуют травянистые и прелые оттенки, а в случаях, если виноград был поражен гнилью, плесневый тон [101]. По данным Dubourdieu et al. осветление сусла перед брожением приводит к снижению содержания спиртов C_6 ряда (пропиловый, бутиловый, амиловый, гексиловый и другие), повышенные концентрации которых приводят к появлению в готовых виноматериалах сивушных оттенков, аромата и вкуса прогорклого масла, горькие привкусы полевых трав (таблица 1) [141].

Таблица 1 – Влияние мутности сусла на образование спиртов С₆ ряда в вине

Образец	Мутность, NTU	Концентрация спиртов С ₆ , мг/л
Сусло неосветленное	400	2,0
Осветленное сусло	260	1,0
Сусло, после фильтрации гущевых осадка	8	0,9
Гущевой осадок	не определена	2,1

По литературным данным изучено влияние мутности исходного сусла на синтез дрожжами серосодержащих компонентов, обладающих неприятным ароматом (таблица 2) [185, 222]. Показано, что при мутности сусла более 250 NTU в виноматериале могут проявляться нехарактерные для напитка тона, что снижает его органолептическую оценку и качество продукта в целом. Авторы рекомендуют лимитировать мутность сусла на уровне в 250 NTU. Основным источником серы на винограде являются неорганические сульфаты. Их содержание зависит от многих факторов, таких как минеральный состав почвы, состава воды, используемой для полива, применяемых удобрений и пестицидов. Так, на виноградниках Австралии содержание серы, выраженное в сульфат-ионах, находится в диапазоне 139 – 381 мг/л, на виноградниках США, Канады и Европы значение показателя варьирует в более широком диапазоне 30 - 2200 мг/л [240]. Помимо неорганических соединений, сера входит в состав некоторых витаминов, таких как тиамин и биотин, а также глутатиона и серосодержащих аминокислот и белков [144, 222].

Если при получении виноматериалов использовали сусло с мутностью 510 NTU и более, то наблюдался повышенный синтез сероводорода, диметилдисульфида и других компонентов, негативно влияющих на аромат виноматериалов и вина (рисунок 1). Так, при превышении порога

Таблица 2 – Влияние мутности сусла на содержание серосодержащих веществ в виноматериалах, мкг/л [185]

Серосодержащий компонент	Мутность сусла, NTU			Порог восприятия, мкг/л	Аромат
	120	250	500		
2-меркаптоэтанол	113	140	179	130	луковичный, птичий
2-тетрагидро-тиофенон	102	131	191	70	масляный, бальзамический
2-метил-тиоэтанол	61	61	66	250	мясной
Этил-3(метилтио)пропаноат	1	2	2	300	луковый, сладко-фруктовый
3-(Метилтио)-1-пропанолацетат	5	6	6	50	мясной, луковый, овощной, сладкий
3-(Метилтио)-1-пропанол-1 (метионол)	1097	1958	3752	1200	кремовый, земляной, овощной, картофельный, томатный
4-(Метилтио)-2-бутанол	35	66	60	80	серный, картофельный, зеленые овощи
Диметил-сульфооксид	363	728	1448	не имеет запаха	—
Бензотиазол	28	26	29	50	резина
3-Метилтиопропионовая кислота	85	178	310	50	чесночный, луковый, серный, томатный

чувствительности метантиола в 0,3 мкг/л, в виноматериалах появлялся посторонний тон гнилой капусты, который является следствием недостаточного осветления сусла перед брожением. При снижении мутности исходного сусла до 270 NTU интенсивность посторонних тонов значительно снижалась, что приводило к улучшению аромата.

Рибери-Гайон П. [222] рекомендует перед брожением осветлять сусло до значений мутности 100 – 250 NTU, что позволяет создать баланс между активным процессом брожения и гармоничным ароматом.

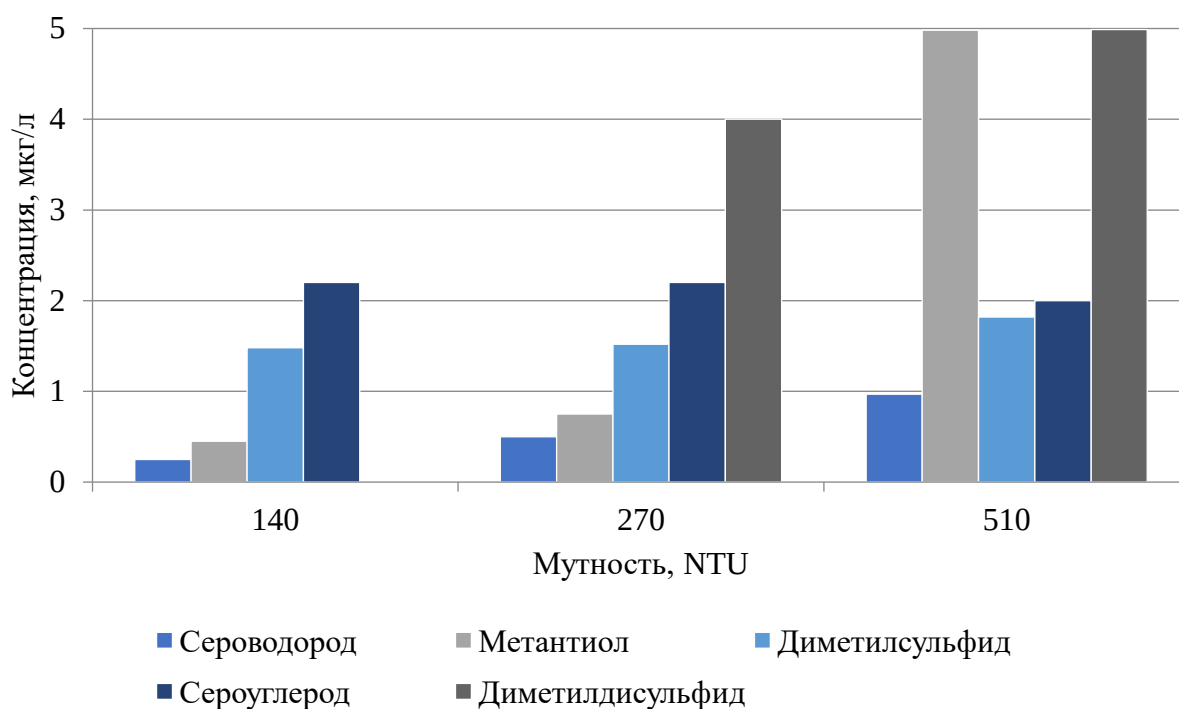


Рисунок 1 – Синтез дрожжами летучих серосодержащих компонентов в зависимости от мутности сусла [184]

Таким образом, процесс осветления сусла перед брожением оказывает значительное влияние на органолептические показатели получаемых виноматериалов, а эффективное проведение данного процесса позволяет значительно повысить качество получаемых вин.

1.4. Способы осветления виноградного сусла

Для получения качественных белых столовых вин из сортов винограда с высоким содержанием пектиновых веществ необходимо, чтобы процесс осветления сусла проходил быстро. Для снижения количества коллоидных веществ и уменьшения затрат при последующих технологических обработках необходимо удалить из сусла избыточное количество биополимеров.

В настоящее время для осветления виноградного сусла применяют различные способы, такие как отстаивание, флотация, фильтрация, центрифугирование, сепарирование, применение вспомогательных веществ и

другие.

На винодельческих заводах первичного виноделия виноградное сусло чаще всего осветляют путем отстаивания в крупных резервуарах в течение 18-24 ч при низких температурах. В случае проведения данной технологической операции без охлаждения существует риск самопроизвольного забраживания [80]. Во время осветления отстаиванием протекает ряд физико-химических (флокуляция, седиментация, адгезия взвесей) и биохимических (окисление, гидролиз) процессов, обуславливающих дальнейшее качество получаемых виноматериалов [18, 45].

Schopfer J.F. [231] разработал теорию осаждения частиц мути и вывел формулу расчета скорости процесса.

$$v = \frac{D^2}{18\eta} d\rho, \quad (1)$$

где v – скорость седиментации частицы, м/с;

D – диаметр частицы, принимая ее за сферическую, м;

$d\rho$ – разность плотности массы частицы и жидкости, кг/м³;

η – коэффициент динамической вязкости, кг/(с·м²).

Из данной формулы следует, что с уменьшением диаметра частицы скорость ее осаждения снижается. Аналогичная тенденция отмечается при повышении вязкости раствора, что может быть обусловлено высокой концентрацией сахаров, температурным режимом, высоким содержанием пектиновых веществ. Одно из основных заключений, которое приводит Schopfer J.F. [231] в своей работе, заключается в том, что для седиментации всех частиц диаметром более 0,2 мм требуется не более суток.

В большинстве случаев метод отстаивания позволяет получать хорошо осветленное сусло. При этом гущевой осадок, оставшийся после осветления, необходимо сбрасывать отдельно. Количество гущевого осадка может составлять

5 % и более, и в значительной мере зависит от многих факторов, таких как сорт и качество перерабатываемого винограда, режимов и параметров его переработки, используемого оборудования, высоты отстойных резервуаров, применения вспомогательных препаратов.

Процесс осветления сусла методом центрифугирования состоит в разделении неоднородных смесей под действием центробежных сил. Взвешенные частицы мути, имеющие больший удельный вес, под действием центробежных сил направляются к стенкам центрифуги и там скапливаются, при этом осветленное сусло отводится из аппарата. Осадок удаляется либо периодически, либо непрерывно в зависимости от конструкции центрифуги. В настоящее время постепенно находят широкое применение декантерные центрифуги и сепараторы, которые используют не только для предварительного осветления виноградного сусла, но также при проведении переливок молодых виноматериалов, для ускорения проведения процесса их оклейки, которое сокращается в 3-4 раза по сравнению с процессом отстаивания [27].

Метод фильтрации для осветления сусла является наименее распространенным, ввиду трудоемкости и сложности процесса. Так как в виноградном сусле содержится большое количество коллоидов, они быстро закупоривают фильтрующие поверхности, что снижает эффективность фильтрации и/или приводит к ее остановке [18, 45, 231]. Для проведения эффективного процесса фильтрации требуется большая фильтрующая поверхность, что целесообразно только для случаев, когда необходимо получить прозрачное сусло. Однако данный метод осветления сусла может отрицательно влиять на качество получаемых виноматериалов, приводя к увеличению образования уксусной кислоты, ацетальдегида, метанола и высших спиртов на фоне снижения количества этилового спирта [112].

Флотационное осветление виноградного сусла применяется во многих странах Европы. Принцип метода основан на формировании гидрофобных хлопьевидных соединений в результате взаимодействия частиц мути сусла и вносимых флокулянтов. При пропускании через виноматериал инертного газа под

давлением 0,5-0,6 МПа комплексы, образованные с флокулянтами, всплывают на поверхность жидкости, образуя "шапку", которая периодически удаляется. Данный способ позволяет более быстро провести осветление сусла, однако массовое его внедрение на предприятиях сдерживается дороговизной оборудования и сложность его обслуживания [20–23, 43].

Таким образом, применение только физических методов не всегда позволяет качественно провести процесс осветления виноградного сусла. Для лучшего и быстрого проведения данного процесса следует применять вспомогательные вещества.

В практике современного виноделия, в зависимости от поставленных целей могут применяться разнообразные вспомогательные вещества. Сусло при осветлении может обрабатываться танином, бентонитом, активированным углем, различными ферментными препаратами или их комбинациями, в зависимости от поставленных целей.

По данным Schopfer J.F. [231] для качественного осветления сусла отстаиванием необходимо не менее 24 ч, однако присутствующие в сусле окислительные ферменты, локализованные на мутящих частицах, активно окисляют компоненты сусла, что способствует усилению покоричневения вин [40]. В большинстве случаев для подавления активности окислительных ферментов на данной стадии применяют диоксид серы в количестве до 100 мг/л, поскольку повышенные его концентрации (свыше 120 мг/л) могут способствовать задержке начала брожения сусла и излишнему накоплению уксусного альдегида, что негативно сказывается на качестве получаемых виноматериалов и вин [18].

Исследователями было предложено использовать бентонит в комбинации с сернистым ангидридом. Так, введение в сусло бентонита в количестве 2 г/л позволяет снизить дозу диоксида серы со 100 до 60 мг/л для подавления работы оксидаз [18]. Во время обработки сусла бентонитом происходит снижение содержания азотистых веществ. Зинченко В.И. [44] рекомендовал вносить бентонит в количестве 10-13 г/л, при этом дозировка 1 г/л способствует снижению общего количества азота до 26,4 %. Обработка с использованием бентонита

позволяет предупредить побурение вина и возникновение окислительного вкуса при переработке винограда, пораженного гнилью. При применении бентонита для осветления виноградного сусла, он адсорбирует на своей поверхности мутящие частицы и окислительные ферменты, но при этом последние остаются в активной форме. При взмучивании осадка происходит его контакт с воздухом – адсорбированные ферменты активируются и сусло вновь начинает поглощать кислород из воздуха, поэтому после обработки бентонитом нельзя допускать взмучивания осадка. Внесение бентонита на стадии осветления сусла является эффективным способом удаления белковых веществ и обеспечивает более быстрое прохождение брожения, а также снижение пенообразования [62]. При комбинированном применении бентонита и казеина происходит обесцвечивание сусла, с последующим ухудшением качественных показателей получаемых виноматериалов [3]. Обработка виноградного сусла бентонитом может снижать количество терпеновых спиртов в получаемых виноматериалах [127, 183], что негативно сказывается на их аромате [127].

В работах зарубежных авторов [263] показано повышение органолептических характеристик виноматериалов на 3-5 баллов (по 100 балльной шкале), приготовленных с использованием небольших количеств (0,3 г/л) осветляющих веществ (смесь очищенной целлюлозы, поливинилпирролидона, желатина и минеральных адсорбентов) по сравнению с увеличением дозы до 1 г/л или осветлением путем отстаивания. При наличии в сусле большого количества защитных коллоидов (пектинов, камедей) необходимо применение повышенных дозировок, применение которых может отрицательно повлиять на развитие букета и вкуса вина, а также потерю цвета [3, 17, 19, 258].

Таким образом, предоставленный обзор сведений о влиянии различных способов осветления сусла свидетельствует о том, что к основным недостаткам описанных способов относятся: разбавление виноградного сусла и ослабление ароматического профиля.

Эффективной и перспективной альтернативой вышеописанным методам осветления сусла предложено использовать ферментативные препараты, действие

которых направлено на гидролиз пектиновых веществ и белков, что способствует быстрой седиментации взвешенных частиц сусла, а также может положительно влиять на увеличение содержания альдегидов, эфиров, терпеновых спиртов в виноматериале [99].

Для ускорения осветления сусла Риберо-Гайон П. [222] предлагает ферментные препараты, получаемые из плесневого гриба *Aspergillus niger*. Несмотря на несомненные преимущества (высокая активность, комплексное действие на биополимеры сусла), применение данных препаратов сопряжено с рисками, так как при недостаточной очистке они могут привести к образованию нежелательных побочных продуктов. Одним из ферментов, синтезируемых грибом, является циннаматэстераза, воздействие которой на сусло приводит к гидролизу гидроксициннамат эфиров винной кислоты, в результате чего могут появляться посторонние бальзамические тона в виноматериалах [115, 126]. Пектинэстераза деметоксилирует пектин виноградного сусла, при этом повышая концентрацию метанола в сусле и вине.

В своей работе Martiniere P. et al. [193] показал эффективность применения пектолитических ферментов для осветления виноградного сусла в комплексе с фильтрацией через диатомитовый фильтр (рисунок 2). Так, при обработке сусла ферментным препаратом в дозе 0,5 г/л фильтруемость увеличилась в 7 раз, а мутность сусла снизилась в 9 раз. Общая скорость фильтрации после обработки возросла в 2 раза, а количество отфильтрованного сусла в 1,8 раза.

К настоящему моменту различными авторами [6, 36, 56, 97, 122, 123, 147, 232] показана способность дрожжей рода *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces* синтезировать фермент эндополигалактуроназу, которая разрушает пектиновые вещества, что приводит к увеличению выхода сусла и сокращению времени осветления. Системное исследование в данном направлении является перспективным продолжением и расширением симбиоза технологии и микробиологии с целью повышения качества готовой продукции.

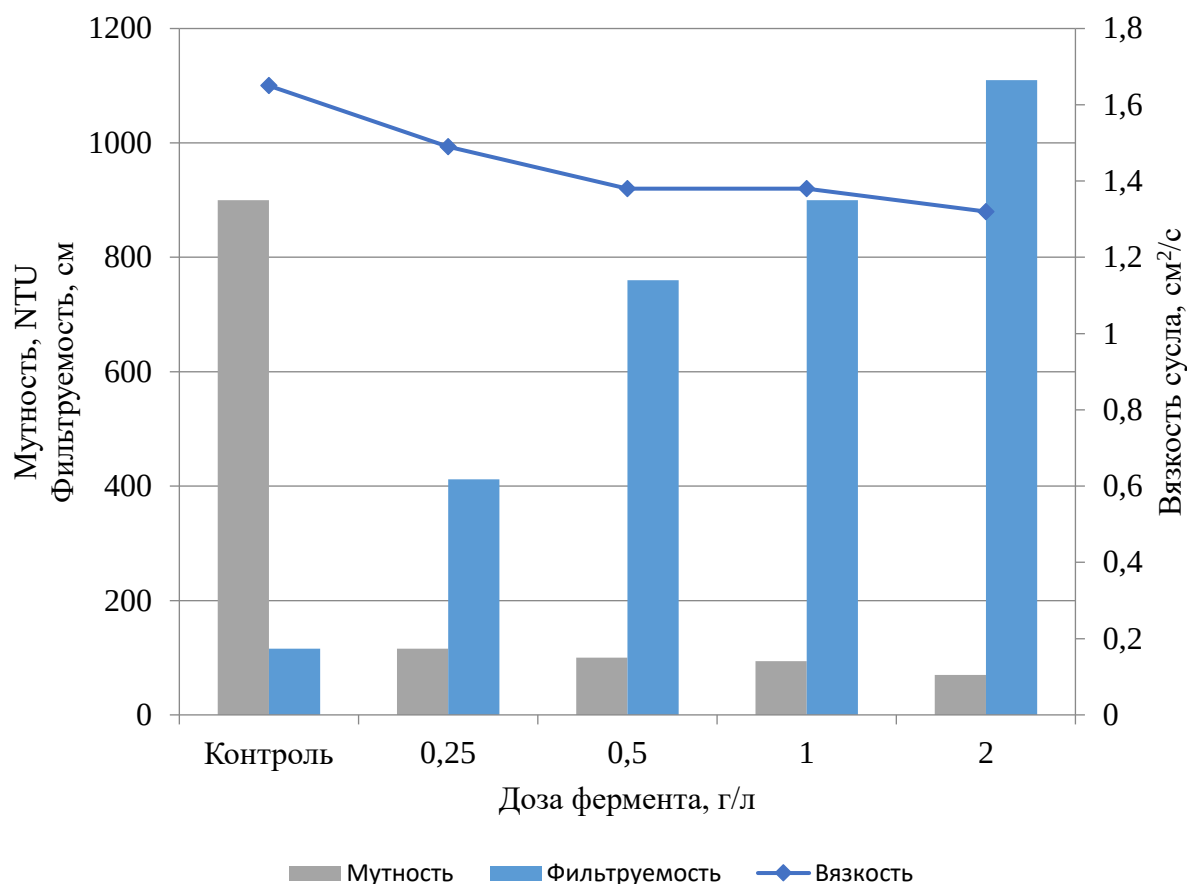


Рисунок 2 – Влияние дозы ферментного препарата на качество осветления сусла

Таким образом, с целью контроля и регулирования качества сусла для направленного формирования высоких органолептических показателей виноматериалов необходимо изучение физиолого-биохимических свойств различных штаммов дрожжей по способности к синтезу эндополигалактуроназы и их влияния на качество вина.

1.5. Пектолитические ферменты дрожжей и их роль в виноделии

Пектолитическая активность, в основном определяемая пектиназой (эндополигалактуроназой, К.Ф.3.2.1.15), – важный признак дрожжей, ферментирующих растительные субстраты, в состав которых входит высокомолекулярный пектин. Сам пектин представляет собой полисахарид, состоящий из соединенных между собой α -(1-4)-гликозидной связью остатков

галактуроновой кислоты, присутствующих в виде метилового эфира.

Основное действие эндополигалактуроназы направлено на разрушение α -(1-4)-гликозидной связи (рисунок 3), что приводит к снижению степени полимеризации пектиновых веществ, в результате чего происходит значительное снижение вязкости раствора. Это способствует увеличению общего выхода виноградного сусла, в том числе доли самотечной фракции.

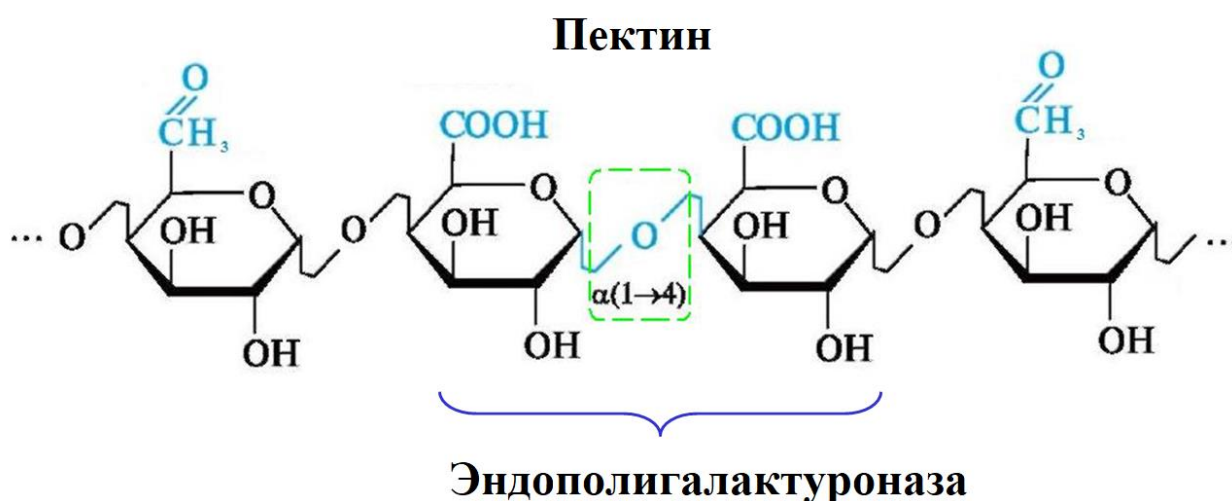


Рисунок 3 – Действие эндополигалактуроназы на молекулу пектина.

Изучение способности штаммов дрожжей, используемых и/или обнаруженных в виноделии, к синтезу внеклеточных ферментов, в частности эндополигалактуроназы проводилось отечественными и зарубежными учеными [36, 56, 273]. В результате исследований обнаружено довольно большое количество штаммов различных видов дрожжей, обладающих данным свойством, среди которых наиболее перспективными продуцентами можно считать штаммы, принадлежащие к роду *Kluyveromyces*.

Важным фактором при производстве ферментных препаратов является выбор продуцента и условий культивирования, которые в значительной степени влияют на количество синтезируемого фермента.

В результате исследований Wimborne M. и Riecard A. [273] обнаружили ферментативную активность у семи из 17 изученных штаммов вида

Saccharomyces fragilis (согласно современной классификации – *Kluyveromyces marxianus*) [182, 273].

Датунашвили Е.Н. [36] и сотрудники выявили способность к синтезу эндополигалактуроназы у 33 штаммов. Лебедевым В.В. [56] было исследовано 35 штаммов дрожжей, относящихся к следующим видам – *Fabospora fragilis*, *Fabospora macedoniensis*, *Zygofabospora marxianus*, *Candida macedoniensis*, *Candida pseudotropicalis* – согласно современной классификации все они синонимы *Kluyveromyces marxianus*, каждый из которых синтезировал эндополигалактуроназу при культивировании на среде с глюкозой. В дальнейшем Сониная Е.Г. [97] получила и изучила эндополигалактуроназу мутантного полиплоидного штамма дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* Кокур 3-286, температурный оптимум активности которого равнялся 30 °С, оптимум величины рН составлял 4,8. Автор отмечает, что при снижении температуры до 20 °С полученный фермент сохранял более 50 % от максимальной активности.

Отечественными авторами была выделена и охарактеризована эндополигалактуроназа двух штаммов дрожжей *Kluyveromyces marxianus*: ВКМ-У-480 [41] и штамма 54 [37, 56]. Температурный оптимум у полученного фермента равнялся 45 °С, а оптимальная величина рН – 5,2.

В своей работе Рябая Н.Е. [94] проанализировала более 150 штаммов, принадлежащих к различным родам (*Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Fabospora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Trishosporum*, *Saccharomycopsis* и *Saccharomyces*). В результате исследований был выбран штамм *S. bayanus* У-509, обладающий наибольшей способностью к синтезу эндополигалактуроназы. Фермент, синтезируемый данным штаммом, характеризовался широким диапазоном стабильности в зависимости от кислотности субстрата (рН 4,0-5,0) при температуре 45-50 °С.

Нгуен Л.А. [79] была разработана технология получения эндополигалактуроназы на молочной сыворотке с использованием штамма дрожжей *Kluyveromyces marxianus* ВКМ-У-848. В продолжение исследований Покровский А.В. [85] предложил использование виноградного сусла в качестве

питательной среды и использование полученного препарата для стабилизации крепленых вин. Дальнейшее развитие исследований позволило выявить влияние различных добавок в питательную среду для повышения количества синтезируемого фермента. Так, внесение в среду цитрусового пектинового гидролизата позволило увеличить выход фермента на 6 %, по сравнению с контролем [15].

На фоне развития генетических технологий, позволяющих более основательно изучить процессы, проходящие в дрожжевых клетках, исследование способности дрожжей к синтезу эндополигалактурназы представляет особый интерес.

1.6. Генетические особенности эндополигалактурназы у дрожжей рода *Saccharomyces*

В литературе имеются достаточно противоречивые сведения о пектолитической активности дрожжей.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются одним из базовых объектов в молекулярной биологии. Геном данных дрожжей секвенирован и аннотирован. В настоящее время у этого вида, имеется восемь видов-двойников: *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. eubauanys*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* и *S. jurei* [152, 161, 181, 203, 204, 208, 269]. Наибольший интерес для виноделия представляют штаммы видов *S. cerevisiae* и *S. bayanus*. Последний включает в себя две разновидности: *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum*. При этом винные штаммы представлены преимущественно второй разновидностью данного вида.

Одиночный структурный ген *PGU1* (= *PLG1*), кодирующий эндополигалактурназу, был выделен различными авторами из 13 штаммов дрожжей рода *Saccharomyces*, изолированных из различных источников [121, 138, 142, 146, 162, 172, 176]. Сравнение полученных последовательностей выявило до 7 аминокислотных замен, что свидетельствует о достаточно высоком сходстве. Другими исследователями была показана его высокая консервативность [261].

Клонирование данного гена из дрожжей рода *Kluyveromyces marxianus* показало высокое сходство с геном дрожжей *Saccharomyces* (до 58 % на уровне аминокислотных последовательностей) [176, 239].

Скрининг с помощью саузерн-гибридизации, проведенный испанскими и южноафриканскими учеными, показал, что у 9 штаммов из 61 исследованных винных дрожжей данный ген отсутствует, при этом только 36 штаммов могли синтезировать эндополигалактуроназу и разрушать пектин [146]. Отсутствие ферментативной активности у части штаммов может быть объяснено наличием псевдо-гена или подавлением его активности супрессором [190]. Авторами было выдвинуто предположение, что данный ген не является конститутивным для дрожжей рода *Saccharomyces* и может быть использован как внутривидовой маркер при проведении генетического и фенотипического анализа [146].

Divol B. и Rensburg P. [138] в своей работе предположили, что отсутствие эндополигалактуроназной активности дрожжей может быть связано с делециями, обусловленными мобильными Ту-элементами. Другие исследователи [121, 206] высказывали противоположное мнение о том, что данный ген является конститутивным, а кодирующий регион *PGU1* гена присутствует во всех дрожжах рода *Saccharomyces*, как обладающих способностью к синтезу фермента, так и не обладающих.

Более поздние работы [216] по изучению экспрессии данного гена показали, что она зависит не только от работы промотора, но и от позиции, в которой находится ген в хромосоме. Исследования, проведенные на нескольких штаммах дрожжей с различной ферментативной активностью, показали, что уровень активности зависит не столько от мутаций в самом гене или промотора, сколько от общей генетической структуры каждого отдельного штамма [138, 172, 216].

Известно, что ген *PGU* у дрожжей видов *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* расположен в теломерном районе хромосомы. В результате исследований различных авторов выявлена эпигенетическая природа подавления работы гена [189, 190], сочетающая в себе теломерный эффект положения [189, 260].

В работах, посвященных изучению мицелиальных грибов с высокой пектиназной активностью, было показано наличие в их геномах нескольких полимерных генов, которые могут оказывать кумулятивный эффект, усиливая соответствующее свойство [128, 131, 154 202].

У дрожжей *Saccharomyces*, активная ферментация сахаров, таких как мальтоза, сахароза, мелибиоза и растительный крахмал, обусловлена наличием в геноме дрожжей *S. cerevisiae* полимерных генов *MAL*, *SUC*, *MEL* и *STA* [77].

С другой стороны, у штаммов дрожжей вида *Kluyveromyces marxianus* с высокой пектолитической активностью присутствует только один ген *PGU*, что может свидетельствовать о его сверх экспрессии, обеспечивающейся регуляторными механизмами [238].

Известен шампанский штамм *S. bayanus* var. *uvarum* SCPP, который обладает всеми тремя активными пектолитическими ферментами: пектин-эстеразой, пектин-лиазой и эндополигалактуроназой [159, 162, 206]. Однако популяционная и эволюционная генетика пектиназ дрожжей *Saccharomyces* практически не изучена. Поиск подобных штаммов важен не только для генно-инженерных работ, но и для виноделия.

Молекулярный и фенотипический отбор винных штаммов, способных к синтезу эндополигалактуроназы и не образующих пектин-эстеразы, представляет большой интерес как для эволюционной генетики, так и как инструмент для генетического отбора и селекции винных штаммов дрожжей обладающих высокой эндополигалактуроназной активностью.

1.7. Влияние штаммов дрожжей на формирование органолептических показателей виноматериалов с мускатным ароматом

Одним из важных показателей качества виноматериалов является его аромат, который состоит из сложного комплекса первичных (виноград) и вторичных (синтезируемых во время брожения) ароматических веществ [5, 76, 84, 102, 124, 228, 230, 234].

Терпеновые спирты ответственны за наиболее узнаваемые и характерные ароматы винограда и вина. За мускатный аромат отвечают терпеновые спирты: гераниол, α -терпинеол, нерол и линалоол с его оксидами [83, 84, 100, 120, 137, 237]. Терпеновые соединения представлены в виноградной ягоде в двух формах – свободной и связанной [166, 175, 271, 272]. Большая часть терпенов в ягоде находится в связанной, гликолизидированной, форме, из-за чего не имеет аромата [166, 167]. Высвобождение ароматических спиртов может осуществляться под действием фермента β -гликозидазы, которая находится в кожице виноградной ягоды, однако её активность недостаточна для значительного увеличения концентрации терпенов в сусле [267]. Гликозидазы, способные усиливать аромат виноматериалов, были обнаружены у плесневых грибов [165, 168, 254]. Так добавление ферментного препарата, полученного из плесневого гриба *Botrytis cinerea*, в мезгу перед прессованием повышало количество ароматобразующих соединений в виноматериалах в 1,5 раза [163].

Многочисленные исследования показывают, что накопление терпеновых веществ в виноградной ягоде зависит от содержания сахаров и отличается в зависимости от сорта. Так, для винограда сорта Мускат белый максимум накопления терпеновых спиртов наблюдается при массовой концентрации сахаров – 170-190 г/л, для сорта Мускат александрийский – 220 г/л [47]. Для других сортов винограда максимум терпеновых веществ отмечен при следующих массовых концентрациях сахаров Шардоне – 160-180 г/л, Рислинг рейнский – 170 г/л, Таминер розовый – 172 г/л, Каберне-Совиньон – 210 г/л, Алиготе – 200-230 г/л [38, 39, 46, 47, 83, 95, 108, 133, 192]. При накоплении в винограде сахаров выше указанных значений для каждого сорта, происходит снижение содержания терпеновых спиртов [219, 270]. В то же время при осуществлении сбора при меньших значениях массовой концентрации сахаров в виноматериалах и вине появляются травянистые оттенки [133].

Отечественными и зарубежными авторами было показано, что при увеличении времени настаивания мезги значительная часть терпеновых спиртов переходит из кожицы в сусло [2, 4, 9, 93, 109, 125, 191, 220, 230]. Концентрация

терпеновых спиртов повышается в 1,3-3,8 раза при кратковременном настаивании мезги (до 8 ч) при температуре 16-20 °С [93, 107]. Однако, при производстве белых столовых виноматериалов необходимо предусматривать минимальный контакт сусла с твердыми элементами мезги, так как на твердых частях ягоды могут находиться окислительные ферменты, а из кожицы в сусло будет переходить излишнее количество фенольных веществ, которые придают белым столовым винам несвойственную им грубость, а при настаивании мезги – способствовать их дополнительному окислению [2, 66, 167, 255].

В процессе брожения виноградного сусла под воздействием дрожжей происходит преобразование ароматических соединений, перешедших из винограда в сусло [82, 88–93]. По литературным данным влияние дрожжей-сахаромицетов в процессе брожения на ароматический профиль мускатных сортов винограда во многом обусловлено их способностью к синтезу терпеновых спиртов, β -фенилэтилового спирта и этиловых эфиров жирных кислот [130, 178, 196, 197].

Ранними исследованиями была подтверждена способность дрожжей синтезировать терпеновые спирты [217]. Отмечено, что во время алкогольного брожения происходит изменение количественного содержания терпеновых спиртов под воздействием ферментативного аппарата дрожжей, однако их содержание остается выше порога восприятия [218, 219], при этом количество свободных терпеновых спиртов снижается в основном за счет гераниола и нерола, а содержание линалоола практически не изменяется. [135, 145, 167, 212, 213, 272].

Значительный синтез таких ферментов как глюкозидазы, ответственных за высвобождение терпеновых спиртов из связанной формы, отмечается у видов, не относящихся к роду *Saccharomyces* [148, 149, 200, 227], хотя по другим сведениям дрожжи не участвуют в разрушении гликозидных связей и высвобождении терпенов [140]. Из дрожжей не сахаромицетов представители вида *Kluyveromyces lactis* способны синтезировать цитронеллол, линалоол и гераниол [139], а также β -глюкозидазы [133]. У дрожжей вида *S. cerevisiae* данная активность встречалась только у некоторых штаммов [165, 195, 253]. В то же

время в работах С.Х. Абдуразаковой [1] с соавторами установлено, что при брожении образуются новые терпеновые спирты.

Сложные эфиры играют важную роль в формировании органолептических показателей вина [116]. Их образование связано с реакцией спиртов и органических кислот [114], при этом в вине они могут быть образованы двумя путями: за счет ферментов дрожжей и в результате протекания химических реакций во время выдержки [225, 244]. Синтез эфиров в дрожжевой клетке происходит за счет эстераз и липаз. Окончательный состав эфиров в вине зависит от температуры брожения, штамма дрожжей и других параметров [244], при этом их максимальное накопление наблюдается при объемной доле этилового спирта 9-12 % [177, 229]. Насчитывается 12 основных эфиров, чаще всего встречаемых в винах [224], среди которых наибольшее влияние на вкус вина оказывают: этилацетат, изоамилацетат, изобутилацетат, этилкапроат и 2-фенилацетат [225, 226, 245].

Так, изоамилацетат напоминает по запаху смесь груши и банана, у этилбутирата характерный ананасовый тон; этилкаприлат, этилкапринат, этилкапроат и другие высококипящие эфиры вносят фруктово-плодовый тон в аромат [158]. Разнообразные сложные эфиры не равноценны по интенсивности и их роль в аромате во многом зависит от их гармоничного сочетания.

Высшие спирты, как и сложные эфиры, оказывают значительное влияние на органолептические показатели вина. Так 1-бутанол и 1-пентанол при концентрациях до 300 мг/л вносят положительный вклад в аромат вина, при превышении этого порога появляется резкий запах [114, 245]. Образование высших спиртов тесно связано как с источниками азота в виноградном сусле [251, 252, 264], так и с ферментными аппаратами дрожжей [170]. Различные исследования связывают исходную концентрацию аминокислот в сусле с сортовыми ароматами [243]. Однако, показано, что образование различных спиртов происходит в конце брожения, когда большая часть аминокислот израсходована [153, 160], при этом образование изоамила, изобутанола и β -фенилэтанола происходит на протяжении всего спиртового брожения [171].

Обладая различными ферментными системами, штаммы способны продуцировать вторичные продукты брожения, отличающиеся по качественному составу и их количественному содержанию, тем самым в разной степени оказывая влияние на формирование ароматического профиля сортовых виноматериалов, [130, 157, 187, 210, 214, 249], что указывает на целесообразность подбора штамма в качестве стартовой культуры для брожения с учетом сорта винограда с целью получения винодельческой продукции высокого качества.

1.8. Выводы из обзора литературы и обоснование задач исследований

Из представленного литературного обзора следует, что в условиях современного производства направление совершенствования производства белых сортовых вин на основе метаболизма микроорганизмов является актуальным и перспективным. За несколько десятилетий накоплен огромный опыт, позволяющий на инструментальном уровне анализировать состав терпеновых спиртов, которые являются основными носителями аромата винограда и будущего вина, а также сложных эфиров, высших спиртов, являющихся фоновыми компонентами. Параллельно с этим развитие микробиологических приемов и массовое внедрение генетических исследований позволяет на новом уровне взглянуть на принципы поиска, анализа и совершенствования имеющихся штаммов продуцентов внеклеточных ферментов, а также дает возможность ускоренного поиска новых перспективных штаммов дрожжей.

Существующие ферментные препараты в основном изготавливаются на основе плесневых грибов различных родов, вследствие чего в их составе после очистки могут находиться незначительные количества нежелательных ферментов, приводящих к ухудшению качества и натуральности получаемой продукции.

Более перспективно применение пектолитических ферментов дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* в технологическом плане, так как они вырабатывают преимущественно фермент эндополигалактуроназу [75, 79, 85, 97, 106]. Это позволяет сократить время обработки сусла, а также в дальнейшем

сократить расход вспомогательных материалов, что приведет к сохранению природных компонентов ягоды, а значит сохранению природного аромата винограда в виноматериалах и вине.

Основываясь на вышеизложенном, для последующей работы были поставлены следующие задачи:

1. Провести скрининг коллекций дрожжей рода *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* с целью выявления активного продуцента эндополигалактуроназы.
2. Оптимизировать режимы культивирования дрожжей вида *K. marxianus* для получения максимальной секреции фермента.
3. Провести скрининг коллекции дрожжей рода *Saccharomyces* с целью выявления штамма максимально раскрывающего ароматические особенности сорта винограда Цитронный Магарача.
4. Разработать технологию производства виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача.
5. Провести апробацию усовершенствованной технологии приготовления белых столовых сортов вин с выраженным сортовым ароматом.

РАЗДЕЛ 2

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись:

– сусло и виноматериалы из винограда сорта Цитронный Магарача (ЮБК), выработанные в условиях микровиноделия на базе лаборатории микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»;

– 42 штамма дрожжей рода *Saccharomyces* и 36 штаммов дрожжей рода *Kluyveromyces* из КМВ «Магарач»;

– 96 природных изолятов дрожжей рода *Saccharomyces*, выделенных в Крыму с винограда мускатных сортов в период 2012-2016 гг.;

– 74 штамма дрожжей 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").

– виноматериалы из винограда сорта Цитронный Магарача, выработанные на предприятии филиал «Ливадия» ФГУП «ПАО Массандра» и ООО «АПК Мильстрим-Черноморские вина»;

Исследования проводили на базе лаборатории микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» и лаборатории молекулярной генетики дрожжей НИЦ «Курчатовский институт»- ГосНИИгенетика, Москва.

2.2. Методика проведения экспериментальных исследований

2.2.1. Скрининг штаммов дрожжей родов *Kluyveromyces* и *Saccharomyces* по способности к синтезу внеклеточной эндополигалактуроназы. Схема проведения эксперимента представлена на рисунке 4.

– При изучении способности дрожжей синтезировать внеклеточную эндополигалактуроназу в оптимальных условиях штаммы дрожжей, являющиеся потенциальными продуцентами эндополигалактуроназы по результатам анализа информационной базы данных генофонда КМВ «Магарач», оценивали по способности к синтезу фермента с помощью качественного теста, основанного на проявлении зон лизиса полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей при обработке их соляной кислотой [122, 232]. Для этого накопительную культуру в физиологически активном состоянии при помощи репликатора наносили в чашки Петри на плотную питательную синтетическую среду YNB (Difco), в которую добавляли 0,2 % глюкозы, 1,25 % полигалактуроновой кислоты (Sigma Aldrich), и 0,68 % калия монофосфат (KH_2PO_4), величина pH среды 5,5. Чашки инкубировали при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение двух суток. Чашки с выросшими колониями обрабатывали 6 Н раствором соляной кислоты и отбирали штаммы, вокруг которых проявлялись зоны просветления, свидетельствовавшие о наличии у них эндополигалактуроназной активности. Затем, отобранные штаммы культивировали в пробирках с 5 мл синтетической среды YPD следующего состава, г/л: глюкоза – 20, пептон – 20, дрожжевой экстракт – 10, величина pH – 5,0. Засев осуществляли микробиологической петлей и инкубировали при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 5 сут. Активность фермента определяли методом, описанном в п. 2.3. и отбирали штаммы с наибольшей активностью;

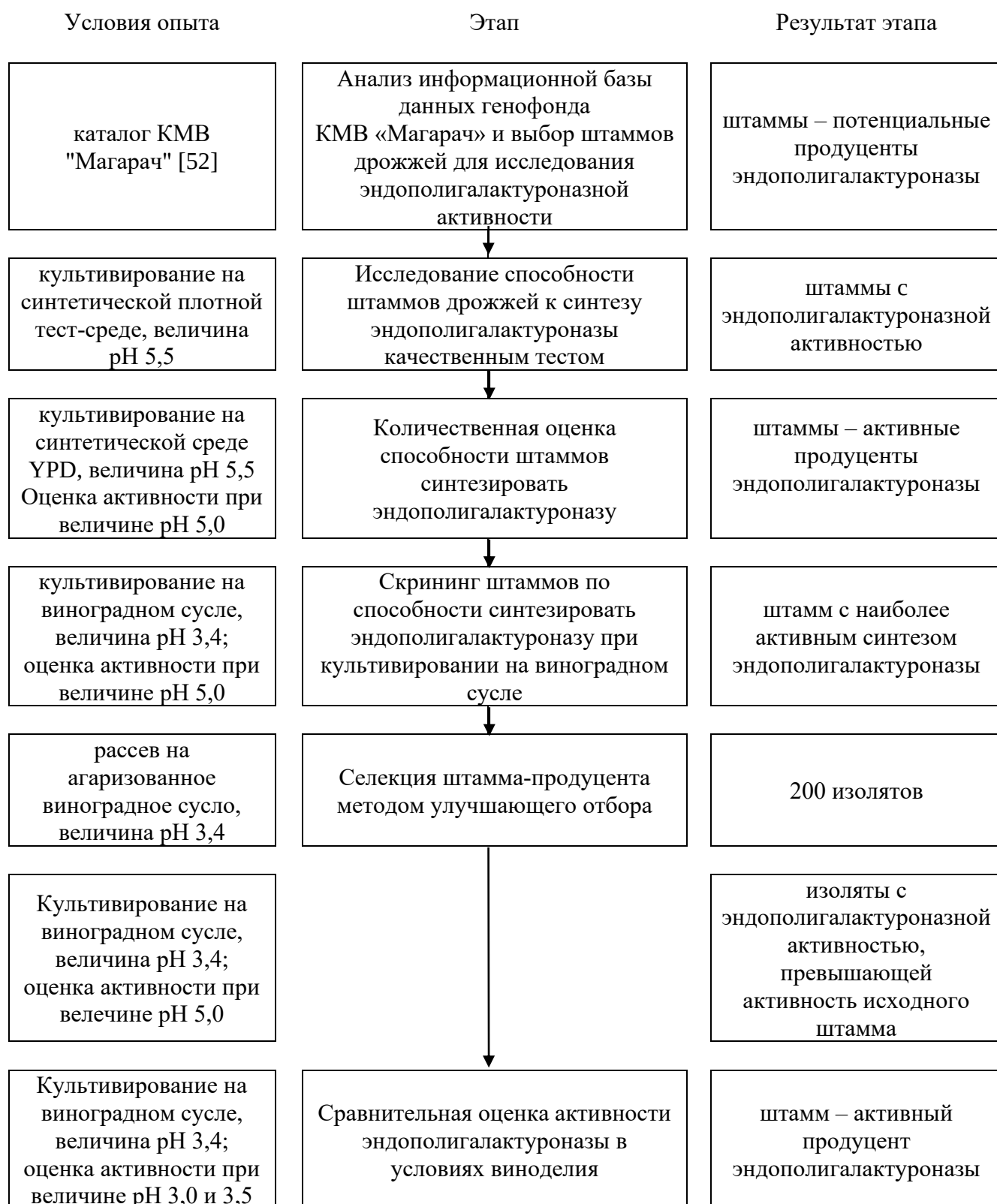


Рисунок 4 – Схема скрининга штамма по способности синтезировать
внеклеточную эндополигалактуроназу

– при скрининге штаммов по способности синтезировать эндополигалактуроназу при культивировании на виноградном сусле дрожжи культивировали в пробирках с 5 мл виноградного сусла с массовой концентрацией сахаров 200 г/л и величине pH – 3,4. Засев осуществляли микробиологической петлей и инкубировали при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 5 сут. Активность фермента определяли методом, описанном в п. 2.3, и отбирали штамм с наибольшей активностью;

– при селекции дрожжей методом улучшающего отбора исходный штамм петлей рассеивали на 10 чашек Петри с агаризованным виноградным суслом (массовая концентрация сахаров 200 г/л, величина pH 3,4) и культивировали при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 3-5 сут. до появления на поверхности среды сформированных колоний. Двести однородных по морфологии колоний отбивали в пробирки с пастеризованным виноградным суслом и культивировали при температуре $(30 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ до 5 сут. Отбирали пробирки с активным ростом изолятов и определяли в среде культивирования активность эндополигалактуроназы при величине pH 5,0. Для отобранных изолятов с более высоким уровнем активности фермента по отношению к активности исходного штамма проводили генетическое исследование (п. 2.3.3.2.) их принадлежности к виду *K. marxianus*. Далее культивировали на разбавленном виноградном сусле при $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течении 5 сут. и определяли активность эндополигалактуроназы с использованием ацетатных буферов с величиной pH 3,5 и 3,0. Отбирали селекционный штамм с максимальной ферментативной активностью.

2.2.2. Изучение влияния условий культивирования на эндополигалактуроназную активность селекционного штамма дрожжей *K. marxianus* (№ III-407, КМВ "Магарач"). Изучали влияние массовой концентрации сахаров виноградного сусла, величина pH виноградного сусла, температуры культивирования на накопление клеточной биомассы дрожжей и синтез эндополигалактуроназы.

Для культивирования использовали пастеризованное виноградное сусло одной партии со следующими физико-химическими показателями: массовая концентрация сахаров 200 г/л; величина рН 3,4. Предварительно получали накопительную культуру (разводку) дрожжей, культивируя отобранный штамм на исходном виноградном сусле при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2-3 сут. до концентрации клеток 30-40 млн. клеток/мл.

– Оценку влияния концентрации сахаров на эндополигалактуроназную активность дрожжей проводили на виноградном сусле, разведенном дистиллированной водой до массовой концентрации сахаров 50, 100, 150, 200 г/л, и, при необходимости, величину рН корректировали винной кислотой до значения 3,4. В склянки объемом 250 мл, содержащих по 100 мл виноградного сусла, вносили 1 % накопительной культуры. Инкубировали при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

– Оценку влияния величины рН на эндополигалактуроназную активность дрожжей осуществляли на виноградном сусле, исходную величину рН которого корректировали винной кислотой или безводным гидроксидом натрия до значений 2,5, 3,0, 3,5 и 4,0. В склянки, объемом 250 мл, содержащие по 100 мл виноградного сусла вносили 1 % накопительной культуры и инкубировали при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

– Оценку влияния температуры на эндополигалактуроназную активность дрожжей осуществляли на виноградном сусле. В склянки, объемом 250 мл, содержащие по 100 мл виноградного сусла вносили 1 % накопительной культуры и инкубировали, при температурах $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Пробы отбирали каждые 24 ч в течение 6 сут. Оценивали активность роста штамма (п. 2.3.2.) и определяли ферментативную активность (п. 2.3.).

2.2.3. Приготовление ферментного препарата дрожевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ) с использованием селекционного штамма дрожжей *K. marxianus* (№ III-407, КМВ «Магарач»). В качестве ФПДЭ использовали надосадочную жидкость

после окончания культивирования штамма дрожжей *K. marxianus* (III-407, КМВ «Магарач») в оптимальных условиях роста. Дрожжи засевали на виноградное сусло с массовой концентрацией сахаров 100 г/л, величиной pH 3,5 и культивировали в термостате при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ до 5 сут., перемешивая два раза в сутки. После двух суток культивирования ежедневно отбирали пробы для оценки активности внеклеточного фермента эндополигалактуроназы в надосадочной жидкости. Для осветления сусла использовали ФПДЭ с активностью не менее 1500 ед.

2.2.4. Определение оптимальной дозы ФПДЭ для обработки виноградного сусла. Для обработки использовали свежееотжатое виноградное сусло из винограда сорта Цитронный Магарача. Вносили диоксид серы из расчета общей массовой концентрации SO_2 75 мг/л. Стекланные цилиндры вместимостью 250 мл заполняли виноградным суслом по 200 мл и вносили ФПДЭ активностью 1500 ед. в количестве 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 мл/л. Схема проведения исследований состояла из следующих вариантов:

а) задача дрожжевого фермента при температуре $18-20^\circ\text{C}$ с последующим охлаждением до 10°C ;

б) задача дрожжевого фермента в охлажденное до 10°C сусло.

Выдержка сусла при 10°C осуществлялась в течение 24 ч. По окончании процесса сусло нагревали до температуры $18-20^\circ\text{C}$, измеряли его вязкость и количество взвесей.

2.2.5. Филогенетический анализ генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Определение внутривидовой и межвидовой дивергенции генов *PGU* у дрожжей рода *Saccharomyces* (приложение А) проводили, используя нуклеотидные последовательности структурных генов *PGU*, длиной 1086 п.н. Поиск гомологов в базах данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) и Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>) с

рамкой считывания (1086 п.н.) известной нуклеотидной последовательности гена *PGU1* дрожжей *S. cerevisiae* S288с проводили с помощью программы BLAST. В качестве внешней группы использовали ген *PGU* дрожжей *K. marxianus* KCTC17555 (CBS 6556). Множественные выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили вручную, используя программу BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) с применением Кимура-2 параметра в программе MEGA 6 [248]. В анализ были включены все нуклеотидные позиции, включая вставки и делеции. Значение бутстрепа, определяющего статистическую достоверность выделения групп, подсчитывали для 1000 псевдореплик.

2.2.6. Приготовление виноматериалов в условиях микровиноделия из винограда сорта Цитронный Магарача. Виноматериалы были приготовлены из одной партии винограда сорта Цитронный Магарача по схеме, представленной на рисунке 5. Виноград соответствовал технической зрелости и требованиям, предъявляемым к винограду, предназначенному для промышленной переработки [29].

Микробиологический контроль осуществляли в соответствии по ИК 970-1128-00334600-07; использовали микробиологические методы контроля, принятые в виноделии [14, 51]. Полученные виноматериалы были проанализированы по физико-химическим показателям (п. 2.3.).

2.3. Методы анализа

2.3.1. Общие методы анализа. Определение физико-химических показателей использовали стандартизированные и общепринятые в научных исследованиях методы анализа химического состава и свойств виноматериалов и вин.

Определяли:

– массовую концентрацию сахаров – по ГОСТ 13192 [28];

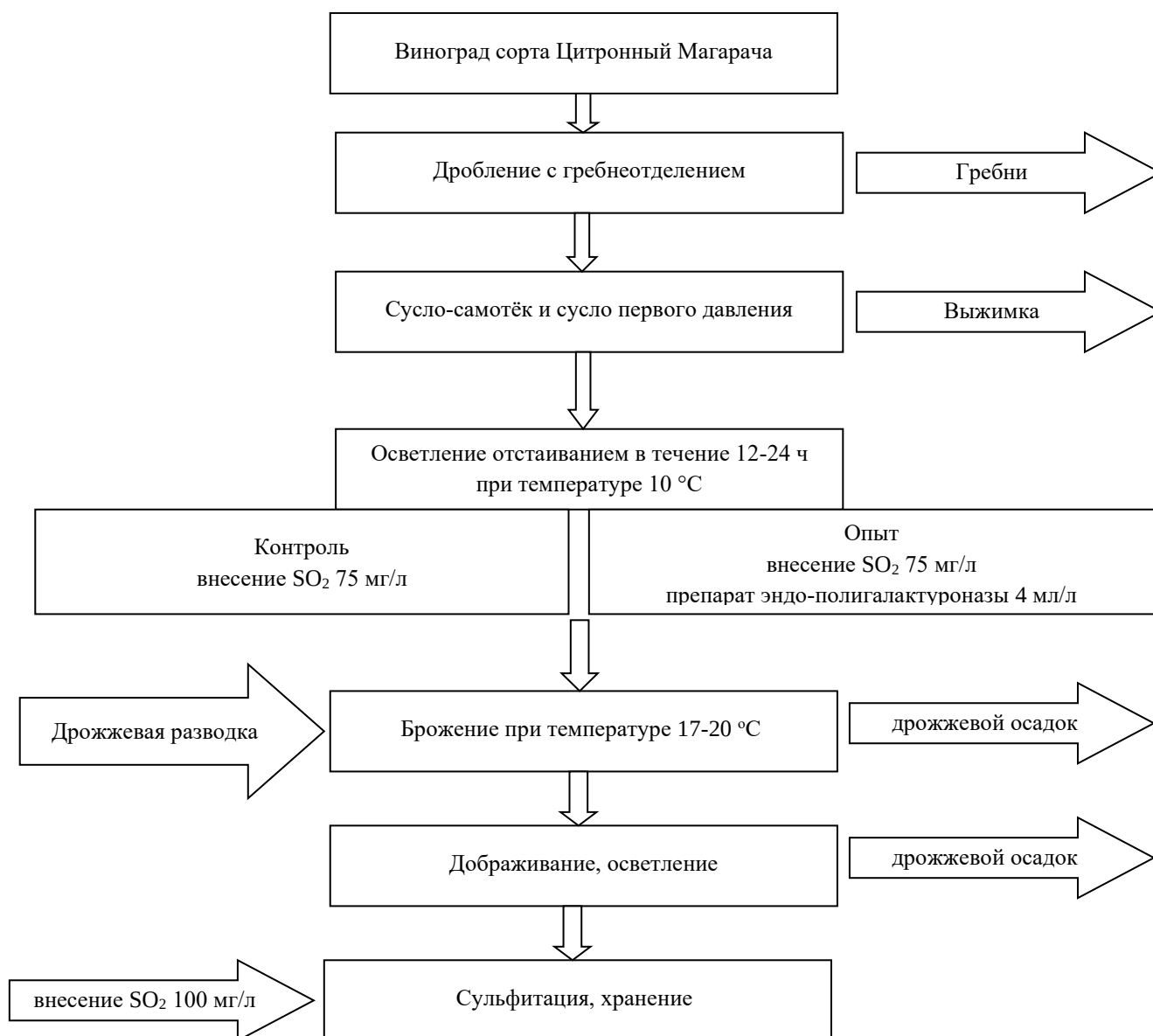


Рисунок 5 – Схема приготовления виноматериалов

- массовую концентрацию титруемых кислот – по ГОСТ 32114 [33];
- массовую концентрацию летучих кислот – по ГОСТ 32001 [30];
- объемную долю этилового спирта по – ГОСТ 32095-2013 [32];
- массовую концентрацию свободного и общего диоксида серы – по ГОСТ 32115-2013 [34];
- величину pH – потенциометрическим методом [74, с. 40];
- оптические характеристики – колориметрическим методом на

фотоэлектроколориметре КФК-3 в кюветах с длиной светового пути 10 мм при длине волны 590 нм;

– массовую концентрацию взвесей в сусле определяли гравиметрическим методом [74, с. 44];

– кинематическую вязкость – с помощью вискозиметра марки ВПЖ-2 с диаметром капилляра 0,73 мм при 20 °С [74, с. 231].

– эндополигалактуроназную активность дрожжей – вискозиметрическим методом Лифшиц Д.Б. [58] в модификации Тюриной С.С. [106]. Метод основан на измерении вязкости раствора пектина в процессе его гидролиза ферментами. Ферментативную активность определяли в надосадочной жидкости после удаления дрожжевого осадка путем центрифугирования при 2000 об/мин. Активность устанавливали по изменению вязкости 1,0 % раствора пектина в 0,2 М ацетатном буфере (рН 5,0). За единицу активности принимали такое количество ферментного препарата, которое способно гидролизовать 1 мг пектина при температуре 30 °С в среде с величиной рН 5,0, снижая вязкость субстрата на 20 %.

Расчет активности проводили по формуле:

$$A = \frac{100}{v \times t_{20}}, \quad (2)$$

где: 100 – количество субстрата в реакционной среде, мг

t_{20} – найденное время гидролиза, за которое вязкость раствора пектина снижается на 20 %, мин;

v – количество ферментного препарата, введенного в реакционную смесь, мл.

Снижение вязкости раствора пектина, в %, рассчитывали по формуле:

$$B = \frac{t_k - t}{t_k - t_d} \times 100 \%, \quad (3)$$

где: t_k – время истечения контрольного раствора, с;

t – время истечения анализируемого раствора, с;

t_d – время истечения дистиллированной воды, с.

Контролем служил раствор, в который вместо ферментного препарата вносили дистиллированную воду.

Количественное определение эндополигалактуроназной активности при низких значениях pH осуществляли согласно описанной выше методике, при этом вместо ацетатного буфера с величиной pH 5,0 использовали ацетатный буфер с величиной pH 3,5 или с величиной pH 3,0.

– Исследование качественного состава ароматобразующих компонентов – методом газохроматографического разделения компонентов на хроматографе Agilent Technology 6890 (колонка 30 м, INNOWAX, внутренний диаметр 0,25 мм, газ-носитель – гелий, скорость прохождения через колонку 1 мл/мин, температура испарителя 230 °C).

Качественный анализ терпеновых и высших спиртов осуществляли методом прямого укола. Остальные ароматобразующие компоненты виноматериалов экстрагировали хлороформом. Перед экстракцией в пробе создавали концентрацию внутреннего стандарта (амилового спирта) 1 мг/л. Для этого к 25 мл исследуемых виноматериалов доливали 1 мл хлороформа, перемешивали в течение 2 ч в закрытой притертой крышкой колбе вместимостью 100 мл на магнитной мешалке при 250 об/мин. Во избежание эмульгирования пробы следили за сохранением раздела фаз между пробой и экстрагентом. Шар хлороформа, содержащий летучие компоненты, переносили в пробирку вместимостью 2 мл, добавляли 0,1 мг безводного сульфата натрия для удаления влаги и после осветления раствора испаряли его потоком чистого азота до объема 50 мкл. Для хроматографического анализа отбирали 1-2 мкл раствора. Идентификацию компонентов проводили путем сравнения их масс-спектров с библиотекой данных NIST 02. Содержание летучих компонентов вычисляли без учета коэффициентов экстрагирования.

2.3.2. Микробиологические методы анализа. При проведении микробиологических работ использовали общепринятые методы экспериментальной микробиологии [13, 14]:

– определение размеров дрожжевых клеток и степени морфологической однородности культуры осуществляли в культурах, выращенных на виноградном сусле по истечении 2-3 сут. культивирования при температуре $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$, посредством светового микроскопирования, с использованием программного обеспечения «ImageScope M» [13, с. 345-347];

– определение числа клеток – подсчетом количества клеток в камере Горяева. Расчет примерного количества клеток (млн/мл) производили по формуле: сумма количества клеток в 5 больших квадратах умножали на 50 000 [14, с. 122-123];

– определение физиологического состояния клеток – в накопительной культуре с прижизненным окрашиванием раствором метиленового синего, используя камеру Горяева;

– оценку ростовой активности дрожжей (накопление биомассы) – по показателю оптической плотности на фотокolorиметре при длине волны 590 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм [14, с. 136-137];

– оценку способности дрожжей синтезировать сероводород – качественным тестом, основанном на реакции образования сульфидов металлов. Дрожжи микробиологической петлей засевали в пробирку с 10 мл виноградного сусла. Под ватной пробкой закрепляли тонкую полоску фильтровальной бумаги, пропитанной насыщенным раствором уксуснокислого свинца [14, с. 146]. Уровень синтеза сероводорода определяли по степени почернения бумаги (отсутствует, слабый синтез (почернение до 1 мм), средний (почернение 1-2 мм) и сильный (почернение более 2 мм)).

2.3.3. Генетические методы анализа

2.3.3.1. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК и Саузерн гибридизация

– при выделении хромосомной ДНК – штаммы дрожжей культивировали в 15 мл жидкой среды YPD на шейкере при 300 об/мин при температуре 28°C в течение 10-12 ч. Клетки дрожжей осаждали центрифугированием в течение 5 мин

при 2000 об/мин. Полученный осадок дважды промывали 1000 мкл буфера Трис/ЭДТА (10 мМ Трис, 50 мМ ЭДТА, pH 7,5), после чего суспендировали в 200 мкл буфера Трис/ЭДТА, в который предварительно был добавлен фермент Novozyme 234 в количестве 4 мг/мл, и инкубировали на водяной бане при 42 °С в течение 10 мин. Полученную суспензию перемешивали с 800 мкл легкоплавкой агарозы с массовой концентрацией 1 г/100 мл, охлажденной до 40 °С, и заливали в специальные блоки. Блоки помещали на лед до застывания агарозы, после чего переносили в 10 мл пробирки и заливали LET буфером (0,5 М ЭДТА, 10 мМ Трис, величина pH 7,5) и инкубировали в течение 2-3 часов при температуре 37 °С. Затем LET буфер заменяли на NDS (0,5 М ЭДТА, 10 мМ Трис, 1 % N-лаурол-саркозин, величина pH 9,0), в который добавляли протеиназу К в количестве 1-2 мг/мл и выдерживали в нем блоки в течение 10-12 ч. Полученные блоки 4 раза по 1 ч промывали буфером Трис/ЭДТА и хранили в нем же при температуре 4 °С;

– при амплификации гена *PGU* у дрожжей рода *Saccharomyces* дрожжевую ДНК выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit («Fermentas», Литва). Использовали пары праймеров для каждого вида исследуемых дрожжей (таблица 3).

Таблица 3 – Праймеры для гена *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*

Вид дрожжей	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>S. bayanus</i> var. <i>uvorum</i>	5'-CCACCAAACGCAATGATTT-3'	5'-ATGATGCACCTGAGCCAGAT-3'
<i>S. cerevisiae</i>	5'-TATTTCCACTTTGTGCGCTT-3'	5'-TCCTGCATCTTTGTTCTGTT-3'

ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2,5 единицы Taq-полимеразы («Синтол», Россия) и 20–200 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 94 °С в течение 3 мин, затем 30 циклов в следующем режиме: денатурация при 94 °С – 30 с, отжиг праймеров при 56 °С – 30 с, синтез ДНК при 72 °С – 60 с; конечная достройка при 72 °С – 10 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в агарозном геле с массовой концентрацией агарозы

1 г/100 мл при 60–65 В в 0,5×TBE буфере (45 мМ Трис, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота, величина pH 8,0) в течение 2–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали 1kb DNA Ladder (Fermentas, Литва). Амплифицированные фрагменты генов *PGU* элюировали из геля с помощью набора DNA Extraction Kit (Fermentas, Литва) согласно протоколу фирмы изготовителя;

– разделение хромосомной ДНК осуществляли на аппарате CHEF-DR III (Bio-Rad, США). Образцы помещали в щели агарозного геля с массовой концентрацией агарозы 1 г/100 мл. Пульс-электрофорез проводили при 200 В в течение 15 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч – 90 с. В качестве буфера использовали 0,5×TBE, охлажденный до 14 °С. Кариотипическим стандартом служил штамм *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 (Bio-Rad), имеющий известный порядок и размеры хромосом. Окрашивание геля проводили бромистым этидием в течение 2-3 ч, затем промывали в дистиллированной воде в течение 2 ч и фотографировали в УФ-свете.

Хромосомную ДНК переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя аппарат Vacuum blotter (Bio-Rad). ДНК фиксировали на мембране путем отжига при 80 °С в течение 2 ч. В качестве зондов использовали ПЦР-амплифицированные фрагменты кодирующей области гена *PGU1* штаммов дрожжей видов *S. bayanus* var. *uvareum* (MCYC 623), *S. cerevisiae* (YNN 295). Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием dUTP, меченого дигоксигенином (dig-II-dUTP), из набора «DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I» согласно инструкции (Roche, Швейцария);

– гибридизацию проводили в течение 12-16 ч при 68 °С в буфере 5X SSC (0,15 М NaCl, 0,015 М Na₃C₆H₅O₇ (цитрат натрия), pH 7,0), в который перед использованием добавляли 0,1% N-лаурол-саркозин, 0,02 % SDS (додецилсульфат натрия) и 1 % блокирующего реагента. Затем фильтры дважды по 10 мин. отмывали в 2X SSC при комнатной температуре и после дважды по 15 мин. в

0,1X SSC, с добавлением 0,1 % SDS при 68 °C;

– детекцию гибридизационных сигналов проводили в проявляющем буфере (0,1 М Трис гидрохлорид, 0,1 М NaCl, 50 мМ MgCl₂, величина pH 9,2), содержащим красители нитросиний тетразолий и 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат в темноте, в течение 10-16 ч до появления гибридизационных пятен. После чего реакцию останавливали промыванием мембраны буфером (10 мМ Трис гидрохлорид, 1 мМ ЭДТА, величина pH 8,0).

2.3.3.2. Определение видовой принадлежности природных изолятов дрожжей *Kluyveromyces* и *Saccharomyces*:

– выделение дрожжевой ДНК проводили литий-ацетатным методом [188]. Дрожжи рассеивали штрихом на агаризованной среде YPD (10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 20 г/л глюкозы, 15 г/л агар-агар) и культивировали в течение 24 ч при (26±1) °C. Дрожжевую биомассу, в объеме спичечной головки, стерильной зубочисткой переносили в 1,5 мл эппендорф со 100 мкл литий-ацетатного раствора (200 мМ LiOAc, Sigma-Aldrich, 1% SDS) и ресуспендировали. Затем проводили термостатирование в твердотельном термостате при температуре 70 °C на протяжении 15 мин. После инкубации добавляли 300 мкл этилового спирта с объемной долей 96 %, перемешивали на вортексе и центрифугировали при 14000 об/мин в течении 3 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали и осадок промывали этиловым спиртом с объемной долей 70 %. Осадок подсушивали на воздухе в течении 15-20 мин. и затем ДНК с клеточным дебрисом растворяли в 100 мкл TE буфера (10 мМ TrisHCl, 1мМ ЭДТА). Перед применением клеточный дебрис осаждали коротким центрифугированием при 14000 об/мин. в течении 1 мин. Для проведения ПЦР использовали 1 мкл супернантанта;

– определение видовой принадлежности природных изолятов дрожжей рода *Saccharomyces* проводили методом ПЦР. Амплификацию видоспецифичных участков ДНК осуществляли с помощью мультипраймерной ПЦР с 6 парами праймеров (таблица 4) [201].

Таблица 4 – Прямой и обратный видоспецифичные праймеры для дрожжей рода *Saccharomyces*

Вид дрожжей	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')	Длина ампликона, п.н.
<i>S. arboricola</i>	GGCACGCCCTTACAGCAGCAA	TCGTCGTACAGATGCTGGTAGGGC	349
<i>S. bayanus</i>	GCTGACTGCTGCTGCTGCCCCCG	TGTTATGAGTACTTGGTTTGTCTG	275
<i>S. cerevisiae</i>	GCGCTTTACATTACAGATCCCGAG-3	TAAGTTGGTTGTCAGCAAGATTG	150
<i>S. kudriavzevii</i>	ATCTATAACAAACCGCCAAGGGAG	CGTAACCTACCTATATGAGGGCCT	660
<i>S. mikatae</i>	ACAAGCAATTGATTTGAGGAAAAG	CCAGTCTTCTTTGTCAACGTTG	508
<i>S. paradoxus</i>	CTTTCTACCCCTTCTCCATGTTGG	CAATTTTCAGGGCGTTGTCCAACAG	739

ПЦР проводили в 25 мкл буфера, содержащего 2,5 мМ $MgCl_2$, 1 мМ dNTP смеси, 100 пМ каждого праймера, 0,5 единицы Taq-полимеразы («Синтол», Россия) и 1 мкл ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов в следующем режиме: денатурация при 94 °С – 60 сек, отжиг праймеров при 55 °С – 60 с, синтез ДНК при 72 °С – 60 с; конечная достройка при 72 °С – 2 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в агарозном геле с массовой концентрацией агарозы 1 г/100 мл при 60–65 В в 1,0×ТАЕ буфере (45 мМ Трис, 1мМ ЭДТА, 45 мМ ледяная уксусная кислота, величине рН 7,6) в течение 2–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе УВТ-1 (Биоком). В качестве маркера молекулярных весов использовали 100b DNA Ladder (Fermentas, Литва). По длине полученных ампликонов определяли видовую принадлежность изолятов дрожжей в соответствии с таблицей 4;

– определение видовой принадлежности изолятов дрожжей рода *Kluyveromyces* методом ПЦР-ПДРФ [143, 215]. Амплификацию участка ДНК ITS1-ITS4 осуществляли с помощью праймеров ITS 1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3') и ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'),

ПЦР проводили в 25 мкл буфера, содержащего 2,5 мМ $MgCl_2$, 10 мкМ dNTP смеси, 100 пМ каждого праймера, 0,5 единицы Taq-полимеразы («Синтол», Россия) и 1 мкл ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов в следующем режиме: денатурация при 94 °С – 60 с, отжиг праймеров при 55,5 °С – 2 мин., синтез ДНК

при 72 °C – 2 мин.; конечная достройка при 72 °C – 10 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в агарозном геле с массовой концентрацией агарозы 1 г / 100 мл при 60–65 В в 1,0×ТАЕ буфере (45 мМ Трис, 1мМ ЭДТА, 45 мМ ледяная уксусная кислота, величина рН 7,6) в течение 2–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе УВТ-1 (Биоком). В качестве маркера молекулярных весов использовали 100b DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Рестриктию полученных фрагментов участка ДНК ITS1-ITS4 осуществляли с помощью рестриктаз *AspLE I*, *Hae III* и *Hinf I* по инструкции фирмы производителя. Продукты рестрикции подвергали электрофорезу в агарозном геле с массовой концентрацией агарозы 1 г / 100 мл при 60–65 В в 1,0×ТАЕ буфере (45 мМ Трис, 1мМ ЭДТА, 45 мМ ледяная уксусная кислота, величина рН 7,6) в течение 2–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе УВТ-1 (Биоком). В качестве маркера молекулярных весов использовали 100b DNA Ladder (Fermentas, Литва). По набору рестрикционных фрагментов относили штамм к соответствующему виду. Для дрожжей вида *K. marxianus* набор рестрикционных фрагментов представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Размер продуктов рестрикции для дрожжей вида *K. marxianus*

Рестриктаза	Размер ITS1-ITS4 фрагмента ДНК, п.н.	Продукты рестрикции, п.н.
<i>AspLEI</i>	740	285; 185; 140; 100
<i>HaeIII</i>		655; 80
<i>HinfI</i>		240; 185; 120; 80; 65; 50

2.4. Математическая обработка и интерпретация полученных результатов

Данные экспериментов обрабатывали согласно общепринятым методам математической статистики с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics (v 17.0), Microsoft Excel. Все опыты проводили в трех повторностях.

Полученный массив экспериментальных данных подвергали математическому анализу с целью решения следующих задач: оптимальное время обработки ферментным препаратом, длительность культивирования, температура культивирования, оптимальная среда культивирования для максимального выхода ферментного препарата и др.

Для математической обработки использовали данные после исключения грубых ошибок по существующим критериям результатов параллельных определений.

Вычисление парных корреляций между показателями и определение критерия Тьюки осуществляли с использованием пакетов статистических программ. Разброс точек и погрешностей опытов определяли в следующей последовательности: находили среднеарифметическое значение, среднеквадратичное отклонение и дисперсию воспроизводимости единичного результата. Определение достоверности коэффициентов корреляции осуществляли для уровня значимости 0,05. Адекватность полученных регрессионных уравнений выявленным закономерностям оценивали по критерию Фишера.

2.5. Приборное обеспечение экспериментов

В процессе выполнения экспериментальной части работы использовались следующие приборы:

- фотозлектроколориметр КФК-3-01;
- иономер И-160М;

- микроскоп Микмед 5 с системой визуализации;
- газовый хроматограф «Agilent» HP 6890;
- трансиллюминатор Vilber Lourmat;
- трансиллюминатор УВТ-1, Биоком;
- термостат суховоздушный с охлаждением ТСО 1/80 СПУ;
- термостат суховоздушный ТС 1/80 СПУ;
- вакуум блоттер «Bio-Rad»;
- CHEF-DR III («Bio-Rad», США);
- амплификатор Eppendorf AG 22331;
- водяная баня TW-2, 4 л;
- вискозиметр ВПЖ-2.

РАЗДЕЛ 3

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Скрининг штаммов дрожжей родов *Kluyveromyces* и *Saccharomyces* по способности к синтезу эндополигалактуроназы

3.1.1. Изучение способности дрожжей синтезировать внеклеточную эндополигалактуроназу. Дрожжи играют основополагающую роль в процессах преобразования виноградного сусла в вино. От их определенных свойств, например, ферментативной активности, во многом зависит скорость осветления виноматериалов после брожения, качество и безопасность конечного продукта. Согласно литературным данным, у дрожжей способность к синтезу эндополигалактуроназы встречается в основном у представителей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* и, как правило, является штаммоспецифичной [123, 172, 176, 235, 238].

На данном этапе исследования нами была проанализирована база данных штаммов дрожжей КМВ "Магарач" по характеристике их перспективности для поиска культур с целью определения эндополигалактуроназы [52, 75, 97]. В результате были отобраны 66 штаммов дрожжей, из них 30 штаммов рода *Saccharomyces* и 36 штаммов рода *Kluyveromyces*. Их характеристика представлена в приложении Б. таблица Б.1.

Способность отобранных штаммов синтезировать эндополигалактуроназу предварительно оценивали по результатам качественного экспресс-теста (п. 2.2.1.) (рисунок 6). Установлено, что для 32 штаммов дрожжей (21 штамм рода *Kluyveromyces* и 11 штаммов рода *Saccharomyces*) из исследованной выборки результаты теста были отрицательными, что свидетельствовало об отсутствии или крайне низкой активности фермента. Для оставшихся 34 штаммов (15 штаммов рода *Kluyveromyces* и 19 штаммов рода *Saccharomyces*), вокруг которых образовались зоны просветления (рисунок 7), было также проведено количественное измерение активности эндополигалактуроназы после

культивирования на общепринятой для дрожжей синтетической среде YPD (п.2.3.) (приложение Б, таблица Б.2).

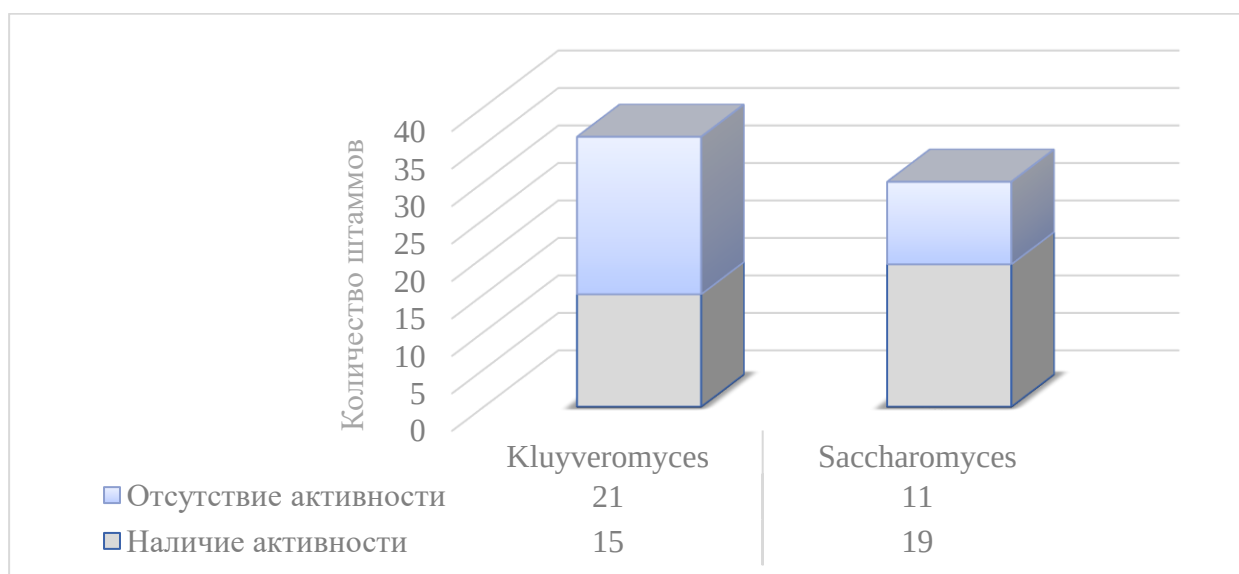
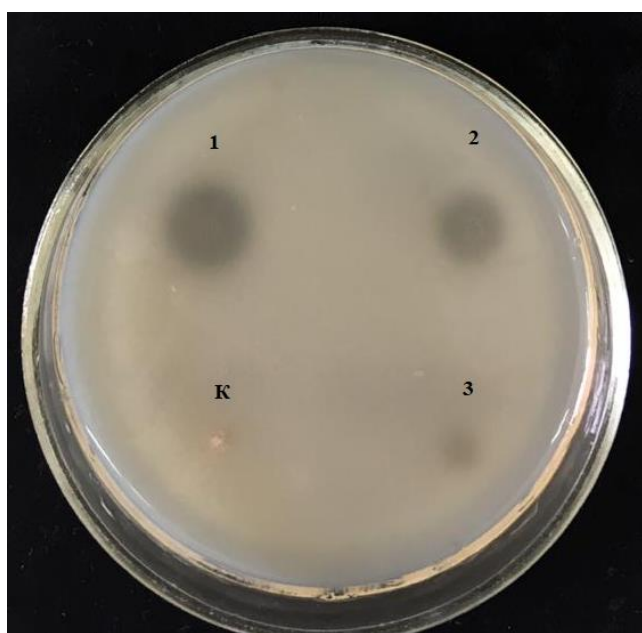
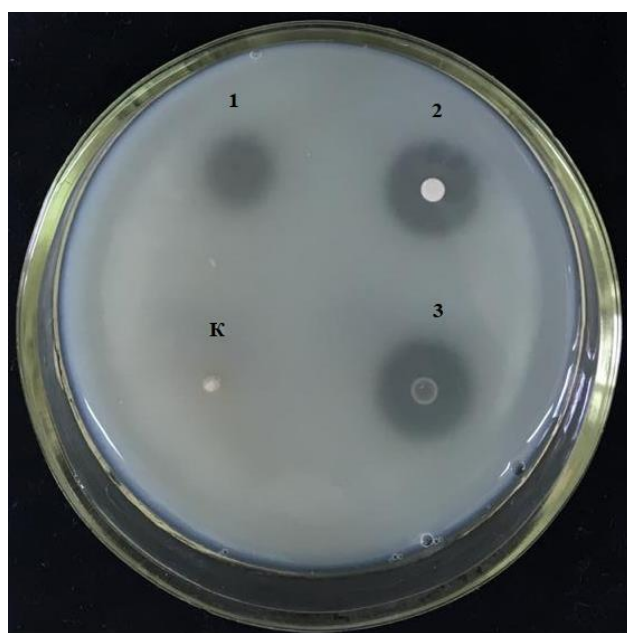


Рисунок 6 – Способность штаммов к синтезу эндополигалактуразы



А



Б

Рисунок 7 – Результаты экспресс-теста на наличие эндополигалактуроназной активности у некоторых штаммов дрожжей (А) 1 – III-72, 2 – 73, 3 – III-74 , (Б) 1 - III-204, 2 – III-203, 3 – III-198, К – контроль без активности фермента (I-527).

Проведенное исследование подтвердило имеющиеся литературные данные о способности штаммов дрожжей родов *Kluyveromyces* и *Saccharomyces* к синтезу эндополигалактуроназы и штаммоспецифичности данного свойства. Отмечено, что дрожжи рода *Kluyveromyces* обладали более высокой активностью фермента (278,3-1673,3 ед) по сравнению с *Saccharomyces* (0,6-128,0 ед), что согласуется с литературными данными [176, 190, 232].

Ферментативная активность исследованных штаммов дрожжей рода *Kluyveromyces* была в диапазоне 278,3-1673,3 ед. Из пятнадцати штаммов десять обладали активностью фермента более 1000 ед, что указывает на перспективность использования представителей данного рода в качестве продуцентов эндополигалактуроназы. Из штаммов с активностью более 1000 ед. для дальнейших исследований нами были отобраны 8 штаммов (III-74, III-76, III-358, III-359, III-360, III-361, III-362, III-363) со сравнительно более высокой активностью фермента в диапазоне 1280,0-1673,3 ед.

Для дрожжей рода *Saccharomyces* в зависимости от штамма была отмечена активность эндополигалактуроназы от 0,6 до 128,0 ед. Из 19 штаммов 17 характеризовались низкой активностью фермента в диапазоне от 0,6 до 6,4 ед и только два штамма (III-203 и III-204) имели высокие для представителей данного рода значения – 64,0 и 128,0 ед. соответственно. Эти данные указывают на нецелесообразность использования нами 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 [122].

Таким образом, проведенное исследование подтвердило литературные данные о том, что дрожжи рода *Kluyveromyces* являются наиболее активными продуцентами эндополигалактуроназы, по сравнению с представителями рода *Saccharomyces* [176, 190, 232], и позволило для дальнейших исследований отобрать 8 штаммов рода *Kluyveromyces* (III-74, III-76, III-358, III-359, III-360, III-361, III-362, III-363) с высокой активностью фермента в диапазоне от 1280,0 до 1673,3 ед.

3.1.2. 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 [52]. В то же время, дрожжи рода *Kluveromyces* могут присутствовать на винограде, что определяется их способностью развиваться в широком диапазоне значений pH среды культивирования – от 3,0 до 8,0. При этом максимум активности фермент проявляет при значениях pH, близких к 5,0 [56, 129].

Виноградное сусло является высококислотной средой, значения pH 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 pH 3,4.

Результаты эксперимента представлены на рисунке 8.

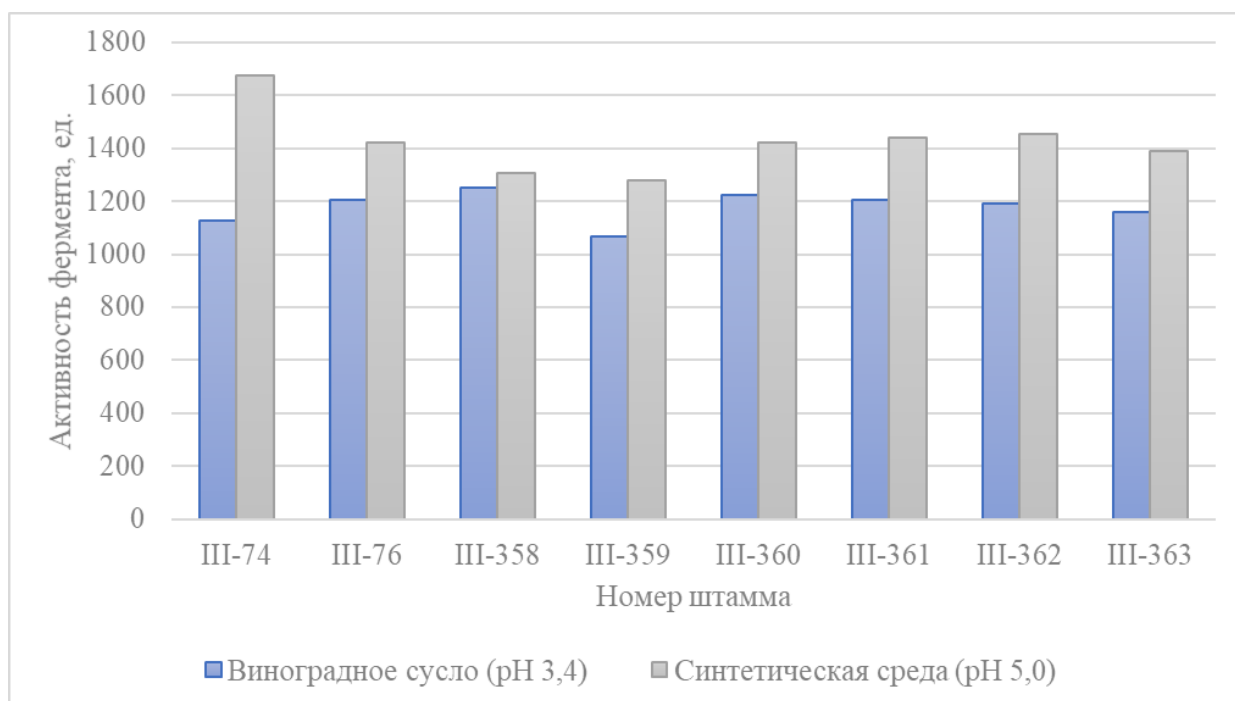


Рисунок 8 –Эндополигалактуроназная активность штаммов рода *Kluveromyces* в зависимости от условий культивирования

Исследование показало, что при культивировании на виноградном сусле (величина pH 3,4) наблюдалось снижение активности по сравнению со средой YPD (величина pH 5,0) на 4,0-28,5 %. Показано, что снижение значения pH среды культивирования может по-разному влиять на накопление фермента в зависимости от штамма [56, 75, 232, 233].

Обобщая результаты проведенного скрининга, можно сделать 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 pH 3,4. Это позволило выбрать его для дальнейшей селекционной работы.

3.1.3. 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. Для этого на начальном этапе по результатам анализа по способности к синтезу эндополигалактуроназы двухсот отвитых колоний было отобрано 10 изолятов с активностью фермента от 1495,6 до 1521,5 ед, что превышало активность исходного штамма на 19-21 %. Для этих изолятов было проведено генетическое исследование для подтверждения их принадлежности к виду *K. marxianus* с применением ПДРФ-ПЦР анализа (п. 2.3.3.2). Согласно рестрикционному анализу все исследованные изоляты отнесены к биологическому виду *K. marxianus*, поскольку размеры всех полученных продуктов рестрикции соответствуют показателям для данного вида дрожжей (рисунок 9).

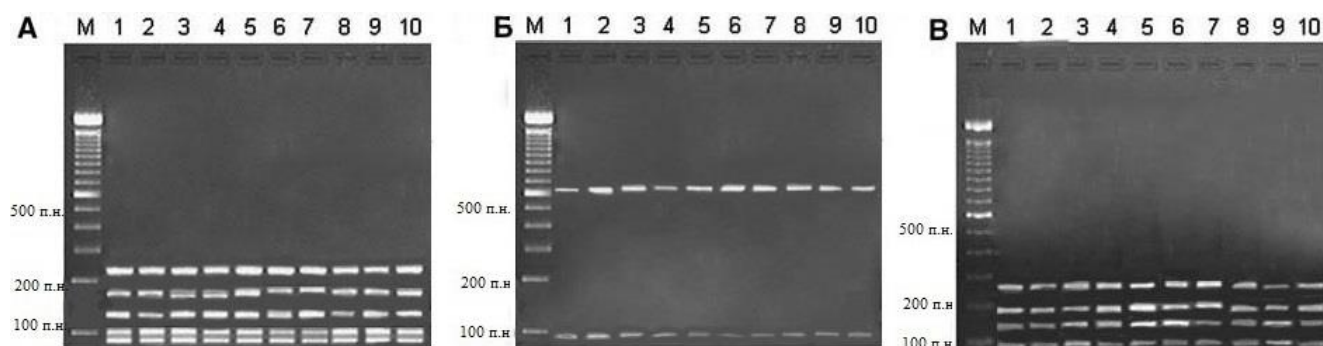


Рисунок 9 – Электрофорез в агарозном геле продуктов рестрикции фрагмента ITS1-ITS4 рестриктазами *AspLEI* (А), *HaeIII* (Б) и *HinfI* (В). М – маркер молекулярного веса 1000 п.н.; изоляты 1 – III-358-15, 2 – III-358-17, 3 – III-358-24, 4 – III-358-35, 5 – III-358-51, 6 – III-358-60, 7 – III-358-75, 8 – III-358-77, 9 – III-358-78, 10 – III-358-90

Учитывая, что оптимальная активная кислотность среды для работы фермента находится в диапазоне 4,8-5,0 [85, 97, 238], а виноградное сусло имеет более низкие значения рН 3,0-3,5, следовало проверить сохранение активности фермента в более кислой среде. Анализ полученных данных активности фермента на субстратах со значениями рН 3,0 и 3,5 по сравнению с 5,0 показал, что для всех 10 штаммов наблюдали снижение активности эндополигалактуроназы при снижении значения рН субстрата. Так, при величине рН 3,5 снижение активности по сравнению с оптимальными условиями (значение рН 5,0) составило 58,6-62,0 %, а при значении рН 3,0 – от 72,4 до 75,8 % в зависимости от штамма (таблица 6).

Полученные данные эндополигалактуроназной активности десяти штаммов, имеют близкие значения. Для выбора наиболее перспективного штамма-продуцента нами была проведена математическая обработка данных с применением однофакторного дисперсионного анализа и критерия Тьюки (приложение В), что позволило отобрать штамм № III-358-60. У данного штамма снижение активности фермента меньше зависела от снижения значения рН по сравнению с другими исследованными штаммами и составляла 413,8 ед и 628,3 ед при значениях рН 3,0 3,5 соответственно.

Таблица 6 – Активность эндополигалактуроназы в зависимости от величины pH субстрата

Штамм	Ферментативная активность (ед) и ее снижение (%) при pH субстрата				
	pH 3,0	Δ_1 , %	pH 3,5	Δ_2 , %	pH 5,0 (контроль)
III-358-15	368,4	75,8	586,7	61,4	1520,9
III-358-17	380,5	74,8	595,4	60,6	1510,5
III-358-24	371,9	75,2	581,0	61,2	1498,8
III-358-35	414,9	72,4	597,7	60,2	1502,3
III-358-51	402,1	73,3	623,2	58,6	1505,6
III-358-60	413,3	72,9	629,8	58,7	1523,8
III-358-75	377,6	74,8	573,3	61,8	1500,4
III-358-77	401,5	73,3	593,1	60,6	1506,4
III-358-78	408,6	72,9	572,5	62,0	1508,5
III-358-90	410,8	72,7	611,2	59,4	1504,9

Примечание Δ_1 – снижение активности фермента при значении pH 3,0; Δ_2 – снижение активности фермента при значении pH 3,4.

Фенотипические и биохимические свойства нового селекционного штамма – продуцента эндополигалактуроназы представлены в таблице 7. По результатам проведенных исследований штамм № III-358-60 депонирован в КМВ «Магарач» под номером III-407 (приложение Г).

Таблица 7 – Паспортные данные селекционного штамма № III-407

Парамент	Описание
1	2
Наименование культуры	III-407
Вид	<i>Kluyveromyces marxianus</i> [180, 182]
Происхождение	селекционный
Способ получения	улучшающая селекция на виноградном сусле штамма III-358 (КМВ «Магарач»)
Место получения	лаборатория микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»
Морфологические свойства: форма и размер клеток	клетки эллипсоидальные, размеры 2-6 мкм в ширину и 5-11 мкм в длину, встречаются скопления по 2-3 клетки, при спорообразовании образует аски с 1-4 спорами, форма спор: сферическая и эллипсоидальная
Технологические свойства	синтезирует внеклеточную эндополигалактуроназу
Область применения	получение внеклеточной эндополигалактуроназы для применения на стадии обработки виноградного сусла из сортов винограда с высоким содержанием пектина, снижения вязкости и обеспечения лучшего выхода сусла

Продолжение таблицы 7

1	2
Условия поддержания	хранение при температуре (8±2) °С на виноградном сусле; периодичность пересевов – 1 раз в 9 мес.; хранение при минус 86 °С на среде YPD с 30 % глицерина
Авторы	Шаламитский М.Ю., Танащук Т.Н., Иванова Е.В. – лаборатория микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН», г. Ялта;

3.2. Оптимизация режимов синтеза внеклеточного фермента эндополигалактуроназы штаммом дрожжей *K. marxianus* № III-407

Для достижения максимального синтеза фермента штаммом-продуцентом необходимо создание оптимальных условий для его роста, основными из которых являются состав среды и режимы культивирования [164, 176].

3.2.1. Исследование влияния массовой концентрации сахаров виноградного сусла на синтез фермента эндополигалактуроназы. Анализ литературных источников свидетельствует о противоречивости результатов исследований в данном направлении. Так, согласно исследованиям Лебедева В.В. [56] оптимальным содержанием глюкозы в среде являлось 50 г/л; фруктозы и сахарозы – 20 г/л; при увеличении содержания сахаров в среде до 100 г/л наблюдали снижение их продуцирующей способности. По другим источникам [232, 233] для максимального синтеза фермента рекомендуемое количество сахаров составляло 100 г/л глюкозы. По литературным данным [56, 211, 236, 273], синтез фермента у дрожжей рода *K. marxianus* и некоторых других продуцентов имеет конститутивный характер и происходит во время размножения.

На рисунке 10 представлены данные исследования влияния массовой концентрации сахаров виноградного сусла на количество синтезируемого фермента селекционным штаммом № III-407. Как видно из графика, при массовой концентрации сахаров в среде культивирования 50 и 100 г/л продолжительность

экспоненциальной фазы роста дрожжей составляла 5 сут. При повышении массовой концентрации сахаров в среде культивирования до 150 и 200 г/л дрожжи развивались медленнее, что повлияло на накопление более низкой ферментативной активности на 5 сут. роста (1516,6 и 1403,4 ед. соответственно).

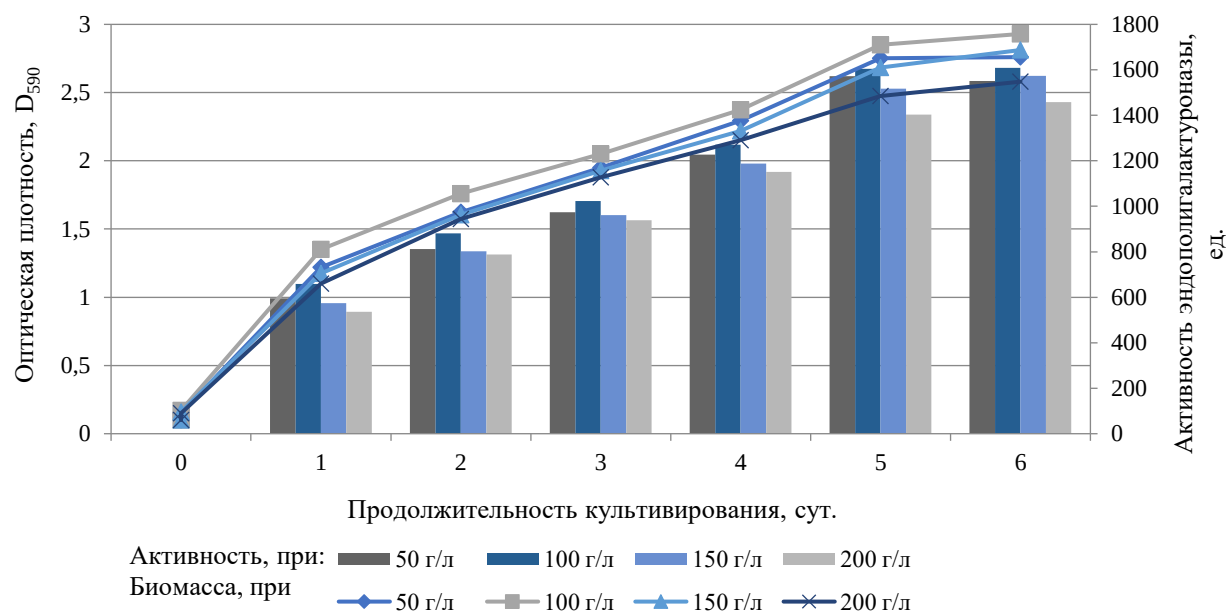


Рисунок 10 – Влияние массовой концентрации сахаров виноградного сусла на накопление биомассы и активность эндополигалактуроназы дрожжами *K. marxianus* № III-407

При массовой концентрации сахаров 100 г/л отмечено накопление максимального количества эндополигалактуроназы в среде. Активность фермента у штамма № III-407 при данных условиях составляла 1605,5 ед. При понижении количества углеводов в питательной среде до 50 г/л активность фермента на 5 сут. снижалась незначительно – на 2 %, что может быть связано с истощением питательных веществ и замедлением роста культуры [236]. Массовая концентрация сахаров в среде в количестве 150 и 200 г/л способствовала замедлению роста дрожжей на 5 и 9 % соответственно. Снижение эндополигалактуроназной активности в данных условиях вероятнее всего обусловлено низкой осмоотолерантностью данного штамма [268].

3.2.2. Исследование влияния величины pH виноградного сусла на синтез фермента эндополигалактуроназы. Литературные данные об оптимуме значения pH для синтеза эндополигалактуроназы дрожжами *K. marxianus* различаются [111, 265, 274]. Так, в работах Нгуен Л.А. [79] оптимальное значение pH для продуцирования фермента находится в диапазоне 3,3-3,5, в работах Лебедева В.В. оптимум равняется 4,0 [56]. В то же время, по мнению зарубежных исследователей, предпочтительным значением pH является 4,5 [169, 232, 233]. Основываясь на этом, был проведен анализ влияния величины pH на рост штамма и количество продуцируемого им фермента. Данные представлены на рисунке 11.

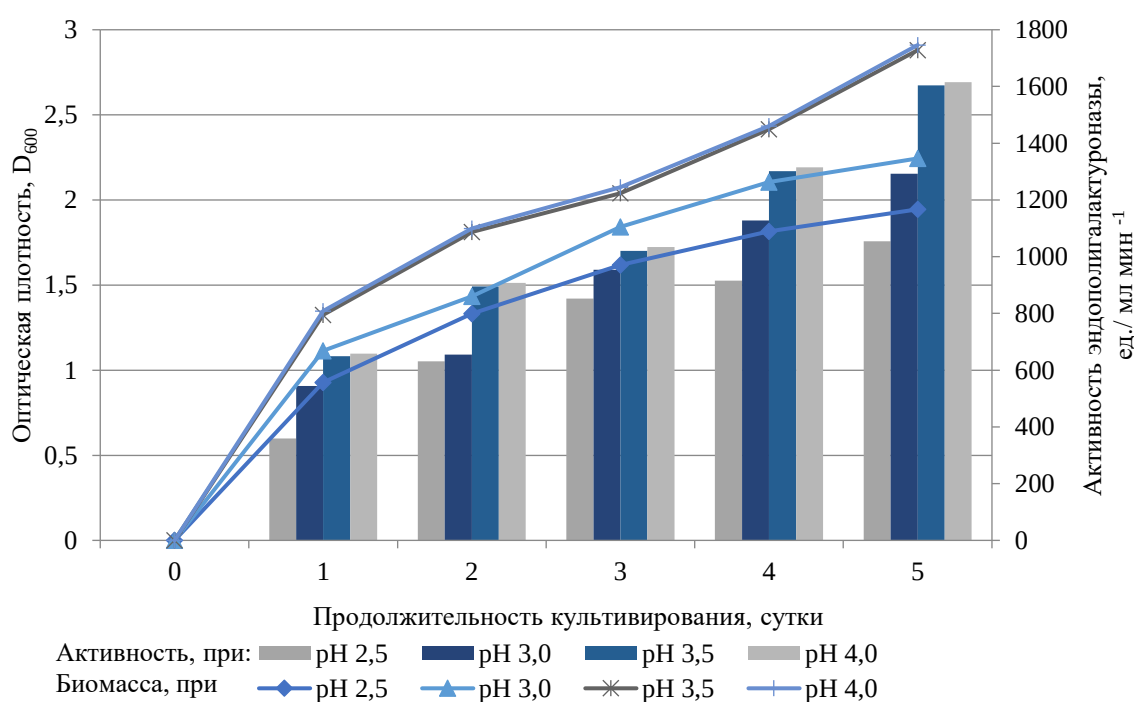


Рисунок 11 – Влияние значения pH среды культивирования на накопление биомассы и активность эндополигалактуроназы дрожжами *K. marxianus* № III-407

Анализ полученных данных показал, что при значении pH среды культивирования 3,5 и 4,0 на 5 сут. роста отмечалось наибольшее накопление биомассы культурой (D₅₉₀ 2,880 и 2,910) и активность эндополигалактуроназы 1604,3 и 1611,4 ед. соответственно. Культивирование дрожжей при активной

кислотности среды 3,0 и 2,5 оказало значительное отрицательное влияние на накопление биомассы культурой и ее снижение, по сравнению с максимальным показателем, составило 30,7 и 33,2 % соответственно, что привело к уменьшению эндополигалактуроназной активности на 19,8 и 34,6 %.

Таким образом, значение активной кислотности 3,5 является оптимальным для накопления фермента при культивировании штамма № III-407.

3.2.3. Изучение влияния температуры культивирования на синтез фермента эндополигалактуроназы. Согласно литературным данным оптимальной температурой для культивирования дрожжей *K. marxianus* является 28-30 °С. В то же время имеются данные о термотолерантных штаммах, способных к развитию при температуре 45 °С [156, 164, 182]. Логичным продолжением работы было изучение активности роста исследуемого штамма в условиях разных температур (рисунок 12).

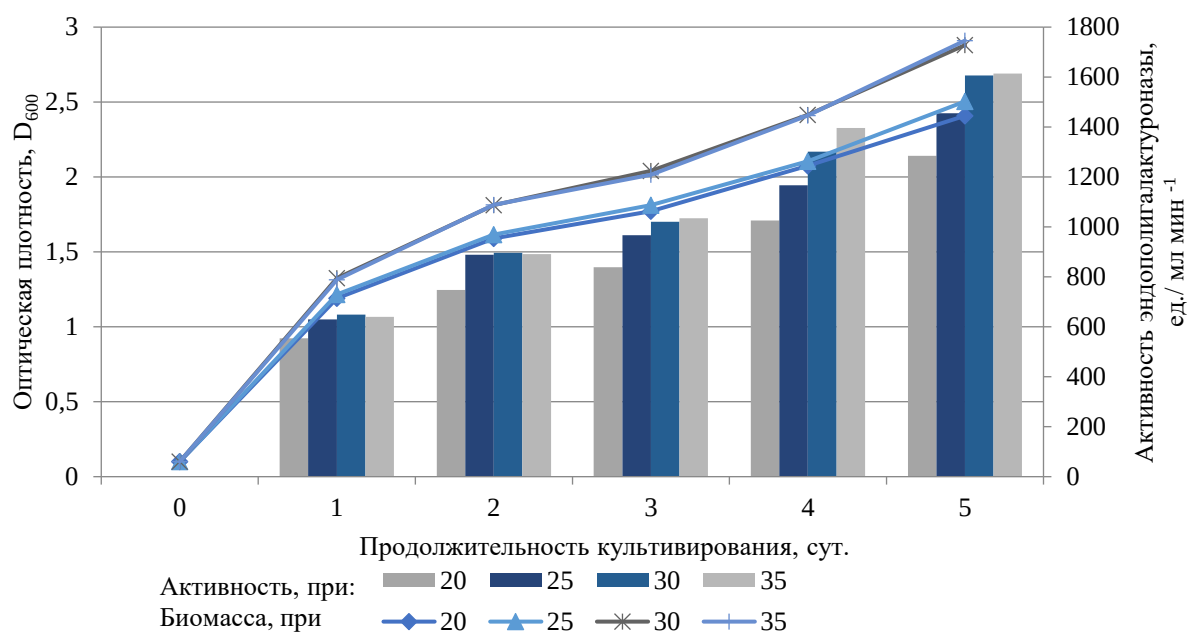


Рисунок 12 – Влияние температуры культивирования на накопление биомассы и активность эндополигалактуроназы дрожжами *K. marxianus* № III-407

Как видно из рисунка, наибольшее накопление биомассы и, соответственно, ферментативной активности наблюдали при температурах 30 и 35 °С. При данных температурах оптическая плотность составляла 2,880 и 2,910 соответственно, а активность эндополигалактуроназы – 1606,8 и 1613,7 ед. соответственно. Культивирование дрожжей при 20 и 25 °С приводило к снижению накопления биомассы на 20,7 и 10,5 % и, как следствие, к снижению количества синтезируемой эндополигалактуроназы на 20,4 и 9,8 %.

На основании математического анализа полученных результатов рассчитано уравнение регрессии, описывающее зависимость накопления эндополигалактуроназы от условий культивирования. Уравнение имеет вид:

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

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.

Таким образом, 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 pH 3,5 и температура 30 °С. При данных условиях активность фермента в надосадочной жидкости достигала значения 1606,8 ед. на 5 сут. культивирования. Также следует отметить, что наибольшее влияние на синтез фермента может оказывать изменение активной кислотности среды, по сравнению с температурой и массовой концентрацией сахаров.

На следующем этапе работы была поставлена задача обоснования режимов осветления виноградного сусла при его обработке ФПДЭ, полученного при культивировании штамма № III-407 в соответствии с методикой (п.2.2.3).

3.3. Исследование влияния ФПДЭ на осветление виноградного сусла

Изучали влияние ФПДЭ на изменение вязкости и количества взвесей в виноградном сусле, по которым судили о степени разрушения пектина. Подбор оптимальных режимов обработки виноградного сусла ферментным препаратом эндополигалактуроназы для разрушения пектиновых веществ сусла позволяет обеспечить получение хорошо осветленного сусла для проведения дальнейшего процесса брожения. В основном на производстве процесс осветления отстаиванием проходит при температурах 10-20 °С. В то же время оптимальная температура для работы фермента эндополигалактуроназы составляет 30 °С. На основании этого обоснование оптимальной дозы ФПДЭ проводили в условиях, приближенных к производственным.

Результаты исследования влияния различных доз ферментного препарата на снижение вязкости и взвесей сусла, полученного из винограда сорта Цитронный Магараха представлены на рисунках 13 и 14. Из полученных данных следует, что наибольшее снижение вязкости сусла через 2 ч на 5,8 % обеспечила доза ФПДЭ в количестве 4 мл/л. Для варианта опыта с внесением 2 мл/л ФПДЭ аналогичный результат был достигнут через 3 ч. В то же время снижение вязкости сусла с добавлением ФПДЭ в количестве менее 2 мл/л на момент окончания эксперимента не превышало 3 %. Аналогичная тенденция отмечается в отношении изменения содержания взвесей в зависимости от дозы внесенного ФПДЭ. Так, в результате осветления сусла методом отстаивания при дозах ФПДЭ 2 и 4 мл/л отмечается снижение количества взвесей на 48 %, по сравнению с контролем. Более низкие количества ФПДЭ обеспечили уменьшение содержания взвесей лишь на 13-24 %.

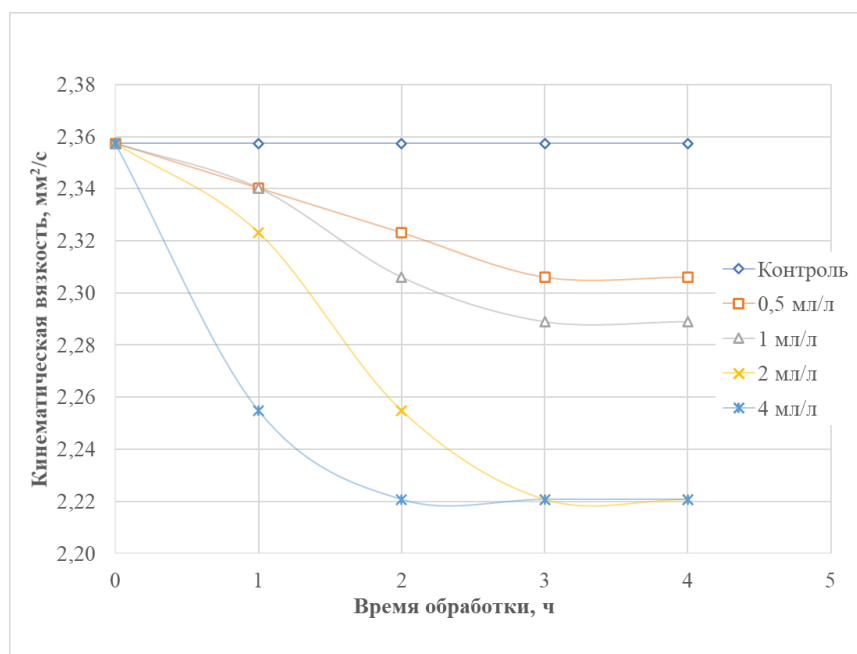


Рисунок 13 – Изменение вязкости сусла в зависимости от дозы ФПДЭ и времени обработки при температуре 20 °С

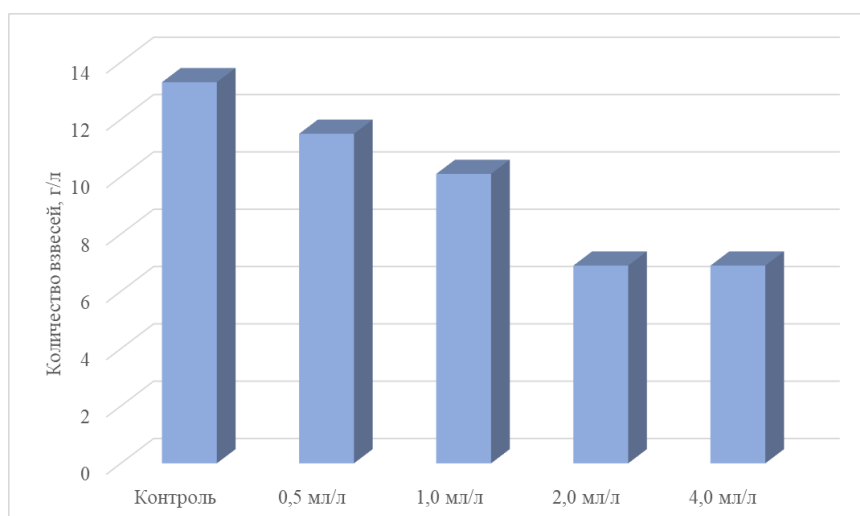


Рисунок 14 – Содержание взвесей в сусле в зависимости от дозы ФПДЭ при температуре обработки 20 °С

Результаты обработки ФПДЭ сусла из винограда Цитронный Магарача, предварительно охлажденного до 10 °С, представлены на рисунках 15, 16. Из приведенных данных следует, что эффективность препарата снижается во всех вариантах опыта не зависимо от применяемой дозы. Так, при внесении ФПДЭ в сусло в количестве 4 мл/л вязкость снизилась на 4,3 %, а количество взвесей на

39 %, что ниже, чем при обработке сусли при температуре 20 °С на 25,8 и 18,8 % соответственно. Для дозировок 2,0, 1,0 и 0,5 мл/л эффективность препарата в отношении вязкости сусли снизилась на 37,5, 15,0 и 6,7 %, а по содержанию взвесей – на 39,1, 43,6 и 44,4 % соответственно.

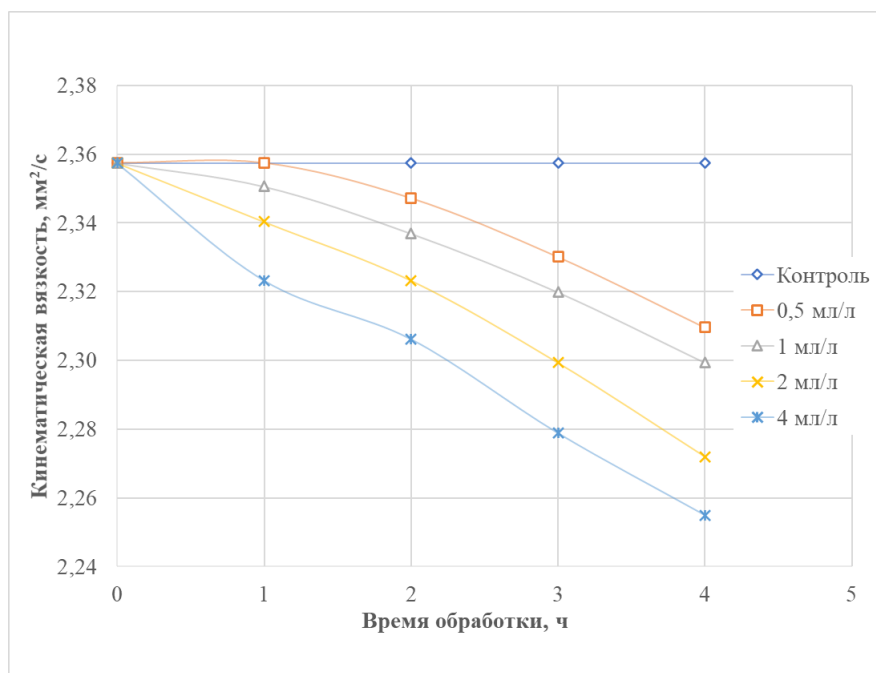


Рисунок 15 – Изменение вязкости сусли в зависимости от дозы ФПДЭ и времени обработки при температуре 10 °С

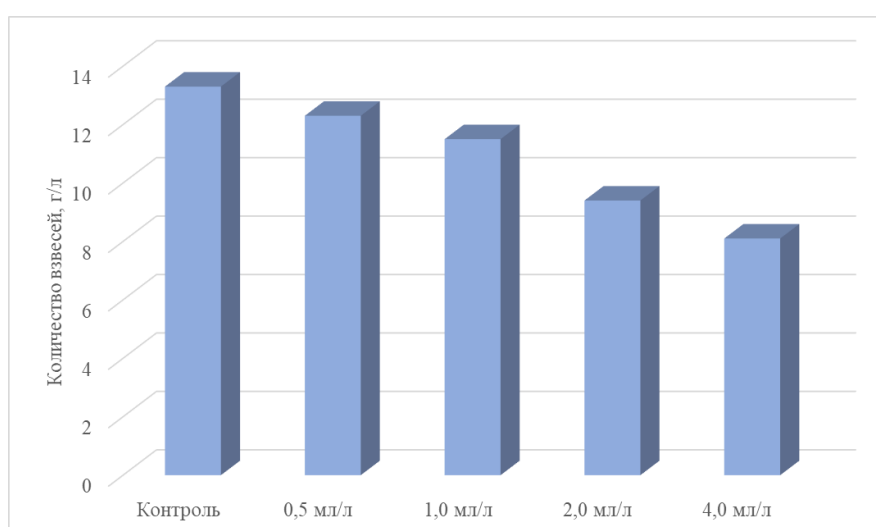


Рисунок 16 –Содержание взвесей в сусли в зависимости от дозы ФПДЭ при температуре обработки 10 °С

На основании проведенных исследований при осветлении виноградного сусла с использованием ФПДЭ наилучшие результаты были достигнуты при обработке сусла в течение двух часов в количестве 4 мл/л и температуре не менее 20 °С.

В результате проведенных исследований в п.3.1., 3.2. и 3.3. был разработан стандарт организации: «Способ получения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ) при культивировании штамма *Kluveromyces marxianus* III 407» (приложение Д)

3.4. Выбор стартовой культуры для проведения процесса брожения сусла из сорта винограда Цитронный Магарача

3.4.1. Молекулярный и фенотипически отбор штаммов продуцентов эндополигалактуроназы для виноделия Поиск дрожжей сахаромикетов, обладающих эндополигалактуроназной активностью, является актуальным и перспективным направлением селекции дрожжей для виноделия с целью использования их в качестве стартовых культур или в составе дрожжевых ассоциаций при проведении процесса брожения сусел с высоким содержанием пектина [117, 198, 199]. Для определения стратегии отбора штаммов-продуцентов эндополигалактуроназы нами был проведен филогенетический анализ генов, отвечающих за ее синтез.

В настоящее время известно, что за синтез эндополигалактуроназы у дрожжей рода *Saccharomyces* отвечает ген *PGU*.

Для характеристики данного гена нами был проведен филогенетический анализ 112 штаммов дрожжей видов *S. arboricola*, *S. bayanus* (var. *uvarum*), *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* и гибридного таксона *S. pastorianus* (синоним *S. carlsbergensis*), представленных в генетических банках (GenBank, Sanger Institute) и научной литературе [162]. Характеристика штаммов представлена в приложении А, таблице А1.

В результате проведенного анализа было показано, что дрожжи разделились

на четко обособленные группы по структуре гена *PGU* согласно их видовой принадлежности (рисунок 17).

Так, в первую группу вошли 46 штаммов дрожжей вида *S. cerevisiae* (ген *PGU1*), выделенные из различных промышленных, медицинских, экологических и биогеографических популяций. У 12 из 46 (26 %) исследованных штаммов (VIN13, ARWI796, VL3, Kyokai 7, CBS7960, M3707, SK1, K11, Y9, Y12, YS2 и YJM1078) в гене *PGU1* обнаружены стоп-кодоны, что свидетельствует об отсутствии активности данных генов. Семь из них были выделены из источников, связанных со спиртовым брожением.

Вторая группа была сформирована 50 штаммами дрожжей вида *S. paradoxus* и его ближайшего родственника *S. cariocanus* (ген *PGU1p*). Известно, что географические популяции дрожжей *S. paradoxus* частично генетически изолированы и отличаются по нуклеотидным последовательностям всего генома [186, 205].

Третья и четвертая группы представлены единственными изученными нами штаммами вида *S. mikatae* и *S. arboricola* (ген *PGU1m* и *PGU1a* соответственно).

В пятую группу вошли 4 штамма дрожжей вида *S. kudriavzevii* (ген *PGU1k*), подгруппы аллелей *PGU* которого отражают различные биогеографические популяции. Так, штаммы IFO1802 и IFO1803 выделены в Японии, а штаммы ZP591, FM1056 и VIN7 имеют европейское происхождение.

Шестая группа сформирована из 7 штаммов вида *S. bayanus* и его гибридного таксона *S. pastorianus*.

По результатам филогенетического анализа можно говорить о наличии нескольких генов *PGU* у важных для виноделия дрожжей *S. bayanus* var. *uvorum*. У одного штамма из 4 обнаружено три дивергентных гена в нашей классификации: *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b*. При этом одиночный ген *PGU1b* выявлен у типовой культуры *S. bayanus* var. *uvorum* CBS 395, а также у штамма CLIB113.

Наличие мультигенного семейства в пределах одного вида может свидетельствовать о высокой значимости соответствующего фермента [275].

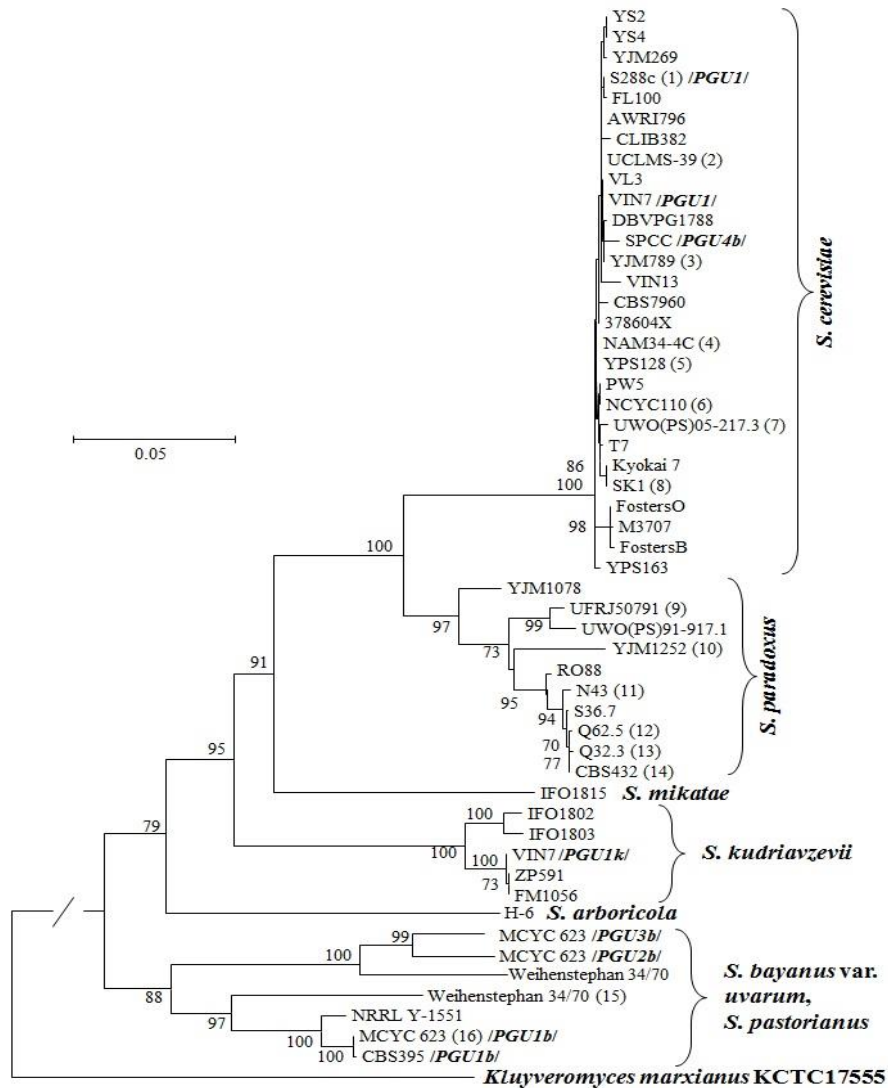


Рисунок 17 – Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использован ген, кодирующий эндополигалактуроназу у дрожжей *Kluveromyces marxianus*. Приводятся значения бустрепа > 70 %. Шкала соответствует 50 заменам на 1000 нуклеотидных остатков. Цифрами в круглых скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные нуклеотидные последовательности генов *PGU*: *S. cerevisiae* – (1) CLIB324, W303, 322134S, BC187, YS9, 273614N; (2) RM11-1a, DBVPG1853, YJM978, DBVPG1373, DBVPG1106, DBVPG6040, NCYC361, YJM981, YIIc17_E5, L-1528, YJM975, LalvinQA23, EDRL, EC1118; (3) DBVPG6765, L-1374, Y55, NY1308; (4) ZTW1; (5) YPS606, UWO(PS)87-2421, UWO(PS)83-787.3; (6) DBVPG6044; (7) UWO(PS)05-227.2, UWO(PS)03-461.4; (8) K11, Y9, Y12; *S. paradoxus* – (9) UFRJ50816, DBVPG6304, YPS138, A12, A4; (10) YJM248; (11) N45, N44, IFO1804; (12) Z1; (13) Q69.8; (14) N17, CBS5829, KBP3829, Q89.8, KBP828, DBVPG4650, T21.4, Q95.3, Y6.5, Q31.4, Z1.1, Y7, Q74.4, W7, Y8.1, Y8.5, Y9.6; *S. pastorianus* – (15) CCY48-91; *S. bayanus* var. *uvarum* – (16) CLIB113. У штаммов S288с, VIN7, SPCC, MCYC623 и CBS 395 в косых скобках указаны различные гены *PGU*.

Так мультигенные пектиназные семейства свойственны мицелиальным грибам, например, представителям родов *Aspergillus* и *Sclerotinia* [128, 154], для которых пектин является важным источником питания. Нами отмечено, что активный ген *PGU4b* шампанского штамма SPCC [162], который принадлежит к таксону *S. bayanus* var. *uvarum*, является копией гена *PGU1* дрожжей *S. cerevisiae*: идентичность составила более 99 %. Это ранее было доказано методами генетического и кариотипического анализа [206].

Таким образом, проведенный филогенетический анализ позволяет рекомендовать в качестве перспективных пектолитических штаммов для виноделия дрожжи вида *S. bayanus* var. *uvarum*. Данное наблюдение подтверждает ранее полученные нами результаты исследования эндополигалактуроназной активности у дрожжей рода *Saccharomyces*. Так, у единственного штамма № III-204, относящегося к виду *S. bayanus* var. *uvarum*, из КМВ «Магарач» наблюдали достаточно высокую для данного вида пектолитическую активность 128,0 ед. (приложение Б, таблица Б.2).

Для проверки данного вывода нами было проведено молекулярно-генетическое изучение генов *PGU* у 74 штаммов дрожжей вида *S. bayanus* var. *uvarum*, выделенных из различных ферментационных процессов и природных источников в разных регионах Европы и США (приложение Е).

Как показало исследование у 73 штаммов *S. bayanus* var. *uvarum* нами обнаружены три гибридизационных сигнала с зондом *PGU1b*, что свидетельствует о наличии у них трех пектиназных генов (рисунок 18).

Сильные гибридизационные сигналы с зондом *PGU1b* отмечены у 73 штаммов *S. bayanus* var. *uvarum* в четвертой снизу хромосоме, соответствующей по размеру VI дрожжей *S. cerevisiae* YNN 295. Нахождение данного гена в другой хромосоме, у *S. cerevisiae* он находится в хромосоме X, может быть объяснено наличием трех реципрокных транслокаций у *S. bayanus* var. *uvarum*, одна из которых затрагивает хромосомы X и VI (согласно нумерации хромосом дрожжей *S. cerevisiae*) [150, 151].

Проведенные исследования показали, что независимо от источника и места выделения штаммы *S. bayanus* var. *uvarum*, как правило, имеют генотип *PGU1b PGU2b PGU3b*. По-видимому, существует взаимосвязь между наличием

полимерных генов *PGU* и высокой пектиназной активностью штаммов, что указывает на большую вероятность выявления перспективных штаммов среди дрожжей, принадлежащих к виду *S. bayanus* var. *uvorum*. [77, 242, 247]. и подтверждают взаимосвязь между наличием полимерных генов *PGU* и высокой пектиназной активностью штаммов и указывает на большую вероятность выявления перспективных штаммов среди дрожжей, принадлежащих к виду *S. bayanus* var. *uvorum*.

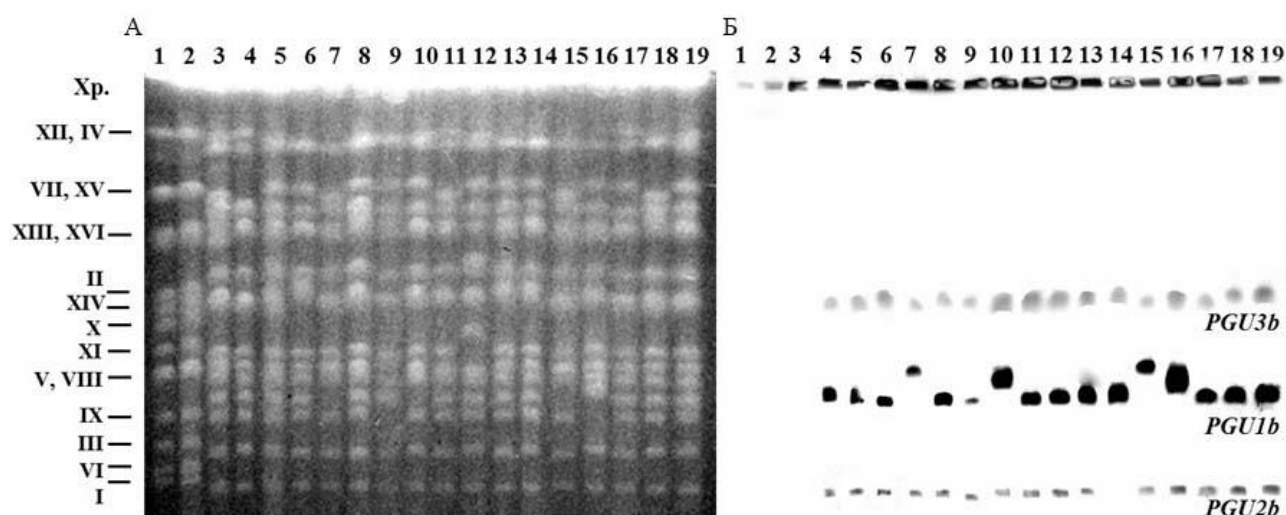


Рисунок 18 – Пульс-электрофорез (А) и Саузерн-гибридизация (Б) хромосомной ДНК дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvorum* с зондом *PGU1b*. Дорожки: 3 – SССР; 4 – 17el; 5 – DBVPG 1642; 6 – YIIc2.93; 7 – СЕСТ 12636; 8 – ВКМ Y-1146; 9 – T13/30; 10 – NCAIM Y.00677; 11 – M300; 12 – TBIИb13.92; 13 – DDI4.95; 14 – PJS1.94; 15 – PJS2.95; 16 – PJP1.95; 17 – SRC306; 18 – CCY21-31-12; 19 – MCYC 623. Контрольные штаммы *S. cerevisiae*: 1 – YNN 295; 2 – S288C.

Указаны размеры и порядок хромосом стандартного штамма

S. cerevisiae YNN 295

Таким образом, рекомендацией для выбора стартовой культуры при производстве виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача может служить использование штаммов дрожжей вида *S. bayanus* var. *uvorum* с эндополигалактуроназной активностью, а также способствующих сохранению или усилению ароматического профиля.

3.4.2. Выбор штамма дрожжей рода *Saccharomyces* для сбраживания виноградного сусла. В результате анализа базы данных КМВ "Магарач" для работы были отобраны 12 селекционных штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* из КМВ «Магарач», рекомендуемые для приготовления столовых виноматериалов и выделенные из мускатных сортов винограда.

Также в работу были взяты 96 природных изолятов дрожжей из рабочей коллекции КМВ "Магарач", выделенные из бродящего сусла мускатных сортов винограда. С целью отбора технологически перспективных штаммов для них было проведено исследование фенотипических и биохимических свойств.

По результатам оценки морфолого-культуральных свойств из 96 изолятов дрожжей нами было отобрано 56, для которых отмечена морфологическая однородность и способность к спорообразованию. Дрожжевые клетки характеризовались округлой, яйцевидной и овальной формами, средних и крупных размеров: округлые – $(5,65 \pm 0,44)$ мкм; яйцевидные – $(4,25 \pm 0,95) \times (5,85 \pm 0,72)$ мкм; овальные – $(7,95 \pm 0,96) \times (4,54 \pm 0,78)$ мкм; споры округлые гладкие споры, от 1 до 4 в аске.

Определение их видовой принадлежности генетическими методами с применением мультиплексной ПЦР (п.2.3.3.2) показало отсутствие в исследуемой выборке дрожжей вида *S. bayanus* var. *uvorum*, все штаммы были отнесены к виду *S. cerevisiae* (рисунок 19) [201]. Вероятно, это связано с тем, что дрожжи вида *S. bayanus* var. *uvorum* наиболее часто встречаются в регионах с прохладным климатом [78, 194, 207].

В результате была сформирована рабочая коллекция из 56 штаммов дрожжей *S. cerevisiae*. (приложение Ж), для которых была проведена технологическая оценка по способности к синтезу сероводорода, летучих кислот и бродильной активности.

Исследование штаммов на склонность к образованию H_2S показало, что 20 изолятов не проявили способность к синтезу сероводорода; 14 изолятов отмечены как слабые продуценты, а 22 – среднеактивные (таблица 8).

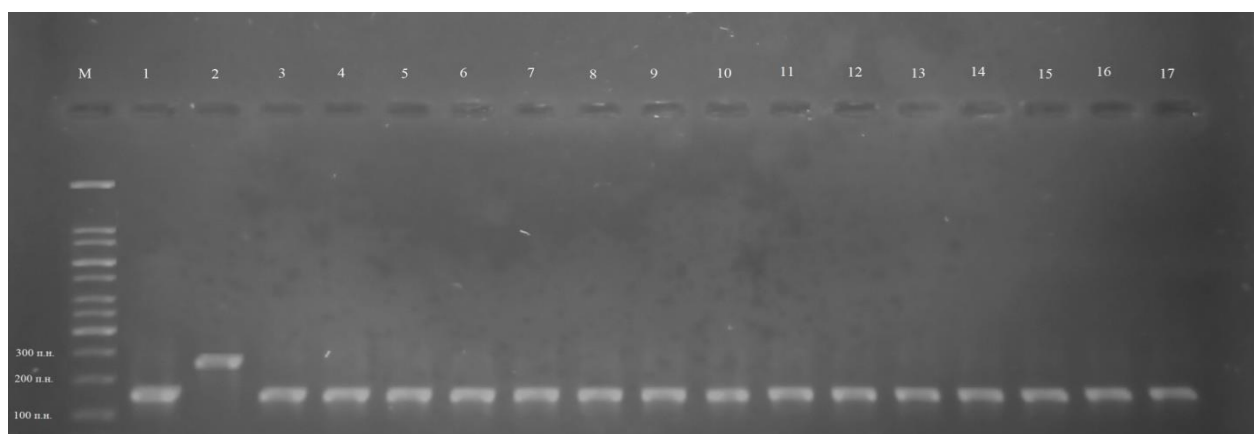


Рисунок 19 – ПЦР-продукты, полученные в результате использования 4 видоспецифичных праймеров с 15 изолятами дрожжей. М – 100 п.н. маркер, 1 - *S. cerevisiae* ВКМУ-502, 2 – *S. bayanus* М-300-8А, 3 – И-1, 4 – И-2, 5 – И-3, 6 - И-4, 7 – И-5, 8 – И-6, 9 – И-7, 10 – И-8, 11 – И-9, 12 – И-10, 13 – И-11, 14 - И-12, 15 – И-13, 16 – И-14, 17 – И-15.

Таблица 8 – Выделение сероводорода изолятами дрожжей

Номер изолята	Выделение H_2S , мм	Номер изолята	Выделение H_2S , мм	Номер изолята	Выделение H_2S , мм
И-1	—	И-20	—	И-39	+++
И-2	+	И-21	+	И-40	—
И-3	++	И-22	+	И-41	+
И-4	—	И-23	—	И-42	+
И-5	+++	И-24	—	И-43	+
И-6	—	И-25	++	И-44	+
И-7	++	И-26	+++	И-45	+++
И-8	+++	И-27	—	И-46	—
И-9	—	И-28	+++	И-47	++
И-10	++	И-29	—	И-48	+++
И-11	—	И-30	—	И-49	—
И-12	—	И-31	+++	И-50	++
И-13	+	И-32	+++	И-51	—
И-14	+	И-33	+	И-52	+
И-15	—	И-34	+	И-53	—
И-16	+	И-35	++	И-54	++
И-17	+++	И-36	—	И-55	+++
И-18	++	И-37	+++	И-56	+++
И-19	—	И-38	+		

Примечания: "—" – нет почернения бумаги; "+" – длина почернения бумаги до 1 мм; "++" – длина почернения бумаги от 1 до 2 мм; "+++" – длина почернения бумаги более 2 мм.

Для дальнейшей работы были отобраны 34 штамма, у которых способность к синтезу сероводорода отсутствовала или была низкой. Такой выбор связан с тем, что присутствие сероводорода в вине в количествах, превышающих порог чувствительности восприятия, придает напитку специфический неприятный тон «тухлых яиц» или "затхлой воды" [174, 241].

Исследование бродильной способности штаммов показало, что только 22 из них в оптимальные сроки для виноделия полностью сбродили сахара с образованием спирта в диапазоне объемной доли 12,1-13,1 %. Штаммы отличались по способности к синтезу летучих кислот, массовая концентрация которых была в диапазоне от 0,12 до 2,15 г/л. У 29,4 % штаммов отмечено превышение рекомендуемых значений для столовых виноматериалов (таблица 9). На основании полученных данных нами отмечено 8 потенциальных кандидатов под номерами: И-2, И-6, И-11, И-14, И-15, И-16, И-21, И-30, у которых количество летучих кислот, накапливаемых в процессе брожения, составило менее 0,50 г/л.

Таблица 9 – Технологическая характеристика изолятов дрожжей

Номер изолята	Объемная доля этилового спирта, %	Массовая концентрация, г/л	
		остаточных сахаров	летучих кислот
1	2	3	4
И-1	12,3	3,1	0,95
И-2	12,6	3,0	0,25
И-4	12,1	3,1	1,82
И-6	13,0	3,3	0,18
И-9	12,2	4,0	0,68
И-11	12,5	2,3	0,31
И-12	12,1	1,4	0,57
И-13	12,1	2,1	0,70
И-14	12,3	3,1	0,25
И-15	12,1	1,8	0,15
И-16	12,9	3,6	0,23
И-19	12,5	3,1	1,31
И-20	12,8	3,1	0,71
И-21	12,5	2,4	0,34
И-22	12,6	1,2	0,64
И-23	12,5	2,6	1,25
И-24	12,6	2,9	1,60
И-27	13,0	3,7	1,51
И-29	13,1	1,5	0,75
И-30	13,1	1,5	0,15

Продолжение таблицы 9

И-33	13,0	2,2	2,12
И-34	12,8	2,5	2,15
И-36	12,8	2,5	0,88
И-38	12,9	3,1	0,75
И-40	12,9	1,6	1,93
И-41	12,4	2,7	1,12
И-42	12,5	1,5	1,11
И-43	12,6	1,3	0,74
И-44	12,4	1,9	0,54
И-46	12,1	1,9	0,81
И-49	12,5	1,6	0,59
И-51	12,3	3,5	0,81
И-52	12,3	3,1	0,72
И-53	12,7	4,0	0,61

Таким образом, выборка штаммов для исследования их влияния на ароматический профиль виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магараха составила 12 селекционных из КМВ "Магарах" (№ I-1, I-76, I-144, I-279, I-421, I-438, I-491, I-492, I-493, I-525, I-637, I-638) и 8 природных штаммов дрожжей (И-2, И-6, И-11, И-14, И-15, И-16, И-21, И-30).

Проверка способности к синтезу эндополигалактуроназы показала отсутствие этой способности у всех штаммов, кроме № I-421, I-438, у которых наблюдалась небольшая активность фермента.

3.4.3 Изучение влияния штаммов дрожжей на ароматический комплекс виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магараха. Актуальным направлением современного виноделия является производство высококачественных вин с выраженной сортовой индивидуальностью. В данном направлении привлекательным для потребителя являются вина из мускатных сортов винограда.

Первый этап оценки влияния штаммов дрожжей-сахаромицетов на формирование сортового аромата предусматривал оценку виноматериалов на соответствие требованиям нормативной документации (таблица 10).

Анализ данных показал, что все исследуемые штаммы дрожжей,

обеспечили полное выбраживание сахаров: массовая концентрация компонента

Таблица 10 – Физико - химические показатели виноматериалов

№ п/п	Коллекционный номер штамма	Объёмная доля этилового спирта, %	Массовая концентрация, г/л		
			сахаров	титруемых кислот	летучих кислот
Штаммы из КМВ «Магарач»					
1	I-1	11,6	2,4	7,2	0,25
2	I-76	11,7	2,1	7,5	0,36
3	I-144	11,8	3,1	7,9	0,82
4	I-279	11,4	2,7	7,3	0,18
5	I-421	11,4	2,1	7,4	0,18
6	I-438	11,9	2,8	7,4	0,31
7	I-491	11,5	3,3	8,3	0,57
8	I-492	11,4	3,3	8,1	0,70
9	I-493	11,5	3,5	7,4	0,25
10	I-525	12,0	1,8	7,0	0,15
11	I-637	11,9	1,9	6,9	0,23
12	I-638	11,9	2,0	7,1	0,31
Природные изоляты					
13	И-2	11,5	4,1	7,2	0,34
14	И-6	11,6	3,5	7,1	0,25
15	И-11	11,4	3,3	7,4	0,60
16	И-14	11,7	2,8	7,8	0,31
17	И-15	11,7	2,1	7,9	0,34
18	И-16	11,4	4,4	8,3	0,51
19	И-21	11,8	1,9	7,6	0,75
20	И-30	11,8	2,6	7,7	0,60

не превышала 4 г/л, что соответствует категории сухих вин, кроме штаммов И-2 и И-16, у которых данный показатель находился на уровне 4,1 и 4,4 г/л соответственно.

Объёмная доля этилового спирта в образцах варьировала в диапазоне 11,4 - 12,0 %. Массовая концентрация титруемых кислот в полученных виноматериалах различалась более существенно и находилась в пределах 6,9 - 8,3 г/л. Массовая концентрация летучих кислот в виноматериалах также варьировала в широком диапазоне – 0,15-0,82 г/л. Тринадцать штаммов дрожжей в процессе брожения синтезировали менее 0,4 г/л данного показателя.

Из литературных данных известно, что дрожжи способны синтезировать различное количество вторичных продуктов брожения, играющих важную роль в

формировании вкуса и аромата вина. Способность к биосинтезу различных веществ, таких как терпеновые и высшие спирты, сложные эфиры, ацетон и другие соединения значительно отличаются в зависимости от штамма дрожжей [8, 96, 132, 179, 246].

Исследование ароматического комплекса виноматериалов с помощью газохроматографического анализа позволило идентифицировать 17 компонентов, относящихся к различным группам химических соединений: высшим и терпеновым спиртам, сложным эфирам.

Учитывая тот факт, что специфический мускатный аромат обусловлен содержанием терпеновых соединений, большое внимание уделялось изучению динамики данного компонента в системе «сусло-виноматериал».

Установлено, что количественное содержание веществ данной группы в опытных виноматериалах варьировало в диапазоне от 0,46 до 1,51 мг/л (рисунок 20).

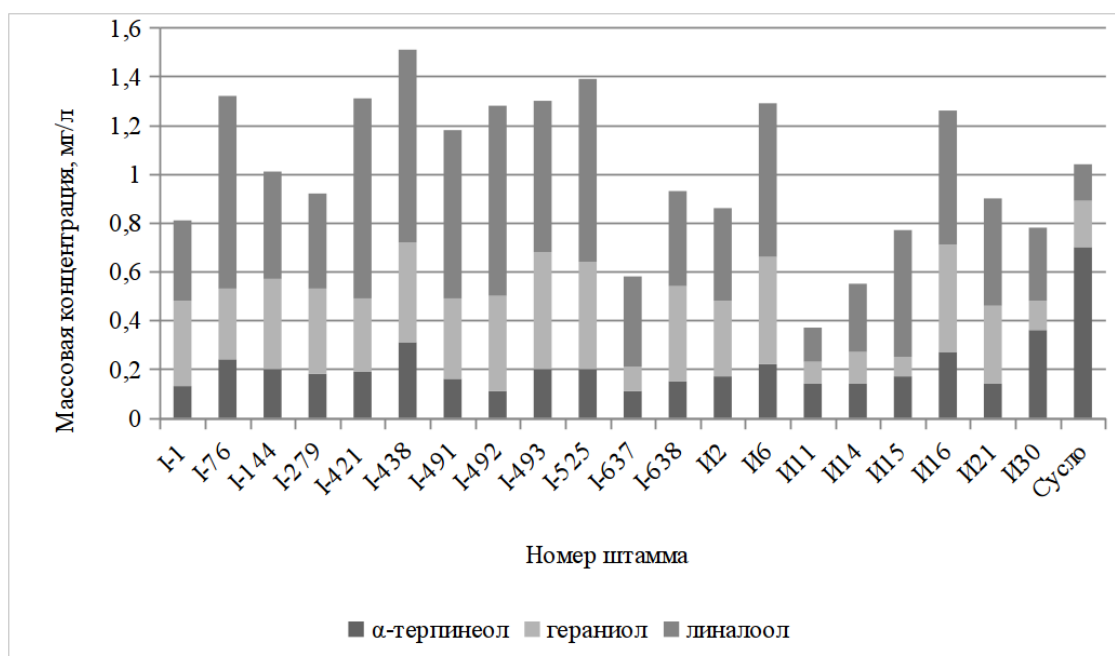


Рисунок 20 – Содержание терпеновых спиртов в опытных виноматериалах

Известно, что α -терпинеол отвечает за ноты сирени и цветочный аромат при пороговой концентрации 80 мкг/л, линалоол – за ноты цитрусов (15 мкг/л), транс- и цис-линалоолоксиды – за тонкий, цветочно-фруктовый аромат, гераниол обладает нежным ароматом розы и цветов (30 мкг/л) [210, 214, 250]. По степени влияния исследуемых штаммов на содержание терпеновых спиртов в виноматериалах, по сравнению с их исходным количеством в сусле, нами были выделены три группы: девять штаммов (I-76, I-421, I-438, I-491, I-492, I-493, I-525, И-6, И-16) способствовали увеличению количества компонента в виноматериале; восемь штаммов не оказали существенного влияния (I-1, I-144, I-279, I-638, И-2, И-15, И-21, И-30). В виноматериалах, полученных с использованием штаммов I-637, И-11, И-14 было отмечено снижение содержания терпеновых спиртов. Независимо от варианта опыта концентрация α -терпинеола снизилась на 0,34-0,59 мг/л. Все штаммы в процессе брожения способствовали увеличению концентрации линалоола на 0,13-0,67 мг/л (за исключением штамма И-15). По степени влияния на содержание гераниола исследуемые штаммы разделились на 2 группы: дрожжи из первой группы в результате брожения увеличивали его концентрацию на 0,10-0,29 мг/л (I-1, I-76, I-144, I-279, I-421, I-438, I-491, I-492, I-493, I-525, I-638, И-2, И-6, И-16, И-21). Ко второй группе можно отнести дрожжи, при использовании которых отмечается снижение массовой концентрации гераниола в виноматериалах, по сравнению с суслом (I-637, И-11, И-14, И-15, И-30).

На сложение аромата и вкуса виноматериалов значительное влияние оказывают высшие спирты [243]. Суммарное содержание высших спиртов (пропанол, изобутанол, гексанол, изоамиловый и β -фенилэтиловый спирт) в виноматериалах находилось в диапазоне от 153,9 до 263,9 мг/л (таблица 11), основное количество которого приходилось на изоамиловый спирт (57-73 %). В виноматериалах, полученных с использованием опытных штаммов дрожжей, значения показателя варьировало в диапазоне 94,8-172,8 мг/л, при пороге восприятия в 100 мг/л.

Таблица 11 – 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

Значительную роль в формировании цветочных оттенков аромата играют ароматические спирты, в частности β -фенилэтанол. Этот компонент с пороговой концентрацией 1,5 мг/л [276, 277] оказывает положительное влияние на развитие аромата вина и обладает цветочно-фруктовым запахом с оттенками свежескошенной травы [209], меда и чайной розы [155]. Исследование показало, что исследуемые штаммы отличались по способности к синтезу β -фенилэтилового спирта, массовая концентрация которого в опытных образцах виноматериалов варьировала в широком диапазоне от 25,8 до 80,7 мг/л. Наибольшее количество компонента было обнаружено в виноматериале, полученном с использованием коллекционного штамма дрожжей I-525. Минимальным содержанием β -фенилэтанола (25,8 мг/л) характеризовался образец, полученный с применением штамма И-15. 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.

Сложные эфиры, образуемые при брожении, также являются важными составляющими аромата вин. Они образуются в процессе биологической этерификации и, как правило, могут обладать различными фруктовыми и цветочными запахами, создавая приятный фруктово-плодовый фон. [158]. Анализ ароматического комплекса виноматериалов показал, что содержание сложных эфиров в опытных виноматериалах заметно отличалось в зависимости от использованного штамма и варьировало в диапазоне 4,0-19,1 мг/л (таблица 12). Сравнительно высокой эфиروобразующей способностью характеризовались 7 штаммов: массовая концентрация сложных эфиров в виноматериалах составила более 15 мг/л. Для 11 штаммов (I-144, I-279, I-421, I-436, I-491, I-492, I-493, I-525, И-2, И-6, И-21) накопление сложных эфиров варьировало в диапазоне от 6,9 до 14,6 мг/л. Проведение брожения с использованием штаммов I-638 и И-14 привело к минимальному накоплению сложных эфиров в виноматериалах: 5,7 и 4,0 мг/л соответственно.

Одним из важных факторов, определяющих выбор дрожжей для производства вин, является низкий синтез ацетоина. Несмотря на свое незначительное содержание в виноматериалах (обычно до 5 мг/л), он оказывает влияние на аромат и при его превращении в диацетил служит причиной появления тонов окисленности. Вина не окисленного типа содержат обычно не более 1 мг/л ацетоина.

Анализ опытных виноматериалов показал, что большинство отобранных нами штаммов дрожжей синтезировали незначительное количество ацетоина (менее 1 мг/л) (рисунок 21). В то же время следует отметить штаммы И-8, И-19 и И-20: в виноматериалах, полученных с их использованием, количество ацетоина варьировало в пределах 2,8-4,1 мг/л.

Таблица 12 – Содержание сложных эфиров в опытных виноматериалах

Номер штамма	Массовая концентрация, мг/л								Сумма
	изоамилацетат	этилбутират	этилкаприлат	этилкапринат	этилкапронат	этиллактат	этилллауринат	моноэтилсукцинат	
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

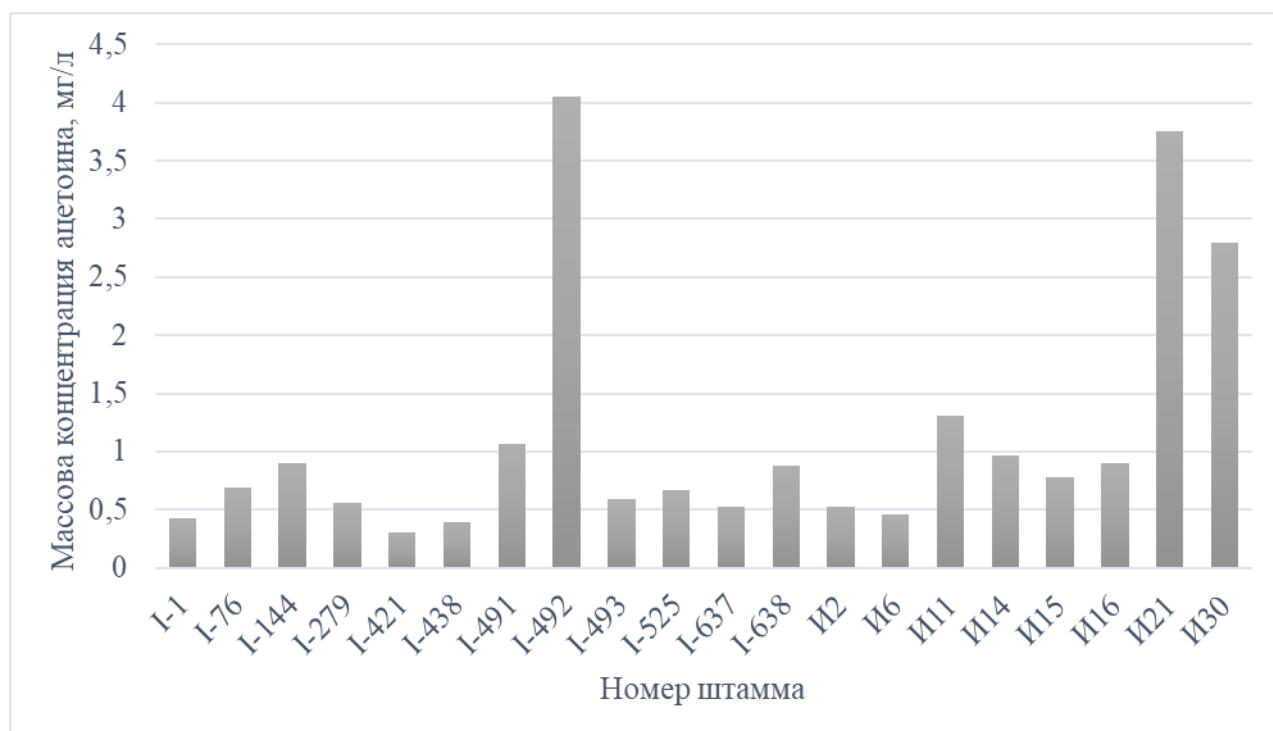


Рисунок 21 – Содержание ацетона в исследуемых виноматериалах

Продолжением количественного анализа компонентов ароматобразующего комплекса являлась оценка органолептических характеристик виноматериалов. По результатам дегустационной оценки нами были отобраны 7 исследованных виноматериалов, которые отличались сортовым ароматом цветочно-фруктового 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 (таблица 13). При этом образцы, приготовленные с использованием штаммов I-76, I-637, отличались более полным и гармоничным вкусом с медово-цитрусовыми оттенками.

Виноматериалы, брожение которых проводилось с использованием изолятов дрожжей, характеризовались либо слабым сортовым ароматом, либо его отсутствием и наличием парфюмерных, дюшесных и карамельных тонов в аромате и вкусе, а также другими посторонними тонами, что указывает на необходимость проведения с ними дальнейших селекционных работ.

Таблица 13 – Органолептическая оценка полученных виноматериалов из
винограда сорта Цитронный Магарача

№ п/п	Штамм дрожжей	Органолептическая характеристика	Дегустационная оценка, средний балл
1	2	3	4
1	I-1 Штейнберг 1892 г	Светло-соломенного цвета. Аромат цветочный, с нотами розы и шалфея. Вкус экстрактивный, слегка окисленный с горчинкой.	7,75
2	I-76 Алиготе М	Светло-соломенного цвета. Аромат яркий, пряно-медовый, с цветочными тонами и лимоном. Вкус гармоничный, с горчинкой, медовой и лимонной нотой.	7,80
3	I-144 Мускат венгерский	Светло-соломенного цвета Аромат ослабленный цветочный, легкая задушка. Вкус легкий, слегка разлаженный с цветочными тонами	7,69
4	I-279 Кокур 3	Соломенного цвета Аромат сортовой, с мускатными оттенками. Вкус гармоничный, фруктового направления.	7,70
5	I-421 Ужгород 231-1	Соломенного цвета Аромат ослабленный с травянистыми оттенками, «задушка». Вкус мягкий, глицеринистый	7,72
6	I-438 Берегово 2-10	Соломенного цвета Аромат слабовыраженный, с мускатными и лимонными нотами. Вкус слаженный, мягкий.	7,74
7	I-491 Мускат белый	Соломенного цвета Аромат легкий, цветочные тона. Вкус освежающий с горчинкой во вкусе.	7,70
8	I-492 Мускат розовый	Соломенного цвета. Аромат чистый, с нотами шалфея и розы. Вкус полный, гармоничный, с медовыми оттенками.	7,76
9	I-493 Алеатико	Светло-соломенного цвета Аромат слабовыраженный сортовой. Вкус разлаженный, без посторонних тонов.	7,69
10	I-525 Севастопольская 23	Светло-соломенного цвета Аромат нейтральный. Вкус с танинными оттенками.	7,70
11	I-637 Мускат 4 (Р)	Светло соломенного цвета. Аромат тонкий, цветочного направления с тонами розы и лимона. Вкус округлый, цветочно-фруктовый, с легкой горчинкой.	7,80
12	I-638 Меганом белый	Светло-соломенного цвета. Аромат слабовыраженный мускатно-цветочного направления. Вкус полный, слегка окисленный	7,72

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4
13	И-2	Соломенного цвета Аромат ослабленный, цитронный. Вкус пряный, без посторонних оттенков	7,68
14	И-6	Соломенного цвета Аромат легкий, цветочно-пряный, с карамельными нотами. Вкус полный, плодовой	7,66
15	И-11	Соломенного цвета Аромат приглушенный, плодово-пряный. Вкус терпкий, с горчинкой, и тонами гудрона.	7,60
16	И-14	Соломенного цвета Аромат нейтральный, с травянистыми оттенками. Вкус грубоватый, с окисленными оттенками, слащавый	7,60
17	И-15	Соломенного цвета Аромат: ослабленный, пряно-цветочный с нотами дюшеса. Вкус пряный, мягкий.	7,66
18	И-16	Соломенного цвета Аромат приглушенный, фруктово- парфюмерный. Вкус умеренно-кислотный, с цветочными оттенками.	7,52
19	И-21	Соломенного цвета Аромат с гудронно-травянистыми нотами. Вкус простой, с горчинкой	7,61
20	И-30	Соломенного цвета Аромат плодовой, с гудронным оттенком. Вкус мягкий с горчинкой	7,64

Таким образом, в результате комплексного изучения влияния штаммов дрожжей на качественный состав и количественное содержание углеводно-кислотного и ароматического комплексов для производства столовых вин из винограда сорта Цитронный Магарача рекомендованы два коллекционных штамма (I-76, I-637) из КМВ «Магарач». Использование данных штаммов позволяет получить виноматериалы из винограда сорта Цитронный Магарача с ярким развитым ароматом цветочно-фруктового направления, с проявлением тонов цитрусовых и розы. Отмечено, что штамм № I-76 способствовал обогащению виноматериалов терпеновыми спиртами и сложными эфирами, штамм № I-637 – сложными эфирами.

Для дальнейшей работы для испытания в производственных условиях нами был выбран штамм № I-76, уточненные данные были внесены в паспорт штамма (приложение И).

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

Полученные в п.п. 3.2., 3.3. и 3.4. результаты были использованы для обоснования совершенствования технологии производства виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача на основе изучения метаболизма дрожжей, основанного на использовании ФПДЭ, полученной при культивировании штамма дрожжей *Kluyveromyces marxianus* № III-407, для снижения вязкости сусла и снижения количества в нем взвесей и последующего сбраживания на отобранном штамме *Saccharomyces cerevisiae* № I-76 с целью усиления и сохранения аромата винограда сорта Цитронный Магарача.

Приготовление препарата осуществляли согласно схеме, представленной на рисунке 22.

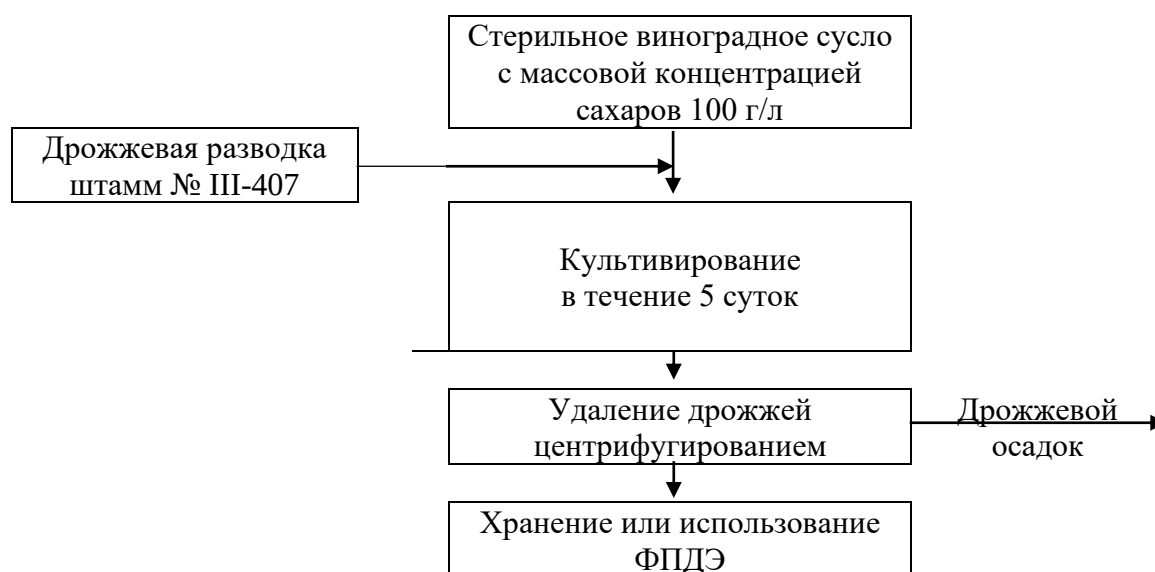


Рисунок 22 – Схема приготовления ФПДЭ

Переработку винограда и выработку виноматериалов производили согласно программе и методике испытаний (приложение К) и схеме, представленной на рисунке 23.

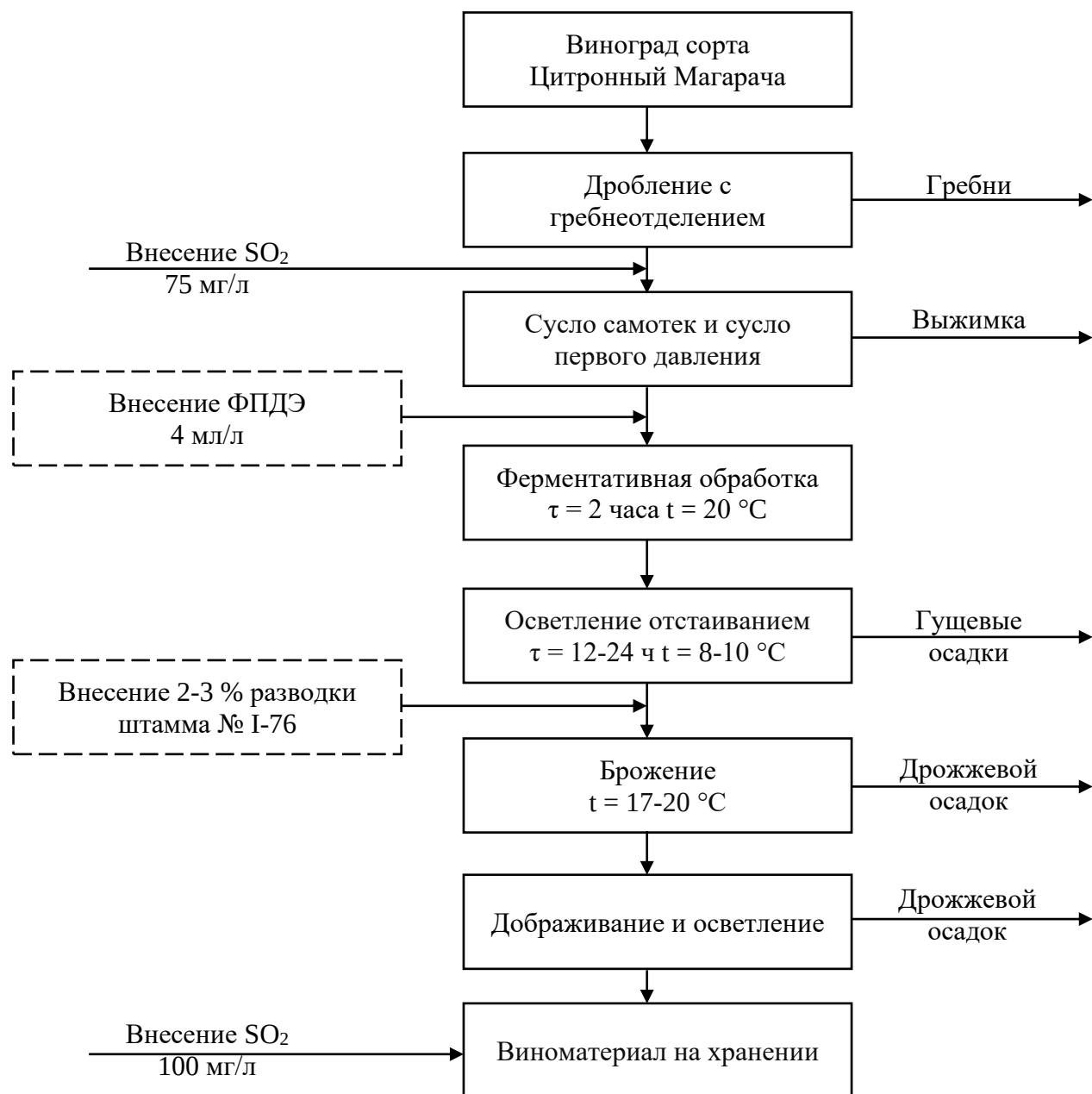


Рисунок 23 – Схема производства сортовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача

Технология предусматривает обработку свежесотделенного виноградного сусла ФПДЭ в количестве 4 мл/л с последующей выдержкой в течение 2 ч в сочетании с сульфитацией 75 мг/л, с последующим охлаждением до 10 °C и осветлением отстаиванием до 24 ч. Осветленное сусло снимается с гущевых осадков и сбраживается на штамме дрожжей № I-76 при температуре 17-20 °C. После завершения процесса брожения полученные виноматериалы снимаются с дрожжевого осадка, сульфитируются и отправляются на хранение.

Производственные испытания технологии приготовления виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и *Kluyveromyces marxianus* (№ III-407) осуществлялись в 2016 г. на винзаводе «Ливадия» ФГУП «ПАО «Массандра» (приложения Л, М, Н).

В качестве контроля эффективности действия ферментного препарата использовали вариант осветления сусла отстаиванием при температуре 10 °С до 24 ч. Результаты обработки сусла представлены в приложении П. В качестве контрольного штамма при проведении процесса брожения использовали штамм № I-527 из КМВ "Магарач".

Полученная партия опытных виноматериалов в количестве 1 000 дал получила высокую оценку (приложение Р).

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

В сезоны виноделия 2019-2022 гг. на винзаводе ООО "АПК "Мильтрим-Черноморские вина" (Краснодарский край) проводилось внедрение разработанной нами технологии приготовления сортовых виноматериалов с применением ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы для осветления виноградного сусла и штамма № I-76 для проведения процесса брожения. С применением указанной технологии выработано 23 820 дал виноматериалов высокого качества.

Акт о внедрения в производство технологии получения виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача приведен в приложении Т.

Экономический эффект от внедрения составляет 6 660 руб. на 1000 дал виноматериалов (приложение У).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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. *uvorum*, 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, pH среды 3,5, температура 30 °C.

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 °C и продолжительность обработки 2 ч.

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

7. Предложен подход к выбору штамма дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* для ферментации сусла, 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 столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и *Kluyveromyces marxianus* (№ III-407). Разработана и утверждена технологическая инструкция по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и *Kluyveromyces marxianus* (№ III-407) (ТИ 9103063859.002:2016).

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ЗГУ – вина защищенного географического указания с обозначением региона производства
- ЗНМП – вина защищенного наименования места происхождения, с указанием виноградника/малой территории производства
- КМВ «Магарач» – коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач»
- ФПДЭ – ферментный препарат дрожжевой эндополигалактуроназы
- п.н. – пар нуклеотидов
- ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- UFRJ – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Бразилия
- ATTC – American Type Culture Collection, Манассас, США
- CBS – CentraalbureauvoorSchimmelcultures, Утрехт, Нидерланды
- CCY – Culture Collection of Yeasts, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Братислава, Словакия
- CLIB – CollectiondeLevured'IntérêtBiotechnologique, Тиверваль-Гриньон, Франция
- DBVPG –Dipartimento di BiologiaVegetale Universita di Perugia, Италия;
- IFO (=NBRC) – Institute for Fermentation, Осака, Япония
- KCTC – Korean Collection for Type Cultures, Genetic Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Тайджон, Южная Корея
- MCYC – Departamento de Microbiologia, Escuela Tecnica Superior de Ingenieros Agronomos, Universidad Politecnica de Madrid, Испания
- NBRC (=IFO) – NITE Biological Resource Center, Осака, Япония
- NCYC – National Collection of Yeast Cultures, Норидж, Англия
- NRRL – Northern Region Research Center, Peoria, США
- NTU – нефелометрическая единица мутности
- YJM – Fungal Genetics Stock Center, США (FGSC; <http://www.fgsc.net>) UWO(PS) – University of Western Ontario, Department of Biology (formerly Plant Sciences) culture collection, Канада

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОСНИКОВ

1. Абдуразакова, С.Х. Биогенез терпеноидных соединений дрожжами / Абдуразакова С.Х., Фомичева Т.М., Хакимова С.П. // Известия вузов. Пищевая технология. – 1982. – № 2. – С. 134-135.
2. Авакянц, С.П. Биохимические основы технологии шампанского / С.П. Авакянц. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 352 с.
3. Авакянц, С.П. Игристые вина / С.П. Авакянц / М.: Агропромиздат, 1986. – 272 с.
4. Авакянц, С.П. Настаивание сусла на мезге и качество белого столового вина / С.П. Авакянц, О.В. Розправкова, В.П. Персианов // Виноделие и виноградарство СССР. – 1986. – №6. – С. 41-44.
5. Авакянц, С.П. Хромато-масс-спектрометрическое исследование летучих веществ вина / С.П. Авакянц, Е.Г. Ростянников, Б.С. Черняга, В.И. Навроцкий // Виноделие и виноградарство СССР. – 1981. – № 5. – С. 50-53.
6. Авидзба, А.М. Комплексно-устойчивые сорта и их место в виноградарстве Украины / А.М. Авидзба, М.В. Мелконян, С.Ю. Джениев, В.П. Антипов // Магарац. Виноградарство и виноделие. – 2000. – № 2. – С. 2-5.
7. Агеева, Н.М. Активность окислительно-восстановительных ферментов в сусле и виноматериалах из винограда новых сортов / Н.М. Агеева, М.Г. Марковский, С.А. Бирюкова, А.В. Прах, Е.Н. Якименко // Известия вузов. Пищевая технология. – 2018. – № 2-3. – С. 31-34.
8. Агеева, Н.М. Влияние расы винных дрожжей на состав летучих компонентов при сбраживании виноградного сусла / Н.М. Агеева, Р.В. Аванесьянц, Г.Ф. Музыченко, С.Д. Бурлака // Известия вузов. Пищевая технология. – 2015. – № 2-3. – С. 60–62.
9. Ажогина, В.А. Ароматобразующие компоненты вин, приготовленных из комплексноустойчивых сортов винограда / В.А. Ажогина, Н.М. Агеева // Виноград и вино России. – 1995. – № 6. – С. 27-29.
10. Ампелография СССР. Отечественные сорта винограда / под ред.

П.Я. Голодриги. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 504 с.

11. Бареева, Н.Н. Оценка сортов винограда нового поколения как сырья для комплексной переработки / Н.Н. Бареева, Л.В. Донченко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета – 2006. – № 16 – С. 1-8.

12. Бейбулатов, М.Р. Перспективные сорта винограда селекции института "Магарач" с мускатным ароматом / М.Р. Бейбулатов, А.С. Макаров, И.П. Лутков, С.О. Ульяновцев, Н.Ю. Луткова, Т.Р. Шалимова // Русский виноград. – 2017. – Т.5. – С. 108-115.

13. Бурьян, Н.И. Микробиология виноделия / Н.И. Бурьян – Симферополь: Таврия, 2002. – С. 351-374.

14. Бурьян, Н.И. Практическая микробиология виноделия / Н.И. Бурьян – Симферополь: Таврида, 2003. – 560 с.

15. Бутова, С.Н. Разработка биотехнологических основ деградации отходов растительного сырья ферментами пектолитического комплекса: автореф. дис. докт. биол. наук / С.Н. Бутова – М., 2005. – С. 48.

16. Вавилов, Н.И. Теоретические основы селекции / Н.И. Вавилов. – М.: Наука, 1987. – С. 169.

17. Валуйко, Г.Г. Стабилизация виноградных вин / Г.Г. Валуйко, В.И. Зинченко, Н.А. Мехузла. – Симферополь: Таврида, 2002. – 208 с.

18. Валуйко, Г.Г. Технология виноградных вин / Г.Г. Валуйко. – Симферополь: Таврида, 2001. – 624 с.

19. Валуйко, Г.Г. Технологія вина / Г.Г. Валуйко, В.А. Домарецький, В.О. Загоруйко. – К.: Центр навчальної літератури, 2003. – 592 с.

20. Виноградов, В.А. Использование флотационного эжекторного способа при производстве виноградного сока / В.А. Виноградов, А.В. Сильвестров, В.А. Загоруйко // Виноградарство и виноделие. – 2015. – Т. 45. – С. 101-103.

21. Виноградов, В.А. Осветление виноградного сусла флотационным методом / В.А. Виноградов, В.А. Загоруйко, А.В. Сильвестров // Виноделие и виноградарство. – 2005. – № 4. – С. 12-13.

22. Виноградов, В.А. Флотационное осветление продуктов переработки винограда и плодово-ягодного сырья / В.А. Виноградов, В.А. Загоруйко, А.В. Сильвестров, В.А. Бойко // Симферополь: Вестник «Крымское качество». – 2007. – С. 93 – 95.

23. Виноградов, В.А. Эффект десульфитации при осветлении виноградного сусла флотацией / В.А. Виноградов, А.В. Сильвестров // «Магараç». Виноградарство и виноделие. – 2014. – № 1. – С. 30-31.

24. Волынкин, В.А. Селекция новых поколений устойчивых сортов винограда / В.А. Волынкин // «Магараç». Виноградарство и виноделие. – 2002. – № 3. – С. 7-8.

25. Гайворонская, З.И. О пектине виноградного сусла / З.И. Гайворонская // Виноделие и виноградарство СССР. – 1955. – №8. – С. 12-16.

26. Гейдаров, Э.Э. Совершенствование технологии белых натуральных вин / Э.Э. Гейдаров, Х.К. Фаталиев // Известия вузов. Пищевая технология. – 2016. – № 4. – С. 53-56.

27. Герасимов, М.А. Технология вина / М.А. Герасимов – М.: Типография Московской картонажной ф-ки, 1959 – 637 с.

28. ГОСТ 13192-73 Вина, виноматериалы и коньяки. Метод определения сахаров. – М.: Стандартинформ, 2011. – 9 с.

29. ГОСТ 31782-2012 Виноград свежий машинной и ручной уборки для промышленной переработки. Технические условия. – М.: Росстандарт, 2014. – 5 с.

30. ГОСТ 32001-2012 Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Метод определения массовой концентрации летучих кислот. – М.: Стандартинформ, 2014. – 5 с.

31. ГОСТ 32030-2013 Вина столовые и виноматериалы столовые. Общие технические условия. – М.: Росстандарт, 2013. – 20 с.

32. ГОСТ 32095-2013 Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Метод определения объемной доли этилового спирта– М.: Стандартинформ, 2014. – 5 с.

33. ГОСТ 32114-2013 Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Методы определения массовой концентрации титруемых кислот. –

М.: Стандартиформ, 2013. – 5 с.

34. ГОСТ 32115-2013 Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Метод определения массовой концентрации свободного и общего диоксида серы. – М.: Стандартиформ, 2014. – 5 с.

35. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. – М., 2014. – 6 с.

36. Датунашвили, Е.Н. Биохимические основы применения ферментных препаратов в виноделии: автореф. дисс. ... д-ра технических наук / Датунашвили Елена Николаевна – М.: МТИИПП, 1974. – 55 с.

37. Датунашвили, Е.Н. Изучение условий биосинтеза полигалактуроназы дрожжами *Fabospora fragilis* / Е.Н. Датунашвили, Н.И. Астапович, В.В. Лебедев. – Ялта, 1980. – 17 с. – Деп. рукопись ВНИИВиВ "Магарач".

38. Датунашвили, Е.Н. Исследование ароматических веществ винограда / Е.Н. Датунашвили // Тр. ВНИИВиВ "Магарач". – 1958 – Т. 6. – С. 16.

39. Де Майно, П. Терпеноиды / П. Де Майно – М.: Издат. иностранной литературы, 1963. – 494 с.

40. Дурмишидзе, С.В. Дубильные вещества и антоцианы виноградной лозы и вина / С.В. Дурмишидзе – М.: Издательство Академии Наук СССР, 1955. – 324 с.

41. Егоров, Н.С. Свойства полигалактуроназы дрожжей *Fabospora macedomenbis* ВКМ Y-480 / Н.С. Егоров, Е.Н. Датунашвили, Н.С. Ландау // Биологические науки. – 1983. – № 8. – С. 35-39.

42. Ежов, В.Н. Исследование полисахаридов винограда и вина и их роли в формировании коллоидных помутнений: дисс. ... канд. биол. наук / Ежов Валерий Никитович. – Ялта, 1977. – 122 с.

43. Загоруйко, В.А. Применение флотационного эжекторного способа для осветления виноградного сусла и яблочного сока / В.А. Загоруйко, А.В. Сильвестров, В.А. Виноградов // Научные труды КубГТУ. – 2015 – № 8. – С. 1-5.

44. Зинченко, В.И. Предельное содержание азотистых веществ в сусле и вине, предотвращающее переокисленность / В.И. Зинченко // Тр. ВНИИВиВ

"Магарач". – 1964. – Т.ХІІІ. – С.24-43.

45. Зинченко, В.И. Двуокись кремния для осветления суслу и стабилизации вин / В.И. Зинченко, В.А. Загоруйко // Виноделие и виноградарство СССР. – 1982. – №7. – С.28-31.

46. Зинченко, В.И. Применение цитолитического ферментного препарата в виноделии / В.И. Зинченко. – Кишинев: Картя молдовеняскэ, 1975. – 192 с.

47. Зотов, А.Н. Разработка и внедрение рациональных технологий производства вин, насыщенных диоксидом углерода: автореф... канд. техн. наук / Зотов Анатолий Николаевич. – Ялта: ИВиВ «Магарач», 1998. – 18 с.

48. Игнатов, А.П. Характеристика комплексно-устойчивых столовых сортов винограда в условиях западной неукрывной зоны Крыма / А.П. Игнатов, Л.Г. Голобородько // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2000. – № 2. – С. 13-14.

49. Ильницкая, Е.Т. Новый технический сорт винограда Морозко / Е.Т. Ильницкая, Т.А. Нудьга, Е.Г. Пята, А.В. Прах // Русский виноград. – 2017. – Т. 6. – С. 17-23.

50. Ильницкая, Е.Т. Сорта селекции СКЗНИИСиВ для импортозамещения и совершенствования отечественного сортимента технического винограда / Е.Т. Ильницкая, Т.А. Нудьга, А.В. Прах, О.Н. Шелудько, А.И. Талаш // Садоводство и виноградарство. – 2016. – № 5. – С. 31-36.

51. Инструкция по микробиологическому контролю винодельческого производства (ИК 9170-1128-00334600-07) / под общ. ред. Л.А. Оганесянца. – М.: ГУ ВНИИ ПБ и ВП РАСХН, 2007. – 101 с.

52. Коллекция микроорганизмов виноделия. Каталог культур / Т.Н. Танашук, С.А. Кишковская, Е.В. Иванова, Т.К. Скоринова. – Ялта: ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН". – 2007. – 174 с.

53. Кишковский, З.Н. Химия вина. / З.Н. Кишковский, И.М. Скурихин – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 310 с.

54. Кудрявцев, В. И. Систематика дрожжей / В. И. Кудрявцев. – М.: Изд-во Акад. наук СССР, 1954. – 428 с.

55. Ласкавий, В.Н. Перспективні сорти винограду столового і технічного напрямку використання для Запорізької області / В.Н. Ласкавий // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2012. – № 3. – С. 9-12.

56. Лебедев, В.В. Биосинтез полигалактуроназы дрожжами *Zygofabospora marxiana* ВКМУ-832 : дисс. ... канд. биол. наук / Лебедев Виктор Васильевич. – Ялта, 1985. – 110 с.

57. Левченко, С.В. Анализ разнообразия популяций сортов Ташлы и Шабаш и отбор высокопродуктивных протоклонов / С.В. Левченко, И.А. Васылык // Проблемы развития АПК региона. – 2015. – Т. 2. – С. 17-22.

58. Лифшиц, Д.Б. Унифицирование методов определения активности ферментных препаратов производственного назначения / Д.Б. Лифшиц. – К.: УкрНИИНТИ, 1967. – С.42.

59. Лиховской, В.В. Агробиологическая специфичность селекционных форм - аналогов местных сортов винограда Крыма / В.В. Лиховской, В.А. Волынкин, М.Н. Борисенко, Н.П. Олейников, И.А. Васылык, Л.П. Трошин // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2016. – № 2. – С. 3-5.

60. Лиховской, В.В. Методология совершенствования генетического разнообразия и сортимента винограда: дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05 / Лиховской Владимир Владимирович. – Краснодар, 2018. – 441 с.

61. Лиховской, В.В. Методология совершенствования генетического разнообразия и сортимента винограда: моногр. / В.В. Лиховской. – Симферополь: Форма, 2019. – 367 с.

62. Личев, В. Към въпроса за използванена бентонита през време на ферментацията / В. Личев, З. Никова // Лозарство и винарство. – 1962. – № 1. – С. 38-45.

63. Майстренко, А.Н. Новый технический сорт винограда Изумруд / А.Н. Майстренко, Л.А. Майстренко, Н.А. Дуран, Е.Н. Медютова, Л.Н. Мезенцева, Н.В. Матвеева // Русский виноград. – 2017. – Т. 6. – С. 33-39.

64. Макаров, А.С. Состав органических кислот в виноматериалах, выработанных из новых сортов винограда селекции института «Магарач» / А.С.

Макаров, В.А. Таран, И.П. Лутков, Ю.С. Меркурьева, И.Ф. Пытель // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2007. – №1. – С. 23-24.

65. Макаров, А.С. Использование сортов винограда селекции НИВиВ «Магарач» в процессе производства игристых вин / А.С. Макаров, И.П. Лутков, Д.В. Ермолин, А.Я. Яланецкий, В.А. Загоруйко, Т.Р. Шалимова, Л.Ж. Чичинадзе // «Магарач». Виноградарство и виноделие – 2011. – №4. – С. 19-20.

66. Мачарашвили, Г.И. Ароматические вещества фруктовых соков и их превращения в винах при различных технологических операциях: автореф. дис...канд. техн. наук / Г.И. Мачарашвили. – Тбилиси, 1972. – 42 с.

67. Мелконян, М.В. Биохимическая характеристика комплексноустойчивых сортов винограда для виноделия / М.В. Мелконян, Е.Л. Беленко, Н.Л. Студенникова // Виноград и вино России. – 2000. – № 1. – С. 9-10.

68. Мелконян, М.В. Предварительные результаты испытания новых сортов винограда в Крыму / М.В. Мелконян, А.И. Рачинская, Н.П. Олейников, Л.Г. Акопян // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2000. – № 3. – С. 9-13

69. Мелконян, М.В. Результат ступенчатой селекции винограда / М.В. Мелконян, Л.А. Чекмарев, О.А. Бойко, Н.Л. Студенникова, О.В. Разгонова // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2001. – № 1. – С. 7-10.

70. Мелконян, М.В. Селекция винограда в триединстве с генетикой и ампелографией в XIX-XX в.в и ее задачи на XXI век / М.В. Мелконян, В.А. Волынкин // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2001. – № 1. – С. 4-7.

71. Мелконян, М.В. Селекция и частная генетика винограда: прошлое, настоящее, будущее / М.В. Мелконян // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2002. – № 3. – С. 4-6.

72. Мелконян, М.В. Содержание биополимеров в зрелых ягодах винограда в условиях южного берега Крыма / М.В. Мелконян, Н.Л. Студенникова, А.И. Рачинская, Н.А. Рошка // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2000. – № 3. – С. 13-15.

73. Мелконян, М.В. Технологическая оценка новых сортов винограда селекции ИВиВ «Магарач» / М.В. Мелконян, В.А. Волынкин, И.Ф. Пытель, В.А. Таран,

В.А. Локтионова, В.Н. Ласкавый // Магарач. Виноградарство и виноделие». – 2003.– №1.– С. 15-17.

74. Методы технохимического и микробиологического контроля в виноделии / под ред. Гержиковой В. Г. 2-е изд. – Симферополь: Таврида, 2009. – 304 с.

75. Мунгиева, Н.А. Получение чистой дрожжевой полигалактуроназы и изучение условий её применения в виноделии: диис. ... канд. техн. наук: 05.18.08 / Мунгиева Нина Александровна. – Ялта., 1980. – 222 с.

76. Нагрецкий, В.И. Хромато-масс-спектрометрическое исследование летучих компонентов вин / В.И. Нагрецкий, Н.А. Галяшин // Материалы Всесоюз. конф. Геленджик "Применение хроматографии в пищевой микробиологии". – М. 1990. – С. 112-113.

77. Наумов, Г.И. Естественное разнообразие дрожжей – неисчерпаемый генофонд для фундаментальных и прикладных разработок / Г.И. Наумов // Успехи современной биологии. – 1997. – Т. 117 – №. 2. – С. 185–195.

78. Наумов, Г.И. Таксономия, экология и генетика дрожжей *Saccharomyces bayanus* – нового объекта в науке и практике / Г.И.Наумов, Е.С.Наумова, Н.Н.Мартыненко, И.Маснёф-Помаред // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – № 6. – С. 723–730.

79. Нгуен, Л.А. Разработка технологии дрожжевой полигалактуроназы и ее применения: афтореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.10 / Нгуен Ла Ань. – М., 1995. – 26 с.

80. Нечаев, Л.Н. Виноград – качество, переработка, хранение // Ростов-на-Дону: Ростовское книжное издательство, 1966. – 237 с.

81. Нилов, В.И. Химия виноделия. / В.И. Нилов, И.М. Скурихин. – М.: Пищевая промышленность. – 1967. – 440 с.

82. Оганесянц, Л.А. Влияние функционально активных метаболитов дрожжей на качество винодельческой продукции / Л.А.Оганесянц, В.П.Бакулин, Б.Б. Рейтблат, Н.К.Кардаш // Виноделие и виноградарство. – 2008. – № 1. – С. 18-19.

83. Охременко, Н.С. Производство виноматериалов для игристых мускатных

вин / Н.С. Охременко, Е.П. Шольц, Е.С. Дробоглав // Виноградарство и виноделие СССР. – 1973. – № 8. – С. 21-24.

84. Писарницкий, А.Ф. Ароматобразующие вещества вин и коньяков: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: / А.Ф. Писарницкий. – М.: Ин-т биохимии им. А.М. Баха АН СССР, 1980. – 44 с.

85. Покровский, А.В. Разработка технологических приемов повышения качества специальных вин без выдержки на основе использования ферментативного катализа: дис. канд. техн. наук / Покровский Алексей Викторович – М.: МГУПП, 2000. – 100 с.

86. Раджабов, А.К. Состояние и перспективы развития виноградарства, включая питомниководство. Науч. аналит. обзор / А.К. Раджабов, Н.П. Мишуров, Т.А. Щеголихина. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019 – 92 с.

87. Радчевский, П.П. Особенности проявления регенерационной способности у черенков технических сортов винограда селекции Института винограда и вина "Магарах" – Первенец Магарача, Подарок Магарача и Цитронный Магарача / П.П.Радчевский, Е.В. Ачкасова // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 114. – С. 1208-1229.

88. Родопуло, А.К. Биохимия шампанского производства / А.К. Родопуло. – М.: Пищ. про-ть, 1966. – 306с.

89. Родопуло, А.К. О превращении эфирных масел винограда в процессе брожения / А.К. Родопуло, А.Ф. Писарницкий // Виноделие и виноградарство СССР. – 1967. – № 7. – С. 20-24.

90. Родопуло, А.К. Основы биохимии виноделия / А.К. Родопуло. – М.: Легк. и пищ. про-ть, 1983. – 240 с.

91. Родопуло, А.К. Химическая природа веществ, обуславливающих букет вина / А.К. Родопуло, И.А. Егоров. – М.: Пищ. про-ть, 1981. – Вып. 1. – 21 с.

92. Родопуло, А.К. Эфирные масла винограда и их изменения в процессе брожения / А.К. Родопуло, И.А. Егоров, А.Ф. Писарницкий, Н.А. Буззубов // Виноделие и виноградарство СССР. – 1971. – № 6. – С. 59.

93. Розправкова, О.В. Совершенствование технологии переработки белых сортов винограда на столовые вина: автореф. дис... канд. техн. наук / Розправкова О.В. – М., 1989. – 24 с.

94. Рябая, Н.Е. Полигалактуроназа дрожжей *Saccharomyces pastorianus*: образование и свойства: автореф. дис. канд. техн. наук / Рябая Наталья Евгеньевна – Минск: Институт микробиологии, 1994. – 25 с.

95. Самвелян, А.М. К вопросам улучшения качества виноградных вин: автореф... канд. техн. наук / Самвелян А.М. – Тбилиси, 1974. – 24с.

96. Семейкин, В.А. Дрожжи для создания неповторимого букета красных вин / В.А. Семейкин // Ликеро-водочное производство и виноделие. – 2012. – № 11-12. – С. 16–17.

97. Сони́на, Е. Г. Совершенствование технологии производства виноградного сока и виноматериалов на основе использования пектолитических ферментов дрожжей: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.07 / Сони́на Елена Григорьевна. – Ялта, 1990. – 109 с.

98. Студенникова, Н.Л. Основные ампелографические признаки биотипов винограда сорта Цитронный Магарача / Н.Л. Студенникова, З.В. Котоловец // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2016. - № 1. - С. 2-3.

99. Таран, Н.Г. Влияние обработки суслу ферментным препаратом на физико-химический состав и пенистые свойства виноматериалов для игристых вин / Н.Г. Таран, И.Н. Пономарева, Е.В. Солдатенко, И.Н. Троцкий // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2011. – № 2. – С. 34–36.

100. Теория и практика виноделия. Том 2: Характеристика вин. Созревание винограда. Дрожжи и бактерии / Ж. Рибера-Гайон, Э. Пейно, П. Рибера-Гайон, П. Сюдро. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 352 с.

101. Теория и практика виноделия. Том 3: Способы производства вин. Превращения в винах. / Ж. Рибера-Гайон, Э. Пейно, П. Рибера-Гайон, П. Сюдро. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 480 с.

102. Тихонова, А.Н. Влияние штаммов активных сухих дрожжей на органолептику вина / А.Н. Тихонова, Л.И.Стрибижева, Е.В.Ежова, Н.Ю.Качаева //

Виноделие и виноградарство. – 2011. – № 2. – С. 14–15.

103. Трошин, Л.П. Лучшие сорта винограда Евразии / Л.П. Трошин. – Краснодар: Алви-Дизайн, 2006. – 224 с.

104. Трошин, Л.П. Новые районированные в России сорта винограда / Л.П. Трошин, Н.Г. Цурканенко // Виноделие и виноградарство. – 2006. – № 4. – С. 38.

105. Трошин, Л.П. Оценка и отбор селекционного материала винограда / Л.П. Трошин. – Ялта, 1990. – 160 с.

106. Тюрина С.С. Исследование пектолитических ферментов виноградной ягоды: дис. ... канд. биол. наук / Тюрина Светлана Сергеевна. – Ялта, 1977. – 125с.

107. Фуркевич, В.А. Исследование и совершенствование технологии приготовления виноматериалов для белых столовых вин: дис... канд. техн. наук / Фуркевич Владимир Александрович. – Ялта, 1980. – 151 с.

108. Шольц-Куликов, Е.П. Влияние схем переработки и степени зрелости винограда на качество мускатного сусла / Е.П. Шольц-Куликов // Сб. науч. тр. Одесского сельскохозяйственного института (Виноградарство). – Одесса, 1973. – С. 166-170.

109. Шольц-Куликов, Е.П. Исследование и совершенствование технологии мускатных игристых вин: автореф. дис... канд. техн. наук / Шольц-Куликов Евгений Павлович. – М.: Всесоюз. заочн. институт. пищ. пром., 1974. – 24 с.

110. Яланецкий, А.Я. Технологическая оценка сорта винограда Цитронный Магарача / А.Я. Яланецкий, Г.В. Сивочуб, Н.А. Шмигельская // «Магарач». Виноградарство и виноделие. – 2017. – № 2. – С.41-43.

111. Antoce, O.-A. Calorimetric study of yeast growth and its inhibition by added ethanol at various pHs and temperatures / O.-A. Antoce, V. Antoce, K. Takahashi // NetsuSokutei. – 1997. – V. 24. – № 4. – P. 206–213.

112. Aragon, P. Influence of clarification, yeast type, and fermentation temperature on the organic acid and higher alcohol of Malvasia and Muscatel wines / P. Aragon, J. Atienza, M.D. Climent // Am. J. Enol. Vitic. – 1998. – V. 49. – № 2. – P. 211-219.

113. Arcanjo, N.M.O. Red wine produced from the Isabella and Ives cultivar

(*VitisLabrusca*): profile of volatiles and aroma descriptors / N.M.O. Arcanjo, M.E.S. Oliveira, I.B.S. Araujo, F.L.H. Silva, M.S. Madruga // Food Sci. Technol. – 2018. – V. 38. – № 2. – P. 271-279.

114. Bakker, J. Wine: Flavour Chemistry / J. Bakker, R.J. Clarke. – New Jersey: Wiley-Blackwell, 2001. – 440 p.

115. Barbe, C. Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation / C. Barbe, D. Dubourdieu // J. Sci. Food Agric. – 1998. – V. 78. – P. 471-478.

116. Bauer, F. Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine – A review / F. Bauer, I.S. Pretorius // South African J. Enol. Vitic. – 2000. – V. 21. – P. 27-51.

117. Belda, I. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking / I. Belda, L.B. Conchillo, J. Ruiz, E. Navascués, D. Marquina, A. Santos // Int. J. Food Microbiol. – 2016. – V. 223. – P. 1-8.

118. Bertrand, A. Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des constituants volatils du vin / A. Bertrand // J. Int. Sci. Vigne du Vin. – 1968. – V. 2. – № 2. – P. 175-270. 201

119. Bitteur, S. Carbonic anaerobiosis of Muscat grape. 2 – Changes in the distribution of free and bound terpenols / S. Bitteur, C. Tesniere, A. Fauconnet, C. Bayonove, C. Flanzy // Sci. Alim. – 1996. – V. 16. – P. 37-48.

120. Black, C.A. Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances / C.A. Black, M. Parker, T.E. Siebert, D.L. Capone, I.L. Francis // Aust. J. Grape Wine Res. – 2015. – V. 21. – P. 582–600.

121. Blanco, P. Cloning, molecular characterization, and expression of an endopolygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b / P. Blanco, S. Sieiro, N.M. Reboredo, T.G. Villa // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – V. 164. – P. 249–255.

122. Blanco, P. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae* / P. Blanco, C. Sieiro, A. Diaz, T.G. Villa // Can. J. Microbiol. – 1994. – № 40. – P. 974-977.

123. Blanco, P. Production of pectic enzymes in yeasts / P. Blanco, C. Sieiro, T.G. Villa // FEMS Microbiol. Lett. – 1999. – V. 175. – P. 1-9.
124. Bork, U. Aroma – Saving. Eine nanotechnologie zur erhaltung der Aromakomponenten bei der wein - und fruchtsaftherstellung / U. Bork // Getranketechnik. – 1989. – №3. – S. 99-109.
125. Brieskorn, C.H. Neue triterpensäuren der Weintraubenschale / C.H.Brieskorn, G. Blooszyk // Untersuch und forsch. – 1982. – V. 172. – № 3. – S. 201-205.
126. Buiarelli, F. Identification of hydroxycinnamic acid–tartaric acid esters in wine by HPLC–tandemmass spectrometry / F. Buiarelli, F. Coccioli, M. Merolle, R. Jasionowska, A. Terracciano // Food Chem. – 2010. – V. 123. – P. 827-833.
127. Burin, V.M. Nitrogen compounds in must and volatile profile of white wine: Influence of clarification process before alcoholic fermentation / V.M. Burin, V. Caliar, M.T. Bordignon-Luiz // Food Chem. – 2016. – V. 202. – P. 417-425.
128. Bussink, H.J. The polygalacturonase of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes / H.J. Bussink, F.P. Buxton, B.A. Fraaye, L.H. Graaff, J. Visser // Eur. J. Biochem. – 1992. – V. 208. – P. 83–90.
129. Call, H.P. Pektolytische aktivitäten von laktose und milchsäure assimilieren de Hofen. Screening auf pectinolytische und macerierende aktivitäten / H.P. Call, C.C. Emeis // Chem. Microbiol. Technol. Lebensm. – 1978. – V.5. – P.137-142.
130. Carrau, F.M., De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts / F.M. Carrau, K. Medina, E. Boido, L. Farina, C. Gaggero, E. Dellacassa, G. Versini, P.A. Henschke // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – V. 243. – P. 107–115.
131. Cho, I.J. Heterologous expression of polygalacturonase genes isolated from *Galactomyces citriaurantii* IJ-1 in *Pichia pastoris* / I.J. Cho, I.C. Yeo, N.K. Lee, S.H. Jung, Y.T. Hahm // J. Microbiol. – 2012. – V. 50. – № 2. – P. 332–340.
132. Cordente, A.G. Flavour-active wine yeasts / A.G. Cordente, C.D. Curtin, C. Varela, I.S. Pretorius // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 96. – P. 601–618.
133. Cordonnier, R. Etude de la phase prefermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arome, cas des terpenols, des aldehydes et des alcoolsen C₆ / R. Cordonnier, C. Bayonove // Connais. Vigne et vin. – 1981. – V.15. –

№ 4. – P. 269-286.

134. Crowell, E.A. Influence of aeration and suspended material on higher alcohols, acetoin, and diacetyl during fermentation / E.A. Crowell, J.F. Guymon // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1963. – V. 14. – P. 214-222.

135. Čuš, F. The influence of yeast strains on the composition and sensory quality of Gewürztraminer wine/ F. Čuš, M. Jenko // *Food Technol. Biotechnol.* – 2013. – V. 51. – № 4. – P. 547-553.

136. De-La-Fuente-Blanco, A. On the effects of higher alcohols on red wine aroma / A. De-La-Fuente-Blanco, M.P. Sáenz-Navajas, V. Ferreira // *Food chem.* – 2016. – V. 210. – P. 107-114.

137. Di Stefano, R. Composti terpenici del moscato bianco del Piemonte / R. Di Stefano // *Vini Ital.* – 1981. – V. 23. – № 130. – P. 29-43.

138. Divol, B. *PGU1* gene natural deletion is responsible for the absence of endopolygalacturonase activity in some wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* / B. Divol, P. Rensburg // *FEMS Yeast Res.* – 2007. – V. 7. – P. 1328–1339.

139. Drawert, F. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis* / F. Drawert, H. Barton // *J. Agric. Food Chem.* – 1978. – V. 26. – № 3. – P. 765-766.

140. Dubourdieu D. Role des levures dans la genese de l'arôme varietal des vins: exemplcluSouoignon / Dubourdieu D., Tominaga T. // *Proc. 5th Int. Symp. Innovation in wine technology.* – Stuttgart. – 1998. – P. 1-9.

141. Dubourdieu, D. Observations sur la vinification en blanc sec. Essais de filtration des moûts après debourbage statique / D. Dubourdieu, D. Hadjinicolaou, A. Bertrand // *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.* – 1980. – V. 14. – № 4. – P. 247–261.

142. Eschstruth, A. Comparative characterization of endo-polygalacturonase (*Pgu1*) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking conditions / A. Eschstruth, B. Divol // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 91. – P. 623–634.

143. Esteve-Zarzoso, B. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA

gene and the two ribosomal internal transcribed spacers / B.Esteve-Zarzoso, C.Belloch, F.Uruburu, A.Querol // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – V. 49. – P. 329–337.

144. Evers, M.S. Vitamins in wine: Which, what for, and how much? / M.S. Evers, C. Roullier-Gall, C. Morge, C. Sparrow, A. Gobert, H. Alexandre // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. – 2021. – V. 20. – P. 2991-3035.

145. Fenoll, J. Changes of free and glycosidically bound monoterpenes and aromatic alcohols in moscatuel and ruby seedless table grapes during development / J.Fenoll, C.M.Martinez, P.Hellin, P.Flores // J. Int. Sci. Vigne Vin. – 2012. – V. 46. – № 1. – P. 41-50.

146. Ferná'ndez-González, M. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains / M. Ferná'ndez-González, J.F. Ubeda, T.G. Vasudevan, R.R. Cordero Otero, A.I. Briones // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – V. 237. – P. 261–266.

147. Fernández, M. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making / M. Fernández, J.F. Úbeda, A.I. Briones // Int. J. Food Microbiol. – 2000. – V. 59. – № 1. – P. 29-36.

148. Fernández-González, M. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species / M. Fernández-González, R. Di Stefano, A. Briones // Food Microbiol. – 2003. – V. 20. – № 1. – P. 35-41.

149. Ferreira, A.M. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components – A preliminary study / A.M. Ferreira, M.C. Climaco, A.M. Faia // J. App. Microbiol. – 2001. – V. 91. – № 1. – P. 67-71.

150. Fischer, G. Chromosomal evolution in *Saccharomyces* / G.Fischer, S.A.James, I.N.Roberts, S.G.Oliver, E.S.Louis // Nature. – 2000. – V. 405. – P. 451–454.

151. Flagfeldt, D.B. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* / D.B. Flagfeldt, V. Siewers, L. Huang, J. Nielsen // Yeast. – 2009. – V. 26. – P.545–551.

152. Flores, M.G. Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking / M.G.Flores, M.E.Rodríguez, J.M.Oteiza, R.J.Barbagelata, C.A. Lopes // Int. J. Food

Microbiol. – 2017. – V. 249. – P. 9-17.

153. Fraile, P. Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of rose wines. Evolution during fermentation / P. Fraile, J. Garrido, C. Ancín // J. Agric. Food Chem. – 2000. – V. 48. – № 5 – P. 1789–1798.

154. Fraissinet-Tacher, L. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*/ L. Fraissinet-Tacher, P. Raymond-Cotton, M. Fevre // Curr. Genet. – 1995. – V. 29. – P. 96–99.

155. Franco, M. Off-vine grape drying effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximénez grape variety / M.Franco, R.A.Peinado, M.Medina, J.Moreno // Agric. Food Chem. – 2004. – V. 52. – P. 3905-3910.

156. Fu, X. Understanding the stress responses of *Kluyveromyces marxianus* after an arrest during high-temperature ethanol fermentation based on integration of RNA-Seq and metabolite data / X. Fu, P. Li, L. Zhang, S. Li // App. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – V. 103. – P. 2715-2729.

157. Furdíková K., Malík F. Influence of yeast on the aroma profile of wine // Kvasny Průmysl. – 2007. – V.53. – P. 215-221.

158. Furdíková, K. Influence of yeast on the aroma profile of wine / K. Furdíková, F. Malík // Kvasny Průmysl. – 2007. – V. 53. – P. 215-221.

159. Gainvors, A. Detection method for polygalacturonase-producing strains of *Saccharomyces cerevisiae*/ A.Gainvors, A.Belarbi // Yeast. – 1995. – V.11. – P. 1493-1499.

160. Garde-Cerdán, T. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation / T. Garde-Cerdán, C. Ancín-Azpilicueta // LWT-Food Sci. Technol. – 2008. – V. 41. – № 3. – P. 501–510.

161. Gibson, B.R. Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus* / B.R.Gibson, E.Storgårds, K.Krogerus, V.Vidgren // Yeast. – 2013. – V. 30. – №. 7. – P. 255-266.

162. Gognies, S. Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyce*

scerevisiae endopolygalacturonase-encoding gene (*PGL1*) / S. Gognies, A. Gainvors, M. Aigle, A. Belarbi // *Yeast*. – 1999. – V. 15. – P. 11–22.

163. Goliaš, J. Modifikace těkav chládek vina ucinkem enzymu *Botrytis cinerea* / J. Goliaš, J. Maghovec, Z. Malčík // *Acta Univ. Agr.* – 1984. – V. 32. – № 1. – P. 87–98.

164. Grba, S. Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey / S. Grba, V. Stehlik-Tomas, D. Stanzer, N. Vahčić, A. Škrilin // *Chem. Biochem. Eng. Q.* – 2002. – V. 16. – № 1. – P. 13–16.

165. Grossman, M. Einfluss kellertechnischer Massnahmen auf das Sortenbukett / M. Grossman, S. Sukran, A. Rapp // *Weinwirt.-Techn.* – 1990. – № 8. – S. 13–16.

166. Gunata, Y.Z. Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. Muscat during the wine processing: preliminary result / Y.Z. Gunata, C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1986. – V. 37. – P. 112–114.

167. Gunata, Y.Z. The aroma of grapes. Localization and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation / Y.Z. Gunata, C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier // *J. Sci. Food Agric.* – 1985. – V. 36. – P. 857–862.

168. Gunata, Z. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques / Z. Gunata, I. Dugelay, J.C. Sapis, R. Baumes, C. Bayonove // *J. Int. Sci. Vigne et du vin.* – 1990. – V. 24. – № 3. – P. 133–144.

169. Harsa, S. Production of polygalacturonases from *Kluyveromyces marxianus* fermentation: preliminary process design and economics / S. Harsa, C.A. Zaror, D.L. Pyle // *Process Biochem.* – 1993. – V. 28. – P. 187–195.

170. Hazelwood, L.A. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism / L.A. Hazelwood, J.-M. Daran, A.J.A. van Maris, J.T. Pronk, J.R. Dickinson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 74. – № 8. – P. 2259–2266.

171. Hernández-Orte, P. Addition of amino acids to grape juice of the Merlot variety: Effect on amino acid uptake and aroma generation during alcoholic fermentation /

P. Hernández-Orte, M.J.Ibarz, J. Cacho, V. Ferreira // Food Chem. – 2006. – V. 98. – № 2. – P. 300–310.

172. Hirose, A. Isolation and genetic determination of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant that produces an endopolygalacturonase / A.Hirose, M.Fujii, M.Kishida, H.Kawasaki, T. Sakai// J. Biosci. Bioeng. – 1999. – V. 87. – P. 594–597.

173. Hirose, N.K. Molecular cloning and expression of a polygalacturonase gene in *Saccharomyces cerevisiae* / N.K. Hirose, M. Kishida, H. Kawasaki, T. Sakai// J. Ferment. Bioeng. – 1998. – V. 86. – P. 332–334.

174. Huang, C.W. Hydrogen sulfide and its roles in *Saccharomyces cerevisiae* in a winemaking context / C.W.Huang, M.E.Walker, B.Fedrizzi, R.C.Gardner, V. Jiranek // FEMS Yeast Res. – 2017. – V. 17. – P. 1–10.

175. Iland, P.G. Optimization of methods for the determination of total and red-free glycosil glucose in black grape berries of *Vitis Vinifera* / P.G. Iland, W. Cyncar, I.L. Francis, P.J. Williams, B.G. Coombe // Aust. J. Grape Wine Res. – 1996. – V. 2. – № 3. – P. 171-178.

176. Jia, J. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* / J. Jia, A. Wheals // Curr. Genet. – 2000. – V. 38. – P. 264-270.

177. Killian, E. Fermentation esters—Formation and retention as affected by fermentation temperature / E. Killian, C.S. Ough // Am. J. Enol. Viticult. – 1979. – V. 30. – № 4. – P. 301-305.

178. King, A. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces* / A. King, J.R. Dickinson // Yeast. – 2000. – V. 16. – P. 499–506.

179. King, E.S. The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine aroma composition, sensory properties and consumer preference / E.S.King, R.L.Kievit, C.Curtin, J.H.Swiegers, I.S.Pretorius, S.E.P.Bastian, I.L. Francis // Food Chem. – 2010. – V. 122. – № 3. – P. 618-626.

180. Kreger-van Rij, N.J.W. The Yeasts – a Taxonomic Study, Third revised and enlarged edition / N.J.W. Kreger-van Rij. – Amsterdam: Elsevier, 1984. – 1082 p.

181. Kurtzman, C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizula* / C.P. Kurtzman // FEMS Yeast Res. – 2003. – V. 4. – P.233–245.

182. Lachance M.-A. *Kluyveromyces* van der Walt (1971) / The Yeast, a Taxonomic Study, 5th ed. – eds. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout // Amsterdam: Elsevier, 2011. – V. 2. – P. 471-481.

183. Lambri, M. Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes / M. Lambri, R. Dordoni, A. Silva, D.M. De Faveri // Int.J.FoodSci.Technol. – 2012. – V. 47. – P. 1-12.

184. Lavigne, V. Interprétation et prévention des défauts olfactifs de réduction lors de l'élevage sur lies totaux / V. Lavigne // Rev. Fr. Oenol. – 1995. – V. 155. – P. 36–39.

185. Lavigne, V. Recherche sur les composés soufrés formés par la levure au cours de la vinification et de lestage des vins blancs secs / V. Lavigne, D. Dubourdieu // Rev. Oenol. – 1997. – V. 85. – P. 23–30.

186. Liti, G. Population genomics of domestic and wild yeasts / G.Liti, D.M.Carter, A.M.Moses, J.Warringer, L.Parks, S.A.James, R.P.Davey, I.N.Roberts, A.Burt, V.Koufopanou, I.J.Tsai, C.N.Bergman, D.Bensasson, M.J.T.O'Kelly, A.van Oudenaarden, D.B.T.Barton, E.Bailes, A.N.Nguyen Ba, M.Jones, M.A.Quail, I.Goodhead, S.Sims, F.Smith, A.Blomberg, R.Durbin, E.J. Louis // Nature. – 2009. – V. 458. – P. 337–341.

187. Liu, J. Overproduction of geraniol by enhanced precursor supply in *Saccharomyces cerevisiae* / W.Zhang, G. Du, J.Chen, J. Zhou // J. Biotechnol. – 2013. – V. 168. – P. 446–451.

188. Lõoke, M. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications / M. Lõoke, K. Kristjuhan, A.Kristjuhan // BioTechniques. – 2011. – V. 50. – P. 325-328.

189. Louw, C. Epigenetic regulation of *PGU1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae* / C.Louw, P.R.Young, P.Rensburg, B. Divol // FEMS Yeast Res. – 2010. –

V. 10. – P.158–167.

190. Louw, C. Regulation of endo-polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* / C. Louw, P.R. Young, P. Rensburg, B. Divol // FEMS Yeast Res. – 2010. – V. 10. – P. 44-57.

191. Marais, J. Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines / J. Marais, H. Pool // Vitis. – 1980. – P. 151-164.

192. Marais, J. Etudes de l'arome de certainesvarietes de "Vitis vinifera" / J. Marais, J. Maynar, I. Mareca // Rev. Franc. oenol. – 1982. – № 88. – P. 55-60.

193. Martiniere, P. Utilisation d'une preparation enzymatique pectolytique en vinitication / P. Martiniere, J.C. Sapis, G. Guimberteau, J. Ribereau-Gayon // Compte Rendu de l'Academied'Agriculture de France. – 1973. – V. 59. – P. 267-273.

194. Masneuf-Pomarède, I. Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains / I. Masneuf-Pomarède, M. Belly, P. Marullo, A. Lonvaud-Funel, D. Dubourdieu // Int. J. Food Microbiol. – 2010. – V. 139. – P. 79-86.

195. Mateo, J. Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts / J. Mateo, R. Di Stefano // Food Microbiol. – 1997. – V. 14. – № 6. – P. 583-591.

196. Mateo, J.J. Monoterpenes in grape juice and wines / J.J. Mateo, M. Jiménez // J. Chromatogr. A. – 2000. – V. 881. – P. 557–567.

197. McGarvey, D.J. Terpenoid metabolism / D.J. McGarvey, R. Croteau // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 1015–1026.

198. Merín, M.G. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape / M.G.Merín, M.C.Martin, K.Rantsiou, L.Cocolin, V.I. Morata de Ambrosini // Braz. J. Microbiol. – 2015. – V. 46. – № 3. – P. 815-823.

199. Merín, M.G. Pectinolytic yeasts from viticultural and enological environments: novel finding of *Filobasidiumcapsuligenum* producing pectinases / M.G.Merín, L.M.Mendoza, V.I. Morata de Ambrosini // J. Basic Microbiol. – 2014. – V. 54. – № 8. – P. 835-842.

200. Miklosy, E. Yeasts with β -D-glucosidase activity: Properties and possible

application in winemaking processes / E. Miklosy, V. Pölös // *Acta Alimentaria*. – 1995. – V. 24. – № 2. – P. 167-179.

201. Muir, A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces* / A. Muir, E. Harrison, A. Wheals // *FEMS Yeast Res.* – 2011. – V. 11. – P. 552–563.

202. Nakamura, M. Comparison of endo-polygalacturonase activities of citrus and non-citrus races of *Geotrichum candidum*, and cloning and expression of the corresponding genes / M. Nakamura, D.N. Suprpta, H. Iwai, K. Arai // *Mol. Plant. Pathol.* – 2001. – V. 2. – № 5. – P. 265–274.

203. Naseeb, S. *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur* / S.Naseeb, S.A.James, H.Alsammar, C.J.Michaels, B.Gini, C.Nueno-Palop, C.J.Bond, H.McGhie, I.N.Roverts, D.Delneri // *Int. J. Syst. Evol.* – 2017. – V. 67. – №. 6. – P. 2046-2052.

204. Naseeb, S. Whole genome sequencing, de novo assembly and phenotypic profiling for the new budding yeast species *Saccharomyces jurei* / S.Naseeb, H. Alsammar, T. Burgis, I. Donaldson, N. Knyazev, C. Knight, D. Delneri // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2018. – V. 8. – №. 9. – P. 2967-2977.

205. Naumov, G.I. Differentiation of European and Far East Asian populations of *Saccharomyces paradoxus* by allozyme analysis / G.I.Naumov, E.S.Naumova, P.D. Sniegowski // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1997. – V. 47. – P. 341–344.

206. Naumov, G.I. Genetic reidentification of the pectinolytic yeast strain SCPP as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* / G.I.Naumov, E.S. Naumova, M. Aigle, I. Masneuf, A. Belarbi // *App. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V. 55. – P. 108–111.

207. Naumov, G.I., Taxonomy, ecology, and genetics of the yeast *Saccharomyces bayanus*: a new object for science and practice / G.I. Naumov, E.S. Naumova, N.N. Martynenko, I. Masneuf-Pomarède // *Microbiology*. – 2011. – V. 80. – № 6. – P. 735-742.

208. Naumov, G.I. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* /

G.I.Naumov, S.A.James, E.S.Naumova, E.J.Louis, I.N.Roberts // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – V. 50. – P. 1931–1942.

209. Noble, A.C. Wine head space analysis. Reproducibility and application to varietal classification / A.C.Noble, R.A.Flath, R.R. Forrey // J. Agric. Food Chem. – 1980. – V. 28. – P. 346-353.

210. Oswald, M. Monoterpenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* / M. Oswald, M.Fischer, N. Dirninger, F. Karst // FEMS Yeast Res. – 2007. – V. 7. – P. 413–421.

211. Oumer, J.O. Comparative studies of pectinase production by *Bacillus subtilis* strain *Btk 27* in submerged and solid-state fermentations / J.O. Oumer, D. Abate // Biomed. Res. Int. – 2018. – V. 2018. – Article ID 1514795. – 10 p.

212. Park, S.K. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes as a function of fermentation, wine aging, and enzyme treatment / S.K.Park // Food Sci. Biotechnol. – 1996. – V. 5. – №. 4. – P. 280-286.

213. Pedersen, D.S. Quantitative analysis of geraniol, nerol, linalool, and α -terpineol in wine / D.S.Pedersen, D.L.Capone, G.K.Skouroumounis, A.P.Pollnitz, M.A. Sefton // Anal. Bioanal. Chem. – 2003. – V. 375. – №. 4. – P. 517-522.

214. Peinado, R.A. Changes in volatile compounds and aromatic series in sherry wine with high gluconic acid levels subjected to aging by submerged flor yeast cultures / R.A. Peinado, J. Moreno, M. Medina, J.C. Mauricio // Biotechnol. Lett. – 2004. – V. 26. – P. 757-762.

215. Pham, T. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery ‘wild’ yeast contaminants / T. Pham, T. Wimalasena, W.G. Box, K. Koivuranta, E.Storgårds, K.A. Smart, B.R. Gibson // J. Inst. Brew. – 2011. – V. 117. – №. 4. – P. 556–568.

216. Radoi, F. Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production / F.Radoi, M.Kishida, H.Kawasaki // FEMS Yeast Res. – 2005, – V. 5. – P. 663–668.

217. Rapp A. Neue monoterpendiole in trauben mosten und weinen und ihre bedeutungfür die genese einiger cyclischer monoterpenathe / Rapp A., Mandery H.,

Ullemeyer H. // *Vitis*. – 1984. – V. 23. – № 2. – S. 84-92.

218. Rapp, A. Aromastoffe des weines / A. Rapp // *Chem. Zeit.* – 1992. – № 6. – S. 273-284.

219. Rapp, A. Natural flavors of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception / A. Rapp // *Fresenius anal. Chem.* – 1990. – V. 337. – № 7. – P. 777-785.

220. Rapp, A. New progress in vine and wine research wine aroma / A. Rapp, H. Mandery // *Experienta.* – 1986. – V. 42. – P. 873-884.

221. Reddy, L.V.A. Effect of enzymatic maceration on synthesis of higher alcohols during mango wine fermentation / L.V.A. Reddy, O.V.S. Reddy // *J. Food Quality.* – 2009. – V. 32. – № 1. – P. 34-47.

222. Riberau-Gayon, P. Le débourage des moûts de vendange blanche / P. Riberau-Gayon, S. Lafon-Lafoucarde, A. Bertrand // *J. Int. Sci. Vigne du Vin* – 1975. – V. 9. – № 2. – P. 117-139.

223. Ribéreau-Gayon, P. Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications. Vol. 1, 2d edn / P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud. – Maiden, MA: Wiley, 2006. – 497 p.

224. Rodríguez-Bencomo, J.J. Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography / J.J. Rodríguez-Bencomo, J.E. Conde, M.A. Rodríguez-Delgado, F. García-Montelongo, J.P. Pérez-Trujillo // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – V. 963. – № 1. – P. 213-223.

225. Rojas, V.. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations / V. Rojas, J.V. Gil, F. Piñaga, P. Manzanares // *Int. J. Food Microbiol.* – 2003. – V. 86. – № 1-2. – P.181-188.

226. Romano, P. Function of yeast species and strains in wine flavour / P. Romano, C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso, A. Capece // *Int. J. Food Microbiol.* – 2003. – V. 86. – № 1-2. – P. 169-180.

227. Rosi, I. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin / I. Rosi, M. Vinella, P. Domizio // *J. App. Microbiol.* – 1994. – V. 77. – № 5. – P. 519-527.

228. Sadoudi, M. Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts / M. Sadoudi, R. Tourdot-Maréchal, S. Rousseaux, D. Steyerd, J.-J. Gallardo-Chacón, J. Ballester, S. Vichi, R. Guérin-Schneider, J. Caixach, H. Alexandre // *Food Microbiol.* – 2012. – V. 32. – № 2. – P. 243-253.

229. Saerens, S.M. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae* / S.M.G. Saerens, F.R. Delvaux, K.J. Verstrepen, J.M. Thevelein // *Microbial Biotechnol.* – 2010. – V. 3. – № 2. – P. 165-177.

230. Schireier, P. Flavor composition of wines: A review / P. Schireier, W.G. Jennings // *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* – 1979. – V.12. – № 1. – P. 59-111.

231. Schopfer, J.F. Bourbes et débourage des moûts dans la vinification en blanc. // *Vitic. Arboric. Hortic.* – 1969. – № 1. – P. 102–109.

232. Schwan, R.F. Endo-polygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts / R.F. Schwan, R.M. Cooper, A.E. Wheals // *Enzyme and Microbial Technology.* – 1997. – № 21. – P. 234-244.

233. Schwan, R.F., Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition / R.F. Schwan, A.H. Rose // *J. App. Bacteriol.* – 1994. – V. 76. – P. 62-64.

234. Sedláčková, B. Analysis of volatile compounds in various wines / B. Sedláčková, Ľ. Kakalicová, E. Matisová, P. Farkaš, A. Doboš // *An. Methods Instr.* – 1995. – V. 2. – № 2. – P. 106–108.

235. Serrat, M. Influence of nutritional and environmental factors on ethanol and endopolygalacturonase co-production by *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 / M. Serrat, O. Rodríguez, M. Camacho, J.A. Vallejo, J.M. Ageitos, T.G. Villa // *Int. Microbiol.* – 2011. – V. 14. – №. 1. – P. 41-49.

236. Serrat, M. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater / M. Serrat, R.C. Bermúdez, T.G. Villa // *App. Biochem. Biotechnol.* – 2002. – V. 97. – P. 193-208.

237. Shimizu, J. Identification of volatiles in grape musts and characteristic terpenoid constituents / J. Shimizu // *Agr.Biol.Chem.* – 1982. – V. 46. – № 9. – P. 2265-2275.
238. Sieiro, C. Cloning, characterization, and functional analysis of the *EPG1-2* gene: a new allele coding for an endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*/ C. Sieiro, A.B.F. Sestelo, T.G. Villa // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – V. 57. – №. 19. – P. 8921-8926.
239. Šiekštelė, R. Cloning, targeted disruption and heterologous expression of the *Kluyveromyces marxianus* endopolygalacturonase gene (*EPG1*) / R. Šiekštelė, D. Bartkevičiūtė, K. Sasnauskas // *Yeast.* – 1999. – V. 15. – P. 311–322.
240. Smith, M.E. Sources of volatile sulfur compounds in wines / M.E. Smith, M.Z. Bekker, P.A. Smith, E.N. Wilkes // *Austr. J. Grape Wine Res.* – 2015. – V. 21. – P. 705-712.
241. Spiropoulos, A. Characterization of hydrogen sulfide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*/ A. Spiropoulos, J. Tanaka, I. Flerianos, L.F. Bisson // *Am. J. Enol. Vitic.* – 2000. – V. 51. – P. 233–248.
242. Strobe, P.K. The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen / P.K. Strobe, D.A. Skelly, S.G. Kozmin, G. Mahadevan, E.A. Stone, P.M. Magwene, F.S. Dietrich, J.H. McCusker // *Genome Res.* – 2015. – V. 25. – P. 762–774.
243. Styger, G. Wine flavor and aroma / G. Styger, B. Prior, F.F. Bauer // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 38. – № 9. – P. 1145–1159.
244. Sumby, K.M. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects / K.M. Sumby, P.R. Grbin, V. Jiranek // *Food Chem.* – 2010. – V. 121. – № 1. – P. 1-16.
245. Swiegers, J.H. Yeast modulation of wine flavor / J.H. Swiegers, I.S. Pretorius // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2005. – V. 57. – P. 131-175.
246. Swiegers, J.H. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine / J.H. Swiegers, R.L. Kievit, T. Siebert, K.A. Lattey, B.R. Bramley, I.L. Francis, E.S. King, I.S. Pretorius // *Food Microbiol.* – 2009. – V. 26. – P. 204–211.

247. Talarek, N. Developing methods and strains for genetic studies in the *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* species / N. Talarek, E.J. Louis, C. Cullin, M. Aigle // Yeast. – 2004. – V. 21. – P. 1195–1203.
248. Tamura, K. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 / K. Tamura, D. Peterson, G. Stecher, A. Filipski, S. Kumar // Mol. Biol. Evol. – 2013. – V. 30. – P. 2725–2729.
249. Tate D. Validation of a rapid method for measuring β -glucosidase activity in fermenting muscat grape musts / D. Tate, G.A. Reynolds // Am. J. Enol. Vitic. – 2006. – V.57. – P. 60–68.
250. Tate, D. Validation of a rapid method for measuring β -glucosidase activity in fermenting muscat grape musts / D. Tate, G.A. Reynolds // Am. J. Enol. Vitic. – 2006. – V. 57. – P. 60-68.
251. Torija, M.A.J. Effect of the nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* / M.A.J. Torija, G.Beltran, M. Novo, M. Poblet, N. Rozès, J.M. Guillamón, A. Mas //. Food Microbiol. – 2003. – V. 20. – № 2. – P. 255-258.
252. Torrea, D. Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast / D. Torrea, C. Varela, M. Ugliano, C. Ancin-Azpilicueta, I.L. Francis, P.A. Henschke // Food Chem. – 2011. – V. 127. – № 3. – P.1072–1083.
253. Ugliano, M. Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains / M. Ugliano, E.J. Bartowsky, J. McCarthy, L. Moio, P.A. Henschke // J. Agric. FoodChem. – 2006. – V.54 – P. 6322–6331.
254. Urlaub, R. Wirkungsspezifisch und gut steuerbar: enzyme in der Weinbereitung / R. Urlaub // Ernährungsindustrie. – 1992. – № 3. – S. 6-10.
255. Ussedlio-Tomasset, L. Osservazioni sui costituenti terpenici delle Uve e dei vini aromatici / L. Ussedlio-Tomasset, R. Di Stefano // Vignevini. – 1979. – V. 6. – № 10. – P.33-38.
256. Usseglio-Tomasset, L. Travaux surlescolloides des vins en relation avec les

problèmes de la lipidite / L. Usseglio-Tomasset // Ann. Techn. Agric. – 1963. – V. 12. – № 1. – P. 195-198.

257. Van Rensburg, P. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations – a review / P. Van Rensburg, I.S. Pretorius // S Afr J Enol Viticulture. – 2000. – V. 21. – P. 52–73.

258. Vanrell G. Influence du type de clarification du vin de base et des adjuvants de tirage sur la qualité de la mousse des vins effervescent / G. Vanrell, M. Esteruelas, J.-M. Canals, F. Zamora, P. Poinssaut, N. Sieczkowski, D. Leboeuf // Rev. Fr. Oenol. – 2005. – № 114. – P. 28-30.

259. Vaughan-Martini A., Martini A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870) / The Yeast, a Taxonomic Study, 5th ed. – eds. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout // Amsterdam: Elsevier, 2011. – V. 2. – P. 471-481.

260. Vega-Palas, M.A. Telomeric silencing of a natural subtelomeric gene / M.A. Vega-Palas, E. Martin-Figueroa, F.J. Florencio // Mol. Gen. Genet. – 2000. – V. 263. – P. 287–291.

261. Veiga-Crespo, P. Ancient genes of *Saccharomyces cerevisiae* / P. Veiga-Crespo, M. Poza, M. Prieto-Alcedo, T.G. Villa // Microbiology. – 2004. – V. 150. – P. 2221–2227.

262. Vidrih, R. Synthesis of higher alcohols during cider processing / R. Vidrih, J. Hribar // Food Chemistry. – 1999. – V. 67. – № 3. – P. 287-294.

263. Vietoris, V. Relations between must clarification and organoleptic attributes of wine varieties / V. Vietoris, P. Czako, A. Mendelová, Z. Remeňová, M. Závracký // Potravinárstvo. – 2014. – V. 8. – № 1. – P. 155-160.

264. Vilanova, M. Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño / M. Vilanova, T.E. Siebert, C. Varela, I.S. Pretorius, P.A. Henschke // Food Chem. – 2012. – V. 133. – № 1. – P. 124-131.

265. Vivier, D. Study of physicochemical factors limiting the growth of *Kluyveromyces marxianus* / D. Vivier, R. Ratomahenina, G. Moulin, P. Galzy // J. Ind. Microbiol. – 1993. – V. 11. – P. 157–161.

266. Volynkin, V. Caucasus and northern black sea region ampelography / V. Volynkin, A. Polulyakh, A. Chizhova, N. Roshka // *Lingenfield*. – 2012. – P. 405-473.

267. Wackerbauer, K. Die Bedeutung der freien Fettsäuren und Fettsäure-Methylester während der Gärung und Lagerung / K. Wackerbauer, G. Bender // *Eine Literaturübersicht*. – 1983. – V. 36. – №. 4. – S. 152-158.

268. Wang, H. Characterization of osmotolerant yeasts and yeast-like molds from apple orchards and apple juice processing plants in China and investigation of their spoilage potential / H. Wang, Z. Hu, F. Long, C. Niu, Y. Yuan, T. Yue // *J. Food Sci.* – 2015. – V. 80. – №. 8. – P. 1850-1860.

269. Wang, S.A. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark / S.A. Wang, F.Y. Bai // *Int. J. Syst. Evol.* – 2008. – V. 58. – №. 2. – P. 510-514.

270. Williams, A.A. Recent development in the field of wine flavor research / A.A. Williams // *J. Inst. Brew.* – 1982. – V. 88. – №. 1. – P. 43-53.

271. Williams, P. Recent studies into grape terpen glycosides / P. Williams, C. Strauss, B. Wilson, E. Dimitriadis // *Progr. 4 weurmanflavour res. Symp.* – Amsterdam. – 1985. – P. 349-357.

272. Wilson, B. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes / B. Wilson, C.R. Strauss, P.J. Williams // *J. Agric. Food Chem.* – 1984. – V. 32. – P. 919-924.

273. Wimborne, M.P. Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* cultured in controlled environments / M.P. Wimborne, P.A.D. Rickard // *Biotech. Bioeng.* – 1978. – V. 20. – №. 2. – P. 231-242.

274. Yadav, J.S.S. Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus* / J.S.S. Yadav, J. Bezawada, S. Elharche, S. Yan, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2014. – V. 37. – P. 1017–1029.

275. Yano, C.F. Evolutionary dynamics of multigene families in *Triportheus* (*Characiformes*, *Triportheidae*): A transposon mediated mechanism? / C.F. Yano,

M.A. Merlo, S. Portela-Bens, M.B. Cioffi, L.A.C. Bertollo, C.D. Santos-Júnior, L. Rebordinos // *Front. Mar. Sci.* – 2020. – V. 7. – Art. 6. – P. 1-12.

276. Zamuz, S. Aromatic diversity of *Vitis vinifera* cv. Albarico quantification of aromatic potential / S. Zamuz, R. Diaz, M. Vilanova // *J. Int. Vigne. Vin.* – 2006. – V. 40. – P. 197-202.

277. Zamuz, S. Volatile composition of the *Vitis vinifera* Albarico musts according to geographic areas from Rias Baixas D.O. (Spain) / S. Zamuz, M. Vilanova // *Ital. J. Food Sci.* – 2006. – V. 18. – P. 323-327.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Таблица А.1 – Происхождение изучаемых штаммов дрожжей рода *Saccharomyces*

Штамм	Источник и место выделения	Код в GenBank, ссылка
1	2	3
<i>S. arboricola</i>		
H-6	Кора дуба <i>Quercus fabri</i>	CM001572
<i>S. bayanus</i> var. <i>uvarum</i>		
SCPP (CLIB2025)	Шампанские дрожжи, Франция	[162]
MCYC 623 (CBS7001)	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания	AACA01000043, AACA000682, AACA000194
CLIB 113	Виноград, Италия	FR847038
CBS 395	Сок <i>Ribes nigrum</i> , Нидерланды	FR847037
<i>S. cariocanus</i>		
UFRJ50791, UFRJ50816	<i>Drosophila</i> sp., Бразилия	Sanger Institute
<i>S. cerevisiae</i>		
S288c	Генетическая линия	BK006943
SK1	Генетическая линия	JRIH01000251
W303	Генетическая линия	LIUU01000034
FL100 (ATCC 28383)	Генетическая линия	JRIT01000192
EC1118	Винный штамм	FN393076
EDRL (<i>S. boulardii</i>)	Неизвестны	ATCS01000073
BC187	Виноделие, США	JRII01000238
Kyokai 7	Саке, Япония	BABQ01000107
Y9	Дагусса (<i>Eleusine coracana</i>), Индонезия	Sanger Institute
YJM248	Клинический изолят	CP005139
YJM269	Виноград, Португалия	AEWN01000864
YJM789	Клинический изолят	AAFW02000040
YJM978	Клинический изолят, Италия	CP005104
YJM981	Клинический изолят, Италия	CP005105
YJM975	Клинический изолят, Италия	CP005103
YJM1078	Клинический изолят, Португалия	CP004108
YJM1252	Альпехин, Испания	CP006072
DBVPG1106	Виноград, Австралия	Sanger Institute
DBVPG1373	Почва, Нидерланды	Sanger Institute
DBVPG1788	Почва, Финляндия	Sanger Institute
DBVPG1853	Белый теф, Эфиопия	Sanger Institute
DBVPG6040	Ферментированный сок, Нидерланды	Sanger Institute
DBVPG6044	Вино из <i>Osbeckia grandiflora</i> , Западная Африка	Sanger Institute
DBVPG6765	Неизвестны	Sanger Institute
UWO(PS)05-217.3	Пальма Бертрана, Малайзия	JRIM01000380
UWO(PS)03-461.4	Пальма Бертрана, Малайзия	Sanger Institute
UWO(PS)87-2421	Кактус <i>O. megacantha</i> , Гавай	Sanger Institute
Y12	Пальмовое вино, Берег слоновой кости	Sanger Institute

Продолжение таблицы А.1

1	2	3
Y55	Виноград, Франция	Sanger Institute
NY1308	Почва, Китай	ASJZ01000006
YS2	Пекарские дрожжи, Австралия	Sanger Institute
YS4	Пекарские дрожжи, Нидерланды	Sanger Institute
YS9	Пекарские дрожжи, Сингапур	Sanger Institute
ZTW1	Кукурузный затор, Китай	AMDD01000021
K11	Саке, Япония	JRIJ01000069
RM11-1A	Неизвестны	JRIP01000009
NAM34-4C	Неизвестны	BAUH01000022
NCYC110	Имбирное пиво из <i>Z. officinale</i> , Западная Африка	Sanger Institute
NCYC361	Пивной затор, Ирландия	Sanger Institute
FostersO	Производство эля	AEEZ01000057
FostersB	Производство эля	AEHH01000043
T7	Сокотечение дуба <i>Q. rubra</i> , США	AFDE01000120
UCLM-39	Виноделие, Испания	KJ513092
AWRI796	Винный штамм	ADVS01000034
UWO(PS)05-227.2	<i>Trigona</i> sp. у пальмы Бетрана, Малайзия	Sanger Institute
UWO(PS)83-787.3	Кактус <i>Opuntiastrica</i> , Багамские о-ва	Sanger Institute
<i>S. paradoxus</i>		
RO88	Винные дрожжи, Хорватия	HQ680400
Q31.4, Q32.3, Q62.5, Q69.8, Q74.4, Q89.8, Q95.3	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Виндзорский парк, Англия	Sanger Institute
S36.7, T21.4, W7, Y6.5, Y7, Y8.1, Y8.5, Y9.6, Z1, Z1.1	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Силвудпарк, Англия	Sanger Institute
A4	Кора дуба <i>Q. rubra</i> , Канада	Sanger Institute
A12	Почва у дуба <i>Q. rubra</i> , Канада	Sanger Institute
YPS138	Почва у дуба <i>Q. velutina</i> , США	Sanger Institute
CBS432	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Россия	Sanger Institute
CBS5829	Лесная почва, Дания	Sanger Institute
IFO1804	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Япония	Sanger Institute
UWO(PS)91-917.1	Сокотечение <i>Myoporum sandwichense</i> , Гавайи, США	Sanger Institute
DBVPG4650	Окаменелое гуано, Италия	Sanger Institute
DBVPG6304	<i>Drosophila pseudoobscura</i> , США	Sanger Institute
KBP3828, KBP3829	Кора дуба <i>Q. robur</i> , Новосибирск, Россия	Sanger Institute
N17 (NBRC102006)	Сокотечение дуба <i>Q. robur</i> , Татарстан, Россия	Sanger Institute
322134S, 378604X, 273614N	Клинические изоляты, Англия	Sanger Institute
VL3	Винный штамм	AEJS01000043
PW5	Пальмовое вино, Нигерия	AFDC01001101
CBS7960	Сироп из тростника, Бразилия	AEWL01001135

Продолжение таблицы А.1

1	2	3
CLIB324	Пекарские дрожжи, Вьетнам	AEWM01002611
L-1374	Виноделие	Sanger Institute
L-1528	Виноделие	Sanger Institute
CLIB382	Пекарские дрожжи, Ирландия	AFDG01002665
YIIc17_E5	Вино, Франция	Sanger Institute
Lalvin QA23	Винный штамм	ADV01000055
YPS128	Почва у дуба <i>Q. alba</i> , США	JRID01000110
YPS163	Дуб <i>Quercus</i> sp., США	JRIC01000372
YPS606	Дуб <i>Quercus</i> sp., США	Sanger Institute
M3707	Спиртовые дрожжи	AMQB01000055
VIN13	Винный штамм	ADXC01000048
N43 (CBS8437), N44 (CBS8438), N45 (CBS8439)	Сокотечение <i>Q. mongolica</i> , Дальний восток, Россия	Sanger Institute
<i>S. kudriavzevii</i>		
IFO 1802	Гниющие листья, Япония	JH797534
IFO 1803	Почва, Япония	AJIG01006137
ZP591	Дуб <i>Q. pyrenaica</i> , Португалия	AJIN01002237
FM1056	Дуб <i>Q. faginea</i> , Португалия	CM001572
<i>S. mikatae</i>		
IFO 1815	Почва, Япония	AABZ01000345
<i>S. pastorianus</i>		
NRRL Y-1551	Пиво, Дания	FR847040
Weihenstephan 34/70	Пиво, Германия	ABPO01000141, ABPO01000470
CCY48-91	Неизвестны	ALJS01000172
<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i>		
VIN7	Винные дрожжи	AGVY01000037, AGVY01000284

Приложение Б

Таблица Б.1 – Характеристика штаммов дрожжей отобранных для исследования

№ п/п	Номер штамма	Название штамма	Описание в литературе
1	2	3	4
<i>Saccharomyces</i>			
1	I-5	Крымские 1	использовался в работе Сониной Е.Г. [97]
2	I-6	Киллер Y-23	использовался в работе Сониной Е.Г. [97]
3	I-38	Килер Т-3	использовался в работе Сониной Е.Г. [97]
4	I-279	Кокур 3	использовался в работе Сониной Е.Г. [97]
5	I-300	Новоцимлянская 3	использовался в работе Мунгиевой [46]
6	I-324	Scharlachberg 1	использовался в работе Мунгиевой [46]
7	I-421	Ужгород 231-1	использовался в работе Сониной Е.Г. [97]
8	I-438	Берегово 2-10	использовался в работе Сониной Е.Г. [97]
9	I-472	Штамм 26 (К-26)	принадлежит к виду <i>S. uvarum</i>
10	I-478	Штамм 80	принадлежит к виду <i>S. uvarum</i>
11	I-490	Штамм 19-1	использовался в работе Сониной Е.Г. [97]
12	II-206	Штамм 26 (К-26)	принадлежит к виду <i>S. uvarum</i>
13	II-207	Штамм ИНМИ АН СССР	принадлежит к виду <i>S. uvarum</i>
14	III-198	Штамм ВКМ Y-502	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
15	III-199	Штамм ВКМ Y -1702	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
16	III-200	Штамм ВКМ- Y -1147	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
17	III-201	Штамм ВКМ- Y -481	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
18	III-202	Штамм ВКМ- Y -483	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
19	III-203	Штамм ВКМ- Y -522	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4
20	III-204	Новоцимлянская 3	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
21	III-205	Шарлахберг 1	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
22	III-206	Штамм 26 (К-26)	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
23	III-208	Раса 51	принадлежит к виду <i>S. uvarum</i>
24	III-209	Штамм К-26	принадлежит к виду <i>S. uvarum</i>
25	III-237	Кокур 3	использовался в работе Сониной Е.Г. [97]
26	III-238	Б-25	мутант штамма III-237
27	III-239	Б-27	мутант штамма III-237
28	III-240	Б-28	мутант штамма III-237
29	III-241	Б-31	мутант штамма III-237
30	III-242	Б-34	мутант штамма III-237
<i>Kluyveromyces</i>			
31	I-449	Раса 163-3	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
32	I-450	Раса 163-6	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
33	I-451	Раса 163-10	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
34	II-52	Штамм Ко-II-1	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
35	II-53	Штамм Ко-II-5	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
36	II-54	Штамм Ко-I-2	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
37	III-68	Штамм ВКМ-У-126	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
38	III-69	Штамм ВКМ- У -429	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
39	III-70	Штамм ВКМ- У -431	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4
40	III-71	Штамм ВКМ- Y -1335	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
41	III-72	Штамм ИБФМ- Y - 577	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
42	III-73	Штамм 54	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
43	III-74	Штамм ВКМ- Y -480	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
44	III-75	Штамм ВКМ- Y -486	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
45	III-76	Штамм ВКМ- Y -1187	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
46	III-355	Штамм 830	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
47	III-356	Штамм 831	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
48	III-357	Штамм 834	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
49	III-358	Штамм ИБФМ-609	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
50	III-359	Штамм ВСБ-619	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
51	III-360	Штамм 848	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
52	III-361	Штамм 848-2	мутант штамма III-360
53	III-362	Штамм 848-3	мутант штамма III-360
54	III-363	Штамм 848-10	мутант штамма III-360
55	III-364	Штамм ВКМ Y-832	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
56	III-365	Штамм ВКМ Y-859	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]

Продолжение таблицы Б.1

1	2	3	4
57	III-366	Штамм ВКМ Y -861	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
58	III-367	Штамм ВКМ Y -865.	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
59	III-368	Штамм ВКМ Y -866	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
60	III-369	Штамм ВКМ Y -897.	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
61	III-370	Штамм 734 D	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
62	III-371	Штамм 30 D	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
63	III-373	Раса 163-3	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
64	III-374	Раса 163-6	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
65	III-375	Раса 163-10	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]
66	III-376	Штамм Туркменский 1983	рекомендуется для поиска культуры с целью определения полигалактуроназы [52]

Таблица Б.2 – Эндополигалактуроназная активность коллекционных штаммов дрожжей

№ п/п	Коллекционный номер	Название штамма	Вид	Активность фермента, ед.	Примечание
1	2	3	4	5	6
1	I-5	Крымская 1	<i>S. bayanus</i> var. <i>uvorum</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	0,8	
2	I-324	Шарлахберг 1	<i>S. bayanus</i> var. <i>uvorum</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	1,1	
3	I-421	Ужгород 231-1	<i>S. oviformis</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	1,9	Активность фермента 0,7 ед. [97]
4	I-438	Берегово 2-10	<i>S. vini</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	0,6	Активность фермента 0,6 ед. [97]
5	I-472	Штамм 26	<i>S. bayanus</i> var. <i>uvorum</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	0,9	
6	III-199	Штамм ВКМ Y-1702	<i>S. paradoxus</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	4,5	
7	III-200	Штамм ВКМ Y-1147	<i>S. paradoxus</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	4,0	
8	III-201	Штамм ВКМУ-481	<i>S. paradoxus</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	4,6	
9	III-202	Штамм ВКМ Y-483	<i>S. paradoxus</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	0,6	
10	III-203	Штамм ВКМУ-522	<i>S. paradoxus</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	64,0	
11	III-204	Новоцимлянская 3	<i>S. bayanus</i> var. <i>uvorum</i> ^{1,2,3}	128,0	
12	III-205	Шарлахберг 1	<i>S. bayanus</i> var. <i>uvorum</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	1,2	
13	III-206	Штамм 26	<i>S. bayanus</i> var. <i>uvorum</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	1,3	

Продолжение таблицы Б.2

1	2	3	4	5	6
14	III-238	Б-25	<i>S. vini</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	2,1	
15	III-239	Б-27	<i>S. vini</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	2,1	
16	III-240	Б-28	<i>S. vini</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	4,0	активность фермента 40-67 ед [52, 97]
17	III-241	Б-31	<i>S. vini</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	5,3	
18	III-242	Б-34	<i>S. vini</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	3,2	
19	III-68	Штамм ВКМ Y-126	<i>Fabosporafragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1066,7	
20	III-69	Штамм ВКМ Y-429	<i>F. fragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	800,0	
21	III-70	Штамм ВКМ Y-431	<i>F. fragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	581,8	
22	III-71	Штамм ВКМ Y-1335	<i>F. fragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	627,5	
23	III-72	Штамм ИБФМ-577	<i>F. fragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	492,3	
24	III-73	Штамм 54	<i>F. fragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	278,3	
25	III-74	Штамм ВКМ Y-480	<i>F. fragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1673,3	
26	III-75	Штамм ВКМ Y-486	<i>F. fragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1163,6	
27	III-76	Штамм ВКМ Y-1187	<i>F. fragilis Jörgensen</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1422,2	

Продолжение таблицы Б.2

1	2	3	4	5	6
28	III-198	Штамм ВКМ У-502	<i>S. paradoxus</i> ¹ , <i>S. cerevisiae</i> ²	6,4	
29	III-358	Штамм ИБФМ-609	<i>Zygofabospora marxiana</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1306,1	
30	III-359	Штамм ВСБ-619	<i>Z. marxiana</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1280,0	
31	III-360	Штамм 848	<i>Z. marxiana</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1422,2	
32	III-361	Штамм 848-2	<i>Z. marxiana</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1438,2	
33	III-362	Штамм 848-3	<i>Z. marxiana</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1454,6	
34	III-363	Штамм 848-10	<i>Z. marxiana</i> ¹ , <i>K. marxianus</i> ²	1391,3	

Примечания. Систематика дрожжей согласно классификации: 1. Кудрявцев В.И. [54]. 2. Kreger-van Rij N.J.W. [180]. 3. Kurtzman С.Р. [259].

Приложение В

Таблица В.1 – Однофакторный дисперсионный анализ эндополигалактуроназной активности штаммов *Kluyveromyces*

		Сумма квадратов	ст.св	Средний квадрат	F	Значимость
pH3.0	Между группами	9034,865	9	1003,874	140,671	0,000
	Внутри групп	142,727	20	7,136		
	Всего	9177,592	29			
pH3.5	Между группами	10514,443	9	1168,271	287,516	0,000
	Внутри групп	81,267	20	4,063		
	Всего	10595,710	29			
pH5.0	Между группами	1839,687	9	204,410	10,802	0,000
	Внутри групп	378,460	20	18,923		
	Всего	2218,147	29			

Таблица В.2 – Апостериорные множественные сравнения
эндополигалактуроназной активности штаммов *Kluyveromyces* при pH 3,0

Номер штамма	Значимые группы при $p = 0.05$				
	1	2	3	4	5
III-358-15	368,400				
III-358-24	371,900	371,900			
III-358-75		377,600	377,600		
III-358-17			380,500		
III-358-77				401,500	
III-358-51				402,133	
III-358-78				408,567	408,567
III-358-90					410,833
III-358-60					413,300
III-358-35					414,867
Значимость	0,831	0,273	0,935	0,091	0,173

Таблица В.3 – Апостериорные множественные сравнения
эндополигалактуроназной активности штаммов *Kluyveromyces* при pH 3,5

Номер штамма	Значимые группы при $p = 0.05$					
	1	2	3	4	5	6
III-358-78	572,533					
III-358-75	573,333					
III-358-24		580,967				
III-358-15		586,733				
III-358-77			593,067			
III-358-17			595,433			
III-358-35			597,667			
III-358-90				611,233		
III-358-51					623,233	
III-358-60						629,833
Значимость	1,000	0,054	0,203	1,000	1,000	1,000

Таблица В.4 – Апостериорные множественные сравнения
эндополигалактуроназной активности штаммов *Kluyveromyces* при pH 3,5

Номер штамма	Значимые группы при $p = 0.05$		
	1	2	3
III-358-24	1498,833		
III-358-75	1500,400		
III-358-35	1502,300		
III-358-90	1504,933		
III-358-51	1505,600		
III-358-778	1506,367		
III-358-78	1508,533	1508,533	
III-358-17	1510,467	1510,467	
III-358-15		1520,867	1520,867
III-358-60			1523,800
Значимость	0,085	0,057	0,997

Приложение Г

Свидетельство о первичном депонировании и паспорт штамма № III-407

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Всероссийский национальный научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН»
(ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»)
Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»)

УТВЕРЖДАЮ



Врио-директора ФГБУН «ВНИИВиВ
«Магарач» РАН», д-р с.-х. наук
В.В. Лиховской
2020 г.

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о первичном депонировании штамма микроорганизмов

Депозитарий: Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»)

Кому выдано: лаборатория микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»

Адрес: 298600, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31

Этим подтверждается, что штамм микроорганизма *Kluyveromyces marxianus* (Kreger-van Rij, 1984) принят на хранение в КМВ «Магарач».

Регистрационный номер, присвоенный штамму: III-407

Сопроводительная документация: паспорт штамма дрожжей *Kluyveromyces marxianus* (III-407) для первичного депонирования в коллекцию микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»)

Работа выполнена в рамках ГЗ № 0833-2019-0008

Дата 21.12.2020г.

Заведующая лабораторией
микробиологии

Танашук Т.Н.

Паспорт штамма № III-407

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Всероссийский национальный научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН»
(ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН)»**

Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»)

УТВЕРЖДАЮ



Врио директора ФГБУН «ВНИИВиВ
«Магарач» РАН», д-р с.-х. наук

В.В. Лиховской

02 декабря 2020 г.

ПАСПОРТ

штамма дрожжей *Kluyveromyces marxianus* III-407

1. Видовое название культуры: *Zygothrips marxiana* (Кудрявцев, 1954),
син. *K. marxianus* (Kreger-van Rij N.J.W., 1984; Kurtzman C.P., 2011).

2. Номер и наименование штамма: III-407 *Kluyveromyces marxianus*

3. Источник выделения штамма: отходы свекловичного производства

4. Способ получения штамма: селекционный; улучшающая селекция на
виноградном сусле штамма III-358

5. Кто и где идентифицировал штамм: лаборатория микробиологии
ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» (Шаламитский М.Ю.)

**6. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические
особенности штамма:** клетки эллипсоидальные, встречаются скопления по
2-3 клетки; размеры (2÷6) мкм в ширину и (5÷11) мкм в длину; размножение
– почкование; образует аски с 1-4 спорами сферической и эллипсоидальной
формы.

Особенности роста на жидких и плотных питательных средах:

- активно сбраживает сахара виноградного сусла, образует пылевидный осадок, образует кольцо в 30 суточной культуре;
- на агаризованном солодовом сусле образует средние колонии диаметром

1÷2 мм; округлые с ровным краем, выпуклые, светло-бежевые, встречаются с коричневым оттенком; маслянистая консистенция, матовые.

Сбраживает раффинозу, лактозу, сахарозу, глюкозу, не сбраживает мальтозу, трегалозу.

7. Область применения штамма: рекомендован для получения внеклеточной эндополигалактуроназы и применения на стадии обработки виноградного сусла из сортов винограда с высоким содержанием пектина для снижения вязкости и обеспечения лучшего осветления и выхода сусла

8. Продукт, который синтезируется штаммом: внеклеточная эндополигалактуроназа

9. Активность штамма (с указанием условий культивирования, другие промышленные показатели): при культивировании на разбавленном виноградном сусле до массовой концентрации сахаров 100 г/дм³ при температуре 30 °С синтезирует в питательную среду эндополигалактуроназу, максимальная активность которой достигает 1600 ед./мл (5 сутки). Устойчивый к pH 2,8; температуре 8 и 37 °С.

10. Способ, условия и состав среды для длительного хранения штамма: Хранение при минус 86 °С на среде YPD с 30 % глицерина. Хранение методом субкультивирования: среда – виноградное сусло с массовой концентрацией сахаров 200±20 г/дм³; температура хранения – (5÷8) °С; периодичность пересева – один раз в 9 месяцев.

11. Генетические особенности штамма: не изучались

12. Сведения о безопасности использования штамма: штамм не является генетически модифицированным. Штаммы данного вида разрешены к применению в пищевой промышленности согласно СанПиН 2.3.2.1078-01, QPS list (Qualified presumption of safety) European Food Safety Authority

13. Цель депонирования: в качестве активного продуцента внеклеточной эндополигалактуроназы

Заведующая лабораторией
микробиологии

 Танащук Т.Н.

Приложение Д

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВИНОГРАДАРСТВА
И ВИНОДЕЛИЯ «МАГАРАЧ» РАН»**

**СТАНДАРТ
ОРГАНИЗАЦИИ**

СТО 01586301.041-2022

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУН ВНИИВиВ
«Магарач» РАН» _____ В.В. Лиховской
04 апреля 2022 г.



КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ВИНОДЕЛИЯ «МАГАРАЧ»

**Метод получения ферментного препарата дрожжевой
эндополигалактуроназы при культивировании штамма
Kluyveromyces marxianus П1-407**

Ялта 2022

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения стандартов организации – ГОСТ Р 1.4-2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Стандарты организаций. Общие положения».

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН лабораторией микробиологии Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магarach» РАН» (ФГБУН «ВНИИВиВ «Магarach» РАН»)

2 ПРИНЯТ решением Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магarach» РАН» (ФГБУН «ВНИИВиВ «Магarach» РАН») от «31» 03 2022 г. Протокол № 3

3 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© ФГБУН «ВНИИВиВ «Магarach» РАН», 2022

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения ФГБУН «ВНИИВиВ «Магarach» РАН»

СОДЕРЖАНИЕ

1 Область применения.....	1
2 Нормативные ссылки.....	1
3 Сущность метода.....	3
4 Оборудование, средства измерений, посуда, материалы, реактивы.....	3
5 Условия проведения работ.....	4
6 Подготовка к проведению работ.....	4
7 Получение ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы..	5
8 Условия хранения.....	6
9 Требования безопасности.....	6
10 Требования к квалификации работника.....	6

СТАНДАРТ ОРГАНИЗАЦИИ

КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ВИНОДЕЛИЯ «МАГАРАЧ»

Способ получения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ) при культивировании штамма *Kluveromyces marxianus* III-407

Дата введения – 2022 .04.04

1. Область применения

Настоящий стандарт распространяется на КМВ «Магарач» и устанавливает порядок и условия культивирования селекционного штамма № III-407 вида *Kluveromyces marxianus* – продуцента фермента эндополигалактуроназы.

Синтезируемый дрожжами фермент имеет выраженную эндополигалактуроназную активность и рекомендован в качестве ФПДЭ в виноделии для осветления виноградного сусла с высоким содержанием пектина. Применение препарата способствует уменьшению вязкости и улучшению осаждения взвесей.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.010-76 Система стандартов безопасности труда. Взрывобезопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.018-93 Система стандартов безопасности труда. Пожаровзрывобезопасность статического электричества. Общие требования

ГОСТ 12.1.019-2017 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 5556-81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 5962-2013 Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия

ГОСТ 9412-93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 12026-76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 19881-74 Анализаторы потенциометрические для контроля pH молока и молочных продуктов. Общие технические условия

ГОСТ 25336-82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ Р 55298-2012 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения пектолитической активности

ГОСТ ISO 7218-2015 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

ГОСТ ISO/TS 11133-1-2014 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред

ГОСТ Р 53228-2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ Р 58144-2018 Вода дистиллированная. Технические условия.

Примечание – При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов на территории государства по соответствующему указателю стандартов, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Характеристика способа

Способ получения ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ) предусматривает культивирование штамма дрожжей вида *Kluyveromyces marxianus* III-407 (КМВ “Магарач”) на разбавленном виноградном сусле до накопления максимальной активности с последующим отделением осадка от культуральной жидкости, которая используется в качестве ФПДЭ.

4 Оборудование, средства измерений, посуда, материалы, реактивы

4.1 Иономер или потенциометр, способный работать в режиме измерения активной кислотности среды (рН), с измерительной ячейкой и комплектом электродов по ГОСТ 19881.

4.2 Термостат ТС-1/80 СПУ.

4.3 Шкаф сушильный лабораторный СНОЛ 24/350.

4.4 Весы лабораторные электронные WPS 510/C/1 по ГОСТ Р 53228.

4.5 Стерилизатор паровой ВК-30

4.6 Устройство для изготовления ватных пробок.

4.7 Центрифуга

4.8 Микроскоп

4.9 Вискозиметр

4.10 Стаканы стеклянные термоустойчивые по ГОСТ 25336

- 4.11 Горелка спиртовая
- 4.12 Дозатор автоматический переменного объема
- 4.13 Колбы стеклянные термоустойчивые различного объема по ГОСТ 25336.
- 4.14 Пробирки стеклянные микробиологические ГОСТ 25336.
- 4.15 Марля медицинская по ГОСТ 9412
- 4.16 Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556
- 4.17 Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 5962
- 4.18 Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144
- 4.19 Вода питьевая
- 4.20 Центрифужные пробирки
- 4.21 Микробиологическая петля.
- 4.22 Наконечники до 200 мкл; наконечники до 5000 мкл
- 4.23 Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026
- 4.24 Штатив для пробирок биологических.
- 4.25 Глюкоза
- 4.26 Дрожжевой пептон
- 4.27 Дрожжевой экстракт
- 4.28 Серная кислота, х.ч
- 4.29 Натрия гидроокись, х.ч
- 4.30 Гигрометр
- 4.31 Термометры

Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, не уступающих вышеуказанным по метрологическим и техническим характеристикам и обеспечивающих необходимую точность измерений, а также материалов и реактивов с характеристиками не ниже вышеуказанных.

5. Условия проведения работ

5.1 Требования к помещениям – по ГОСТ ISO 7218.

5.2 Работы проводят с соблюдением правил асептики, исключаящих микробное загрязнение образцов из окружающей среды [1].

5.3 Все операции проводят в помещениях для проведения микробиологических исследований с соблюдением следующих условий:

- температура окружающего воздуха $(25 \pm 5) ^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление (97 ± 10) кПа;
- относительная влажность $(65 \pm 15) \%$;
- частота переменного тока (50 ± 5) Гц;
- напряжение в сети (220 ± 10) В.

6. Подготовка к проведению работ

6.1 Подготовка помещений, оборудования, лабораторной посуды, инструментов и материалов

Подготовку и контроль помещений, оборудования, лабораторной посуды, инструментов и материалов для микробиологических исследований проводят по ГОСТ ISO 7218.

6.2 Приготовление питательных сред и растворов

6.2.1 Питательные среды приготавливают и хранят в соответствии с ГОСТ ISO 11133-1.

6.2.2 Корректировку pH питательных сред до требуемых значений проводят с помощью гидроокиси натрия (NaOH) концентрацией приблизительно 40 г/л (приблизительно 1 мол/л) или соляной кислотой (HCl) приблизительно 36,5 г/л (приблизительно 1 мол/л) по ГОСТ ISO 11133; допускается использование 10-20 %-ных растворов винной кислоты;

6.2.3 Виноградное сусло разбавленное [2].

Виноградное сусло разбавляют водопроводной водой до содержания сахаров 100 г/дм³ и pH 3,5 и фильтруют через двойной бумажный фильтр до полной прозрачности, разливают в пробирки или склянки под ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве при температуре (105±1) °C в течение 20 мин.

В производственных условиях разбавленное сусло предварительно подвергают обесшлаживающей фильтрации или пастеризации при температуре 85-90 °C в течение 20 минут.

6.2.3 Синтетическая питательная среда YPD [3] жидкая. В мерную колбу вместимостью 1,0 дм³ помещают 20 г глюкозы, 20 г дрожжевого пептона и 10 г дрожжевого экстракта, наливают 700 см³ дистиллированной воды, перемешивают и доливают до метки дистиллированную воду. Растворяют компоненты нагреванием на водяной бане и устанавливают pH (3,3±0,1). Фильтруют через двойной бумажный фильтр до полной прозрачности и разливают по 10 см³ в стерильные пробирки. Стерилизуют в автоклаве при температуре (121±1) °C в течение 15 мин. Используют непосредственно после приготовления и последующей оценки их стерильности инкубированием при температуре (26±0,5) °C в течение 5 сут.

7. Получение ФПДЭ

7.1. Подготовка накопительной культуры (лабораторная стадия)

Пересев проводят согласно СТО 01586301.025 [4].

Культуру дрожжей (штамм дрожжей *K. marxianus* № III-407), взятую с хранения, микробиологической петлей (1-2 петли) пересевают в пробирку со средой YPD и инкубируют в течение 1-3 сут в термостате при температуре (30±0,5) °C до появления признаков активного брожения (сильное помутнение

среды культивирования, газообразование). При низкой активности роста проводят несколько пересевов до достижения нормируемых показателей.

Готовность накопительной культуры определяется по физиологическому состоянию при микроскопировании в соответствии со следующими показателями: количество клеток не менее 30 тыс. клеток /мл; количество почкующихся клеток не менее 25 %; мертвых не более 5 %.

На данном этапе накопительная культура используется в качестве дрожжевой разводки для получения ФПДЭ.

7.2 Получение ФПДЭ

7.2.1 Дрожжевую разводку (накопительную культуру) штамма дрожжей *K. marxianus* III-407 задают в стерильные склянки необходимого объема (колбы, баллоны) или биореакторы со стерильным разбавленным виноградным суслом с массовой концентрацией сахаров 100 г/л, рН 3,5 до начальной концентрации клеток в среде 2 млн./мл. Культивируют при температуре $(30 \pm 0,5)$ °С до 5 дней, перемешивая два раза в сутки.

7.2.2. После двух суток культивирования ежедневно отбирают пробы надосадочной жидкости для оценки активности внеклеточного фермента эндополигалактуроназы по ГОСТ Р 55298.

Готовность препарата определяется значением активности не менее 1500 ед.

7.2.3. Надосадочную жидкость отделяют от дрожжевого осадка центрифугированием при 4000 об/мин. в течение 15 минут и используют в качестве ФПДЭ.

8. Условия использования препарата

8.1 ФПДЭ с активностью 1500 ед. задают в сусло, поступающее на осветление, в дозировке 40 мл /дал и выдерживают 2 часа при температуре 20 °С. Дальнейшее осветление проводят в соответствии с технологическими требованиями, принятыми на производстве.

9. Требования безопасности

9.1 При работе с микроорганизмами следует соблюдать требования безопасности, установленные ГОСТ ISO 7218, ГОСТ ISO/TS 11133-1

9.2 При работе с химическими реактивами следует соблюдать требования ГОСТ 12.1.005 и ГОСТ 12.1.007.

9.3 Требования взрывобезопасности – в соответствии с ГОСТ 12.1.010.

При выполнении измерений с использованием фотоэлектроколориметра, спектрофотометра, иономера соблюдают правила пожаровзрывобезопасности – по ГОСТ 12.1.018, правила электробезопасности – по ГОСТ 12.1.019 и инструкции по эксплуатации прибора.

10. Требования к квалификации работника

К выполнению пересева, обработке, оформлению результатов допускается специалист, имеющий среднее специальное или высшее образование, опыт работы в научной или производственной микробиологической лаборатории и изучивший инструкцию по эксплуатации соответствующего оборудования и измерительной техники.

Библиография

[1] Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. Издание третье. Всемирная организация здравоохранения 2004.

[2] Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия / Симферополь: «Таврида», 2003.- 560 с.

[3] Yeast Extract–Peptone–Dextrose (YPD) Medium (Liquid or Solid). Cold Spring Harb Protoc 2017. doi:10.1101/pdb.rec090563

[4] СТО 01586301.025- 2019 Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач» Метод субкультивирования штаммов дрожжей

СТО 01586301.041-2022

УДК 663.1

Ключевые слова: дрожжи, посев, среды, культивирование, накопительная культура, разводка, эндополигалактуроназная активность, ферментный препарат

Разработчики:

Руководитель разработки,
ведущий научный сотрудник ФГБУН
«ВННИИВиВ «Магарач» РАН»,
канд. техн. наук



Т.Н. Танащук

Ответственный исполнитель,
заведующий лабораторией микробиологии,
младший научный сотрудник лаборатории
микробиологии ФГБУН «ВННИИВиВ
«Магарач» РАН»



М.Ю. Шаламитский

Исполнители:

Ведущий научный сотрудник лаборатории
микробиологии ФГБУН «ВННИИВиВ
«Магарач» РАН», канд. техн. наук



Е.В. Иванова

Ведущий инженер лаборатории
микробиологии ФГБУН «ВННИИВиВ
«Магарач» РАН»



В.И. Загоруйко

Нормоконтроль:

Ведущий инженер отдела стандартизации,
метрологии и патентных исследований
ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»



И.П. Гусева

Приложение Е

Таблица В.1– Происхождение изучаемых штаммов дрожжей

Saccharomyces bayanus var. *uvorum*

Штамм	Источник и место выделения
CBS395	Сок черной смородины, Нидерланды
SRC274, SRC410	Яблочный сок, Нормандия, Франция
BKM Y-1146	Виноград, Россия
M471, M472, M477, M478, M488, M489	Виноград, Молдавия
DBVPG 1642, DBVPG 1689, DBVPG 1690, DBVPG 1693	Виноград, Италия
Sμ1 = SG1.95	Ягоды винограда, Сансер, Долина Луары, Франция
17e1	Виноградный сок, Бордо, Франция
SCU11, SCU13, SCU197, SCU299, SCU374, SCU74, SCU397	Вино «Мюскаде», Долина Луары, Нант, Франция
L19, L99, L490	Вино, Тур, Долина Луары, Франция
PJP11.94, PJP12.94, PJP1.95	Бродящая мезга, Пуийи-Фюме, Долина Луары, Франция
PJS1.94, PJS2.95, LC1.95, VS2.94	Бродящая мезга, Сансер, Долина Луары, Франция
YIIc2.93, TBIИb13.92, TBVIc2.95	Бродящая мезга, Бордо, Сотерн, Франция
DDI4.95	Бродящая мезга, Бордо, Барсак, Франция
D13	Вино, Эльзас, Франция
SCPP, SC4	Шампанское, Шампань, Франция
SRC55	Бродящий яблочный сок, Бретань, Франция
SRC437	Сидр, Бретань, Франция
SRC258, SRC306	Бродящий яблочный сок, Нормандия, Франция
CECT 12636, CECT 12638, CECT 12635	Бродящий виноградный сок, Испания
CECT 1369, CECT 1884, CECT 10560	Белое вино, Испания
M300	Красное вино, Ростов, Россия
M369	Вино, Словакия
BKM Y-361, BKM Y-509, BKM Y-362, BKM Y-363, BKM Y-364, BKM Y-508	Токайское вино, Словакия
T4/1, T5/6, T13/30	Токайское вино, Венгрия
NCAIM Y.00676, NCAIMY.00677	Алкольный напиток, Венгрия
MCYC 623	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания
CCY21-31-12	<i>Amanita citrina</i> , Словакия
UCDFST 51-206, UCDFST 61-137	<i>Drosophilapersimiles</i> , США
136.01, 148.01	Сокотечения <i>Ulmus pumila</i> , Дальний Восток Россия

Приложение Ж

Таблица Ж.1 – Происхождение штаммов дрожжей вида *S. cerevisiae*

Номер изолята	Климатическая зона Республики Крым	Сорт винограда
1	2	3
И-1	Горно-долинная	Мускат белый
И-2	Горно-долинная приморская	Мускат белый
И-3	Горно-долинная	Италия
И-4	Горно-долинная приморская	Цитронный Магарача
И-5	Горно-долинная	Цитронный Магарача
И-6	Горно-долинная	Цитронный Магарача
И-7	Южный берег Крыма	Мускат белый
И-8	Южный берег Крыма	Мускат белый
И-9	Горно-долинная приморская	Италия
И-10	Южный берег Крыма	Мускат розовый
И-11	Южный берег Крыма	Мускат розовый
И-12	Южный берег Крыма	Алеатико
И-13	Южный берег Крыма	Мускат александрийский
И-14	Южный берег Крыма	Цитронный Магарача
И-15	Горно-долинная приморская	Цитронный Магарача
И-16	Горно-долинная приморская	Сары Пандас
И-17	Горно-долинная приморская	Сары Пандас
И-18	Южный берег Крыма	Италия
И-19	Южный берег Крыма	Мускат белый
И-20	Южный берег Крыма	Кокур белый
И-21	Южный берег Крыма	Мускат белый
И-22	Южный берег Крыма	Италия
И-23	Горно-долинная приморская	Мускат белый
И-24	Горно-долинная	Мускат белый
И-25	Горно-долинная	Мускат белый
И-26	Западный предгорно-приморская	Мускат белый
И-27	Западная предгорно-приморская	Цитронный Магарача
И-28	Западная предгорно-приморская	Цитронный Магарача
И-29	Западная предгорно-приморская	Цитронный Магарача
И-30	Западная предгорно-приморская	Цитронный Магарача
И-31	Западная предгорно-приморская	Мускат розовый
И-32	Западная предгорно-приморская	Мускат розовый
И-33	Западная предгорно-приморская	Мускат белый
И-34	Западная предгорно-приморская	Мускат белый
И-35	Горно-долинная приморская	Цитронный Магарача
И-36	Южный берег Крыма	Мускат александрийский

Продолжение таблицы Ж.1

1	2	3
И-37	Южный берег Крыма	Мускат александрийский
И-38	Южный берег Крыма	Мускат белый
И-39	Южный берег Крыма	Алеатико
И-40	Горно-долинная приморская	Сары Пандас
И-41	Горно-долинная приморская	Сары Пандас
И-42	Южный берег Крыма	Мускат розовый
И-43	Южный берег Крыма	Мускат розовый
И-44	Южный берег Крыма	Мускат александрийский
И-45	Южный берег Крыма	Мускат белый
И-46	Южный берег Крыма	Цитронный Магараца
И-47	Южный берег Крыма	Мускат александрийский
И-48	Южный берег Крыма	Цитронный Магараца
И-49	Южный берег Крыма	Мускат белый
И-50	Южный берег Крыма	Цитронный Магараца
И-51	Горно-долинная приморская	Мускат белый
И-52	Горно-долинная приморская	Мускат Александрийский
И-53	Горно-долинная приморская	Цитронный Магараца
И-54	Горно-долинная приморская	Мускат белый
И-55	Горно-долинная приморская	Мускат Александрийский
И-56	Горно-долинная приморская	Мускат белый

Приложение И

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Всероссийский национальный научно-исследовательский институт
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН»
(ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН)»**

Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»)

УТВЕРЖДАЮ

Врио директора ФГБУН «ВНИИВиВ
«Магарач» РАН», д-р с.-х. наук

В.В. Лиховской

2020 г.



ПАСПОРТ

штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* I-76

- 1. Видовое название культуры:** *S. paradoxus* Batshinskaja, 1914 (Кудрявцев, 1954), *син. S. cerevisiae*; (Kreger-van Rij N.J.W., 1984; Kurtzman C.P., 2011)
- 2. Номер и наименование штамма:** I-76; Алиготе М
- 3. Источник выделения штамма:** не известно
- 4. Способ получения штамма:** изолированный, 1936 г.
- 5. Кто и где идентифицировал штамм:** ИНМИ АН СССР, лаборатория микробиологии (Бургвиц Г.К.); лаборатория микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» (Шаламитский М.Ю.).
- 6. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические особенности штамма:** клетки эллипсоидальные; размеры (5÷7) мкм в ширину и (7÷11) мкм в длину; размножение – почкование; образует аски с 1-4 гладкими круглыми спорами.

Особенности роста на жидких и плотных питательных средах:

- активно сбраживает сахара виноградного сусла, образует пылевидный осадок; не образует кольцо в 30 суточной культуре.
- на агаризованном солодовом сусле образует средние колонии диаметром

(2÷3) мм; округлые с ровным краем, выпуклые, белые; консистенция пастообразная; матовые.

Сбраживает глюкозу, сахарозу, 1/3 раффинозы, не сбраживает мальтозу, лактозу, галактозу и простые декстрины.

7. Область применения штамма: производство столовых виноматериалов, в том числе из мускатных сортов винограда.

8. Продукт, который синтезируется штаммом: сбраживает сахара виноградного сусла, отличается низкой способностью к образованию высших спиртов, образует β-фенилэтанол, α-терпинеол, гераниол, линалоол, образует мало ацетона, способствует усилению цитронных и мускатных оттенков в аромате виноматериала.

9. Активность штамма (с указанием условий культивирования, другие промышленные показатели): Устойчив к 15 % об. этилового спирта; к pH 2,6; к температурам 37 °C и 8 °C; не образует H₂S.

10. Способ, условия и состав среды для длительного хранения штамма: Хранение при минус 86 °C на среде YPD с 30 % глицерина. Хранение методом субкультивирования: среда – виноградное сусло с массовой концентрацией сахаров 200±20 г/дм³; температура хранения – (5÷8) °C; периодичность пересева – один раз в 9 месяцев.

11. Генетические особенности штамма: не изучались

12. Сведения о безопасности использования штамма: штамм не является генетически модифицированным

13. Цель депонирования: в качестве штамма для производства столовых виноматериалов из сортов винограда с мускатным ароматом.

Заведующая лабораторией
микробиологии

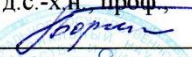
 Танащук Т.Н.

Приложение К

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ВИНОГРАДАРСТВА И ВИНОДЕЛИЯ «МАГАРАЧ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора по научной работе
ФГБУН ВНИИВиВ «Магарач» РАН»,

д.с.-х.н. проф. 

М.Н. Борисенко

«01» августа 2016 г.



ТЕХНОЛОГИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СТОЛОВЫХ ВИНМАТЕРИАЛОВ
ИЗ ВИНОГРАДА СОРТА ЦИТРОННЫЙ МАГАРАЧА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СЕЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ

Программа и методика производственных испытаний

Ялта 2016

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Назначение и область применения

Настоящая программа и методика составлена для проведения производственных испытаний технологических приемов на основе применения селекционных штаммов дрожжей *Kluyveromyces marxianus* (штамм № III-407) на стадии осветления сусла и *Saccharomyces cerevisiae* (штамм № I-76) на стадии брожения сусла при производстве виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача.

1.2 Краткое описание и принцип технологии

1.2.1 Склонность сорта винограда Цитронный Магарача к высокому накоплению пектиновых веществ является одной из весомых причин увеличения вязкости сусла, затруднения его осветления и снижения выхода сусла. Снижение концентрации биополимеров может осуществляться на стадии осветления сусла за счет действия соответствующих ферментов или применения оклеивающих веществ. Одним из основных направлений исследований по данной проблеме является поиск штаммов дрожжей с пектолитической активностью, среди которых дрожжи вида *Kluyveromyces marxianus* представляют собой наиболее перспективный объект для селекции активных продуцентов эндополигалактуроназы. Микробная трансформация пектиновых веществ в данном случае может быть осуществлена в результате применения препарата дрожжевой эндополигалактуроназы селекционного штамма дрожжей *Kluyveromyces marxianus*.

1.2.2 Наиболее значимым современным приемом при производстве сортовых вин является выбор стартовой культуры дрожжей не только по бродильным свойствам, но и по способности синтезировать вторичные и побочные продукты брожения, оказывающих важную роль в формировании сортового аромата и вкуса вина.

1.3 Цель и задачи испытаний

1.3.1 Выработать виноматериалы из винограда сорта Цитронный Магарача с применением технологических приемов снижения содержания пектиновых веществ при обработке сусла опытным препаратом дрожжевой эндополигалактуроназы для качественного осветления сусла и применения селекционной стартовой культуры дрожжей на стадии ферментации сусла для усиления ароматического профиля виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача.

1.3.2 Провести анализ результатов производственных испытаний.

1.3.3 Сделать выводы и дать рекомендации по внедрению технологии приготовления виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием селекционных штаммов дрожжей.

2 ТРЕБОВАНИЯ К УСЛОВИЯМ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

2.1. Производственные испытания технологии приготовления виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием селекционных штаммов дрожжей проводятся на базе винзавода «Ливадия» ФГУП «ПАО «Массандра» на основании результатов научных исследований, выполненных в отделе микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН».

2.2. Производственные испытания проводятся на технологической базе винодельческого предприятия, которая удовлетворяет требованиям норм и правил промышленного винодельческого производства.

2.3. Предприятие обеспечивает необходимым оборудованием, основными и вспомогательными материалами, энергией и сырьем, а также техническое обслуживание оборудования, задействованного в процессе.

2.4. Разработчик технологии предоставляет необходимую документацию для проведения производственных испытаний: программу и методику испытаний, технологическую инструкцию по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и *Kluyveromyces marxianus* (№ III-407), разработанные ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН».

2.5. Органолептическая оценка контрольных и опытных образцов проводится членами комиссии с участием сотрудников ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН».

2.6. При проведении испытаний строго соблюдаются противопожарные мероприятия и требования техники безопасности и промышленной санитарии.

3 ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

3.1. Производственные испытания технологии приготовления столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием селекционных штаммов дрожжей проводятся комиссией в составе представителей, назначенных приказом по винзаводу «Ливадия» ФГУП «ПАО «Массандра».

3.2. Комиссия проводит ознакомление с аппаратурой для осуществления технологического процесса, технологической документацией, проверяет обеспеченность сырьем, основными и вспомогательными материалами, соответствием их качества действующей нормативной документации (ГОСТ, ТУ).

3.3. Комиссия проверяет обеспеченность водой, электроэнергией, лабораторными приборами, реактивами, техническим персоналом и сотрудниками для проведения физико-химических исследований, помещениями для лабораторных работ и хранения образцов виноматериалов, полученных в результате испытаний.

3.4. В соответствии с готовностью, комиссия назначает конкретный срок начала испытаний, при необходимости уточняет программу и методику испытаний.

3.5. Среди членов комиссии и обслуживающего персонала комиссия распределяет обязанности по проведению и контролю различных этапов испытуемого технологического процесса.

3.6. Испытания проводят по методике, изложенной в п. 4 настоящей программы.

3.7. В ходе производственных испытаний комиссия постоянно анализирует и обобщает полученные данные и, при необходимости, проводит повторную или контрольную проверку.

3.8. По результатам испытаний комиссия делает выводы о новой технологии и целесообразности ее внедрения на предприятиях винодельческой промышленности. В случае необходимости проведения более глубоких физико-химических анализов образцы передаются в ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН». В этом случае испытания завершаются после проведения всех необходимых анализов.

3.9. После завершения испытаний комиссия составляет акт и протокол испытаний, в котором должны быть отражены вопросы, поставленные в качестве цели испытаний. Председатель и члены комиссии подписывают данные документы. Акт и протокол испытаний утверждаются в установленном порядке.

4 МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЙ

4.1. Представленная технология приготовления столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием селекционных штаммов дрожжей на винодельческих предприятиях предусматривает обработку сусла опытным препаратом дрожевой эндополигалактуроназы, полученной путем культивирования селекционного штамма дрожжей вида *Kluyveromyces marxianus* (№ III-407, КМВ «Магарач»), с последующим брожением на штамме дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76, КМВ «Магарач»)

4.2. Производство виноматериалов проводят согласно следующей технологической схеме: дробление винограда сорта Цитронный Магарача, с массовой концентрацией сахаров 180-200 г/л осуществляется на валковой дробилке-гребнеотделителе ВДГ-20. Сусло отбирается в количестве не более 60 дал с 1 т винограда. Полученное сусло сульфитируется из расчета получения массовой концентрации общего диоксида серы 75-80 мг/л. В сусло вносят опытный препарат дрожевой эндополигалактуроназы с активностью не менее 1500 ед /мл, приготовленный в лабораторных условиях из расчета 6000 ед/л и выдерживают в течение 2 ч при температуре не ниже 20 °С, дальнейшее осветление проводят отстаиванием в течение 12-24 ч при температуре 8-10 °С.

4.3. В осветленное сусло вносят дрожевую разводку штамма дрожжей № I-76 (КМВ «Магарач»). Брожение проводят при температуре 17-20 °С. По завершению спиртового

брожения виноматериалы снимают с дрожжевого осадка.

4.4. Испытания проводят на однородных партиях сусла, одна из которых является контрольной, другая – опытная. Контролем является технологии осветления сусла и проведения брожения, принятые на предприятии.

4.5. Отбор средних проб осветленного сусла и сброженного виноматериала проводится согласно ГОСТ 31730.

4.6. Проведение технологической обработки сусла препаратом дрожжевой эндополигальктуроназы осуществляется согласно технологической инструкции по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача.

4.7. Обработанное сусло направляется на брожение, а виноматериалы после осветления снимают с осадка, фильтруют и направляют на хранение или розлив, при этом не допускается их окисление.

4.8. Пробы виноматериалов для контроля в количестве 4 бутылок вместимостью 0,7 л отбирают в соответствии с ГОСТ 31730.

4.9. Контрольные партии виноматериалов и сусла находятся в стандартных условиях хранения и периодичность контроля и отбора проб совпадает с контрольными.

4.10. В пробах опытных и контрольных образцов сусла после осветления определяют массовую концентрацию взвесей, объем осветленной части и осадка; в виноматериалах определяют: объемную долю этилового спирта, массовые концентрации сахаров, титруемых и летучих кислот. Проводится их органолептическая оценка.

4.11. Технологическая оценка виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача осуществляется по результатам физико-химического и органолептического анализов опытных и контрольных образцов. Результаты оформляются актом и протоколом испытаний и утверждаются согласно существующему положению.

4.12. Соблюдение требований техники безопасности и производственной санитарии во время испытаний проводится согласно действующим нормативным документам, установленным на предприятии.

Разработчики:

Зав. сектором коньяка отдела
технологии вин и коньяков
Зав. отделом микробиологии ФГБУН
«ВННИИВиВ «Магарач» РАН»
Вед. науч. сотр. отдела микробиологии
ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» РАН»
М.н.с. отдела микробиологии ФГБУН
«ВННИИВиВ «Магарач» РАН»



В.А. Загоруйко



Т.Н. Танашук



Е.В. Иванова



М.Ю. Шаламитский

Приложение Л

**«ЛИВАДИЯ – ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ»
«ПРОИЗВОДСТВЕННО-АГРАРНОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
«МАССАНДРА»**

Управление делами Президента Российской Федерации
(ФГУП «ПАО «Массандра»)
(«Ливадия» - филиал ФГУП «ПАО «Массандра»)

**«ЛИВАДИЯ» - ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИТАРНОГО
ПРЕДПРИЯТИЯ «ПРОИЗВОДСТВЕННО-
АГРАРНОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ «МАССАНДРА»
УПРАВЛЕНИЯ ДЕЛАМИ ПРЕЗИДЕНТА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ИНН 9103002616 ОГРН 1149102026985**

ПРИКАЗ

«26» августа 2016 года

г. Ялта

№ 53-4

Для проведения опытно-производственных испытаний технологии приготовления белых столовых сортовых виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магара

1. Создать комиссию в составе:

Председатель комиссии:

Козловская Т.А.

инженер-технолог филиала "Ливадия"
ФГУП "ПАО Массандра"

Члены комиссии:

Горова В.В.

заведующая производственной
лабораторией филиала "Ливадия" ФГУП
"ПАО Массандра"

В.А. Загоруйко

зав. сектором коньяка ФГБУН
"ВНИИВиВ"Магарач" РАН", д.т.н., проф.

Т.Н. Танащук

нач. отдела микробиологии ФГБУН
"ВНИИВиВ"Магарач" РАН" Танащук

М.Ю. Шаламитский

м.н.с. отдела микробиологии ФГБУН
"ВНИИВиВ"Магарач" РАН"

2. Председателю комиссии Козловской Т.А. обеспечить проведение производственных испытаний в течение 3-4 квартала 2016 г., в соответствие с программой и методикой, утвержденной ФГБУН "ВНИИВиВ"Магарач" РАН". По результатам подготовить для утверждения акт и протокол производственных испытаний.

3. Контроль за выполнением данного приказа оставляю за собой.

Директор филиала ГП "Ливадия"

А.И. Кирюшкин

Приложение М

УТВЕРЖДАЮ
 Директор филиала "Ливадия"
 ФГУП "ПАО Массандра"
 А.И. Кирюшкин
 19 2016 г.



АКТ

опытно-производственных испытаний технологии приготовления белых столовых
 сортовых виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магача.

Филиал "Ливадия"
 ФГУП "ПАО Массандра"

"18" 11 2016 г.

Комиссия в составе: председателя – инженера технолога филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО Массандра" Козловской Татьяны Александровны., заведующей производственной лабораторией филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО Массандра" Говоровой Виктории Владимировны, зав. сектором коньяка ФГБУН "ВНИИВиВ"Магараж" РАН", д.т.н., проф. Загоруйко В.А., нач. отдела микробиологии ФГБУН "ВНИИВиВ"Магараж" РАН" Танащук Т.Н., м.н.с. отдела микробиологии ФГБУН "ВНИИВиВ"Магараж" РАН" Шаламитского М.Ю. назначенная приказом № 53-Ч от "26" августа 2016 г. провела в период с "01" 09 2016 г. по "18" 11 2016 г. производственные испытания технологии приготовления белых столовых сортовых виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магача с использованием штамма дрожжей I-76 и обработкой суслу препаратом дрожевой полигалактуроназы, разработанной в ФГБУН "ВНИИВиВ"Магараж" РАН".

Комиссия по результатам производственных испытаний считает:
 технологию приготовления белых столовых сортовых виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магача с использованием штамма дрожжей I-76 и обработкой суслу препаратом дрожевой полигалактуроназы принятой и рекомендует для внедрения.

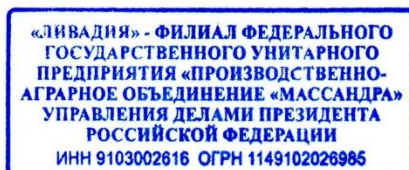
Приложение: Протокол производственных испытаний на 4 стр.

Председатель комиссии:
 Члены комиссии:

Т.А. Козловская
 В.В. Говорова
 В.А. Загоруйко
 Т.Н. Танащук
 М.Ю. Шаламитский



Приложение Н



Приложение к акту
производственных испытаний
от "18" "11" 2016 г.

ПРОТОКОЛ

опытно-производственных испытаний приготовления белых столовых
сортовых виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача на штамме
дрожжей I-76 с обработкой сусла препаратом дрожжевой полигалактуроназы

Филиал "Ливадия"

ФГУП "ПАО Массандра"

"18" "11" 20 г.

Комиссия в составе: председателя – инженера-технолога филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО Массандра" Козловской Т.А., заведующей производственной лабораторией филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО Массандра" Говоровой В.В., заведующего сектором коньяка ФГБУН "ВНИИВиВ"Магарач" РАН", д.т.н., проф. Загоруйко В.А., начальника отдела микробиологии Танащук Т.Н., м.н.с. отдела микробиологии Шаламитского М.Ю. провела в период с "01" "09" по "18" "11" 2016 г. опытно-производственные испытания приготовления белых столовых сортовых виноматериалов из сорта винограда Цитронный Магарача на штамме дрожжей I-76 с обработкой сусла препаратом дрожжевой полигалактуроназы.

Цель испытаний являлась апробация технологии обработки сусла винограда сорта Цитронный Магарача препаратом дрожжевой полигалактуроназы для качественного осветления сусла и с использованием штамма I-76 для брожения для усиления мускатного аромата и вкуса.

Испытания штамма дрожжей и препарата дрожжевой полигалактуроназы осуществляли на сусле из винограда сорта Цитронный Магарача, используемого для приготовления столовых и десертных вин.

Хранение полученных и контрольных виноматериалов осуществлялось в закрытых емкостях.

На момент проведения опытно-производственных испытаний комиссии были представлены: программа и методика опытно-производственных испытаний и технологическая инструкция по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача.

Технология при производственных испытаниях предусматривала:

обработку сусла препаратом дрожжевой полигалактуроназы с целью качественного осветления по выходу осветленной части и объема осадка и содержания взвесей;

- осветление отстаиванием сусла, декантацию с осадка осветленной части сусла, фильтрацию, анализ выхода и количества взвесей в сусле;
- брожение сусла на штаммах дрожжей № I-527 (контроль) и № I-76 (опыт);
- определение основных физико-химических и органолептических показателей полученных виноматериалов.

Исследования технологии осветления сусла и приготовления виноматериалов проводили с соблюдением требований следующей методической и нормативной документации:

- отбор средней пробы от однородной партии сусла и виноматериала проводили согласно "Сборнику основных правил, технологических инструкций и нормативных материалов по производству винодельческой продукции" (утв. Минсельхозпродом РФ 05.05.1998);
- приготовление столовых виноматериалов производили согласно технологической инструкции по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и *Kluyveromyces marxianus* (№ III-407) (ТИ 9103063859.002:2016).

Для испытания было предоставлено сусло и полученные из него столовые виноматериалы, произведенные в условиях филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО Массандра" в достаточном количестве.

Производство виноматериалов проводили согласно следующей технологической схемы: дробление винограда сорта Цитронный Магарача с массовой концентрацией сахаров 180-200 г/л производили на валковой дробилке-гребнеотделителе ВДГ-20. Сусло отбирали в количестве не более 60 дал с 1 т винограда. Полученное сусло сульфитировали из расчета получения массовой концентрации общего диоксида серы 75-80 мг/л. Сусло разделяли на 2 равные партии, одна из которых была контрольной, во вторую вносили ферментный препарат дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ) с активностью не менее 1500 ед /мл, приготовленный в лабораторных условиях из расчета 6000 ед/дал и выдерживали в течение 2 ч при температуре не ниже 20 °С. Обе партии сусла осветляли отстаиванием в течение 24 ч при температуре 8-10 °С.

После отстаивания проводили анализ выхода осветленного сусла и количества взвесей в нем.

В осветленное сусло вносили дрожжевую разводку штамма дрожжей № I-76 (опыт) и I-527 (контроль) (КМВ «Магарач»). Брожение проводили при температуре 17-20 оС. По завершению спиртового брожения виноматериалы снимали с дрожжевого осадка, сульфитировали и отправляли на хранение.

Проводили анализ физико-химических показателей и оценку органолептических свойств полученных виноматериалов.

Хранение опытных и контрольных партий виноматериалов осуществляли в эмалированных резервуарах при постоянной температуре 20 °С. Общий объем опытной партии сусла составил 1000 тыс. дал.

Результаты обработок и дегустационная оценка виноматериалов представлены в протоколах дегустации сусла и виноматериалов.

Анализ данных показывает, что при обработке сусла обеспечивается качественное его осветление и образование плотного, подвижного осадка, что облегчает технологические операции при перекачивании гущевых осадков. Дегустационная оценка показала, что при обработке сусла ферментным препаратом дрожжевой эндополигалактуроназы опытные образцы не имели посторонних оттенков в аромате и вкусе и не отличались от контрольных партий.

Проведение брожения на штамме I-76 обеспечивало полное сбраживание сахаров сусла с получением качественных виноматериалов с выраженным цитронно-мускатным ароматом и вкусом.

Анализ данных по обработке сусла ФПДЭ обеспечивает качественное осветление сусла и получение качественных виноматериалов, которые в дальнейшем требуют меньшего количества оклеивающих веществ по сравнению с контролем. Дегустационная оценка образцов виноматериалов показала, что сбраживание полученного сусла на штамме I-76 способствует получению виноматериалов с более выраженным цитронно-мускатным ароматом, по сравнению с контролем и не вызывает появления в аромате и вкусе никаких посторонних оттенков и недостатков.

Выводы:

1. При обработке сусла препаратом дрожжевой пектиназы на стадии осветления сусла отстаиванием обеспечивалось его качественное осветление, образование плотного осадка, что облегчает технологические операции при декантации сусла и способствует уменьшению оклеивающих веществ при дальнейших обработках.

2. При сбраживании сусла с использованием штамма I-76, полученные виноматериалы отличались ярко выраженным мускатным ароматом и вкусом и имели дегустационную оценку выше, чем в контрольных образцах.

3. Рекомендовать разработанную ФГБУН "ВННИИВиВ"Магарац" РАН" технологию приготовления белых столовых сортов виноматериалов из

сорта винограда Цитронный Магача на штамме дрожжей I-76 с обработкой суслу препаратом дрожжевой полигалактуроназы для внедрения в винодельческую промышленность.

Председатель комиссии:



Т.А. Козловская

Члены комиссии:



В.В. Говорова



В.А. Загоруйко



Т.Н. Танащук



М.Ю. Шаламитский

Приложение П

ПРОТОКОЛ

дегустации сусла, осветленного ФПДЭ и выработанного из сорта винограда Цитронный Магарача, в условиях филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО Массандра" от "09" сентября 2016 г.

Председатель дегустационной

комиссии:

Козловская Т.А., инженер-технолог
филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО
Массандра"

Секретарь

Говорова В.В., заведующая
производственной лабораторией
филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО
Массандра"

Участвовали

ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН" Загоруйко В.А., зав. сект. коньяка
Танащук Т.Н., нач. отдела
микробиологии, канд. техн. наук
Шаламитский М.Ю., м.н.с. отдела
микробиологии

Цель: установить влияние технологической обработки дрожжевым препаратом полигалактуроназы на органолептические свойства сусла.

Результаты производственных испытаний

Опыт	Объем сусла, мл	Выход сусла, %	Содержание взвесей, г/л	Характеристика сусла	Дегустационная оценка, средний балл
Контроль, сусло до осветления	1000	—	—	мутное, сортовой аромат, вкус чистый	7,4
Контроль, отстаивание на холоду	1000	70	35,5	частично осветленное, сортовой аромат, вкус чистый	7,5
Опыт, обработка ФПДЭ	1000	71	19,4	сильный опал, сортовой аромат, вкус чистый	7,5

Выводы:

– Применение препарата дрожжевой полигалактуроназы при отстаивании сусли обеспечивает его качественное осветление.

– По органолептическим показателям опытные партии осветленного сусли не имели посторонних оттенков в аромате и вкусе и не отличались от контрольных партий.

Председатель:

Секретарь:



Т.А. Козловская

В.В. Говорова

Приложение Р

ПРОТОКОЛ

дегустации виноматериалов, выработанных из винограда Цитронный Магарача, в
условиях филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО Массандра"

от "11" ноября 2016 г.

Председатель дегустационной

комиссии:

Козловская Т.А., инженер-технолог
филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО
Массандра"

Секретарь

Говорова В.В., заведующая
производственной лабораторией
филиала "Ливадия" ФГУП "ПАО
Массандра"

Участвовали

ФГБУН "ВННИИВиВ "Магарач" РАН"

Загоруйко В.А., зав. сект. коньяка

Танашук Т.Н., нач. отдела
микробиологии, канд. техн. наук

Шаламитский М.Ю., м.н.с. отдела
микробиологии

Цель дегустации: установить влияние обработки суслу ФПДЭ на качество получаемых виноматериалов. Оценить влияние отобранного штамма дрожжей № I-76 и штамма используемого заводом № I-527 на сортовые характеристики виноматериалов, произведенных из винограда сорта Цитронный.

Результаты органолептической оценки виноматериалов приведены в таблице.

Таблица – Результаты органолептической оценки виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача

№ п/п	Опыт	Физико- химические показатели	Характеристика	Дегуста- ционная оценка, средний балл
1	2	3	4	5
1	№ I-76, без обработки ФПДЭ	Объемная доля этилового спирта, % – 11,5 Массовая концентрация титритруемых кислот, г/л - 7,8	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	Объемная доля этилового спирта, % – 11,8 Массовая концентрация титритруемых кислот, г/л - 5,6	Легкий опал. Светло-соломенного цвета. Аромат слабовыраженный мускатно-цветочного направления. Вкус полный, гармоничный с легкой горчинкой	7,72
3	№ I-76, обработка ФПДЭ	Объемная доля этилового спирта, % – 11,5 Массовая концентрация титритруемых кислот, г/л - 7,8	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	Объемная доля этилового спирта, % – 11,8 Массовая концентрация титритруемых кислот, г/л - 5,6	Прозрачное. Светло-соломенного цвета. Аромат слабовыраженный мускатно-цветочного направления. Вкус полный, гармоничный с легкой горчинкой	7,72

Выводы:

– Применение препарата дрожжевой полигалактуроназы при отстаивании сусла обеспечивает получение качественного виноматериала, который быстро осветляется.

– Применение штамма дрожжей I-76 при сбраживании осветленного сусла позволило получить виноматериалы с более ярко выраженным мускатным ароматом, по сравнению с контрольной партией.

– По органолептическим показателям опытные партии осветленного сусла не имели посторонних оттенков в аромате и вкусе.

Председатель:

Секретарь:



Т.А. Козловская

В.В. Говорова

Приложение С

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ВИНОГРАДАРСТВА И ВИНОДЕЛИЯ «МАГАРАЧ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора по научной работе
ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач»
РАН»

 М.Н. Борисенко
«18» ноября 2016 г.

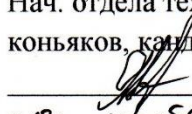


ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
по приготовлению столовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный
Магарача с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (№ I-76) и
Kluyveromyces marxianus (№ III-407)

ТИ 9103063859.002:2016

РАЗРАБОТАНО:

Нач. отдела технологии вин и
коньяков, канд. техн. наук

 А.Я. Яланецкий
«17» ноября 2016 г.

Ялта-2016

1. Вводная часть

1.1. Настоящая технологическая инструкция распространяется на производство сортовых виноматериалов из винограда сорта Цитронный Магарача с использованием дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* (штамм № I-76), предназначенного для сбраживания виноградного сусла и *Kluyveromyces marxianus* (штамм № III-407), предназначенного для приготовления ферментного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы (ФПДЭ), предназначенного для снижения массовой концентрации взвесей и разрушения пектиновых веществ в сусле перед его сбраживанием.

2. Характеристика готовой продукции

2.1. Виноматериалы из винограда сорта Цитронный Магарача, приготовленные с использованием штаммов *S. cerevisiae* (штамм № I-76) и *K. marxianus* (штамм № III-407) по органолептическим и физико-химическим показателям должны отвечать требованиям, указанным в таблице 1, 2.

Таблица 1

Органолептические показатели	
Наименование показателя	Характеристика
Цвет	От светло-соломенного до золотистого
Аромат	Тонкий, цветочно-цитронного направления с оттенками муската и розы
Вкус	Свежий, гармоничный

Таблица 2

Физико-химические показатели	
Наименование показателя	Значение показателя
Объемная доля этилового спирта, %	9,0-13,5
Массовая концентрация сахаров, г/л, не более	4,0
Массовая концентрация титруемых кислот, в пересчете на винную кислоту, г/л	5,0-7,0
Массовая концентрация летучих кислот, в пересчете на уксусную кислоту, г/л, не более	1,1
Массовая концентрация приведённого экстракта, г/л, не менее	16,0

3. Характеристика сырья и вспомогательных материалов

3.1. Сортные виноматериалы вырабатываются из сорта винограда Цитронный Магарача, согласно ГОСТ 31782, с массовой концентрацией сахаров 180-200 г/л и массовой концентрацией титруемых кислот 6-10 г/л.

3.2. Переработку винограда, получение и осветление сусла проводят согласно Сборнику основных правил, технологических инструкций и нормативных материалов по производству винодельческой продукции, утв. Министерством сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации (05.05.1998)

3.3. Культуры дрожжей *S. cerevisiae* (штамм № I-76) и *K. marxianus* (штамм № III-407) поставляются из коллекции микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач») (г. Ялта, ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»).

4. Описание технологического процесса

4.1. Производство сортовых виноматериалов с применением дрожжей из КМВ «Магарач» дополнительно к действующей технологической инструкции предусматривает следующие операции:

- подготовку чистой культуры дрожжей *S. cerevisiae* (штамм № I-76) и *K. marxianus* (штамм № III-407);
- получение ФПДЭ путем культивирования штамма № III-407 на виноградном сусле с массовой концентрацией сахаров 100 г/л;
- осветление виноградного сусла с помощью полученного препарата дрожжевой эндополигалактуроназы;
- проведение процесса спиртового брожения на штамме № I-76.

4.2. Контроль процесса спиртового брожения проводят в соответствии с Инструкцией по микробиологическому контролю винодельческого производства ИК 9170-1128-00334600-07.

4.3. Для приготовления ФПДЭ штамм дрожжей *K. marxianus* № III-407 культивируют не более 5 сут. на пастеризованном сусле, разбавленном водой до содержания сахаров 100 г/л, при температуре 28-30 °С до накопления в среде активности фермента не менее 1500 ед./мл.

4.4. При достижении культурой необходимой активности, дрожжевой осадок удаляют центрифугированием при 4000 об./мин. в течение 15 мин., а надосадочную жидкость используют в качестве ФПДЭ.

4.5. ФПДЭ задают в сусло в количестве 60000 ед/дал и выдерживают в течении 2 ч при температуре не ниже 20 °С. Дальнейшее осветление проводят при температуре 8-10 °С до 24 ч. Осветленное сусло снимают с гущевосадка и отправляют на брожение.

4.6. Для проведения спиртового брожения используют штамм дрожжей *S. cerevisiae* № I-76 в виде жидкой разводки. Приготовление дрожжевой разводки осуществляют в соответствии с требованиями, принятыми в виноделии.

4.10. В процессе спиртового брожения температуру поддерживают в диапазоне 17-20 °С.

4.11. По завершению спиртового брожения виноматериалы снимают с дрожжевого осадка, сульфитируют и отправляют на хранение.

5. Требования к технологическому оборудованию

5.1. Процесс подготовки дрожжевой разводки осуществляют в дрожжанках с охлаждением.

5.2. Процесс спиртового брожения проводят периодически в эмалированных резервуарах или резервуарах из нержавеющей стали, оснащенных охлаждающей рубашкой.

6. Методы и средства контроля

6.1. Отбор проб производят согласно ГОСТ 31730.

6.2. Методы и средства технологического контроля представлены в таблице 3.

Таблица 3

Методы и средства технологического контроля

Объект контроля	Место контроля	Периодичность контроля	Контролируемый параметр	Предельные значения параметра	Методы и способы контроля
1 Виноград	Транс-портная тара	В каждой партии	Ампелографический сорт, качество	Согласно с разделом 3 настоящей инструкции	ГОСТ 31782
			Качество, механический состав грозди, наличие засохших и поврежденных вредителями и болезнями ягод	Согласно с разделом 3 п.п. 3.1 ГОСТ 31782	ГОСТ 31782
			Массовая концентрация сахаров, г/л, не менее	180,0	ГОСТ 27198
			Массовая концентрация титруемых кислот, г/л	6,0-10,0	ГОСТ 32114
2. Сусло в процессе отстаивания	Резервуар	В каждой партии	Массовая концентрация сахаров, г/л, не менее	180,0	ГОСТ 27198
			Массовая концентрация титруемых кислот, г/л	6,0-10,0	ГОСТ 32114
			Массовая концентрация общей сернистой кислоты, мг/л	75-100	ГОСТ 32115
			Время отстаивания, ч	12 – 24	часы
			Температура, °С	8 - 12	термометр
3 Чистая культура дрожжей	Производственная разводка	Перед внесением в сусло	Физиологическое состояние дрожжей	Активное	ИК 9170-1128-00334600-0
4. ФПДЭ	Производственный образец	В каждой партии	Активность фермента, ед /мл, не менее	1000	ГОСТ Р 55298
5. Сусло во время брожения	Резервуар	В каждой партии, 4 раза в сутки	Массовая концентрация сахаров, г/л	Фактическая	ГОСТ 13192
			Объемная доля этилового спирта, %	Фактическая	ГОСТ 32095
			Температура, °С	20 – 22	термометр
			Состояние дрожжевых клеток	Активное	микроскопирование
6. Виноматериал после снятия с дрожжей	Резервуар	В каждой партии	Массовая концентрация сернистой кислоты, мг/л, не более	200	ГОСТ 32115
			общей свободной	20	
			Микробиологическое состояние	здоровый	Микроскопирование
Примечание. В процессе производства допускается определение и других показателей, не предусмотренных таблицей 2					

7. Перечень основных руководящих нормативных и технологических документаций

7.1. ИК 9170-1128-00334600-07 Инструкция по микробиологическому контролю винодельческого производства.

7.2. «Правила техники безопасности и производственной санитарии в винодельческой промышленности», утвержденные Минпищепромом СССР 30.12.89.

7.3. СанПиН 42-143-5788-91 «Санитарные правила для винодельческих предприятий», № 5788-91, утвержденные Министерством охраны здоровья СССР 07.06.91.

7.4. «Методико-биологические требования и санитарные нормы качества», утвержденные Министерством здравоохранения СССР 01.08.89, № 5061-89.

7.5. "Сборник основных правил, технологических инструкций и нормативных материалов по производству винодельческой продукции" (утв. Минсельхозпродом РФ 05.05.1998).

7.6. ГОСТ 31730-2012 Продукция винодельческая. Правила приемки и методы отбора проб.

7.7. ГОСТ 32030-2013 Вина столовые и виноматериалы столовые. Общие технические условия

7.8. ГОСТ Р 55298-2012 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения пектолитической активности

7.9. ГОСТ 27198-87 Виноград свежий. Методы определения массовой концентрации сахаров

7.10. ГОСТ 32115 Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Метод определения массовой концентрации свободного и общего диоксида серы

7.11. ГОСТ 32114-2013 Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Методы определения массовой концентрации титруемых кислот.

7.12. ГОСТ 32095-2013 Продукция алкогольная и сырье для ее производства. Метод определения объемной доли этилового спирта

7.13. Стандарты и методы испытаний

ГОСТ 247-58	ГОСТ 26930-86	ГОСТ 32001-2012
ГОСТ 908-2004	ГОСТ 26932-86	ГОСТ 32051-2013
ГОСТ 2918-79	ГОСТ 26933-86	ГОСТ 32061-2013
ГОСТ 9218-2015	ГОСТ 30178-96	ГОСТ 32081-2013
ГОСТ 13192-73	ГОСТ 30538-97	ГОСТ 32095-2013
ГОСТ 14192-96	ГОСТ 31266-2004	ГОСТ 32113-2013
ГОСТ 21205-83	ГОСТ 31726-2012	ГОСТ 32114-2013
ГОСТ 23943-80	ГОСТ 31730-2012	ГОСТ 32115-2013
ГОСТ 26927-86	ГОСТ 31782-2012	ГОСТ 32779-2014
ГОСТ 26929-94	ГОСТ 32000-2012	

Разработчики:

Зав. сектором коньяка отдела
технологии вин и коньяков
ФГБУН ВНИИВиВ «Магарач» РАН»,
д.т.н., проф., чл.-корр. НААН;



В.А. Загоруйко

Нач. отдела микробиологии,
к.т.н., ст.науч. сотр.



Т.Н. Танащук

Младший научный сотрудник
отдела микробиологии



М.Ю. Шаламитский

Приложение Т

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «АПК Мильстрим-Черноморские вина»

М.А. Боркова

2021 г.



о внедрении

Методических рекомендаций «Технологической инструкции по производству вина сортового белого «Цитронный Магарача» и «Технологической инструкции по применению ферментного препарата дрожжевой эндо-полигалактуроназы штамма № III-407 *Kluyveromyces marxianus*»

Настоящим актом подтверждается, что произведена переработка винограда сорта Цитронный Магарача, произрастающего в ООО «АПК Мильстрим-Черноморские вина» Краснодарского края на площади 21,06 га виноградников согласно «Технологической инструкции по производству вина сортового белого «Цитронный Магарача» и «Технологической инструкции по применению ферментного препарата дрожжевой эндо-полигалактуроназы штамма № III-407 *Kluyveromyces marxianus*».

Установлено, что виноград сорта Цитронный Магарача, собранный в период 2019-2021 гг., в количестве 397 т удовлетворял требованиям ГОСТ 31782-2012 «Виноград свежий машинной и ручной уборки для промышленной переработки. Технические условия» и использовался для производства сухих виноматериалов по «Технологической инструкции по производству вина ординарного столового сортового белого «Цитронный Магарача». Было выработано 23820 дал сухих виноматериалов.

Полученные виноматериалы по всем физико-химическим и органолептическим показателям соответствовали требованиям ГОСТ 32030-2013.

Настоящий акт дан для приложения к кандидатской диссертационной работе Шаламитского М.Ю. «Совершенствование технологии производства белых столовых вин на основе изучения метаболизма микроорганизмов».

Главный винодел
ООО «АПК Мильстрим-Черноморские вина»


А.Ладыгин

Приложение У

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор
ООО "АПК Мильстрим -
Черноморские вина"

М.А. Боркова

"24" 11 2021 г.



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

экономического эффекта от внедрения технологии производства
виноматериалов для выработки вина из винограда сорта Цитронный
Магараха

Наименование показателя	Единицы измерения	Значения показателей	
		базовая технология	новая технология
Объем внедрения	тыс. дал		23,8
Снижение затрат	руб./тыс. дал		6,66
Экономический эффект от внедрения	тыс. руб.		158,5

Главный винодел ООО "АПК
Мильстрим - Черноморские вина"

А.А. Ладыгин

Зам. генерального директора по
качеству, зав. лабораторией
ООО "АПК Мильстрим -
Черноморские вина"

Е.О. Ладыгина

Главный экономист ООО "АПК
Мильстрим - Черноморские вина"

Е.В. Ведутенко

М.н.с. лаборатории
микробиологии ФГБУН
"ВНИИВиВ "Магарах" РАН"

М.Ю. Шаламитский

Технико-экономическое обоснование

Важной концепцией современного 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.

За рубежом для улучшения сортовых характеристик вин рекомендуется использование рас дрожжей, способствующих проявлению сортовых особенностей винограда, а также применение ферментных препаратов для увеличения выхода виноградного сусла.

В связи с этим возникла потребность в поиске отечественных штаммов дрожжей для сбраживания виноградного сусла и продуцентов пектолитических ферментов для увеличения выхода сусла.

Экономическая эффективность новой технологии обусловлена применением штамма дрожжей № I-76 из коллекции микроорганизмов виноделия "Магарач", способствующего развитию сортовых особенностей винограда сорта Цитронный Магарача, а применение дрожжевого ферментного препарата эндополигалактуроназы из селекционированного штамма дрожжей *Kluveromyces marxianus* № III-407 способствует увеличению выхода осветленной части виноградного сусла за счет получения компактного густевого осадка.

1. Исходные данные для расчета

Наименование показателя	Единицы измерения	Значение показателей		Примечание
		до внедрения	после внедрения	
Объем внедрения	тыс. дал		23,82	
Увеличение выхода виноградного сусла	%	—	1,0	по результатам внедрения
Себестоимость виноматериала	руб./дал	665,50	658,6	данные ООО "АПК Мильстрим - Черноморские вина"

2. Расчет экономической эффективности

2.1 Сокращение затрат на выработку 1 дал виноматериала составляет:

$$665,50 \times 0,01 = 6,66 \text{ руб}$$

2.2 Экономическая эффективность при выработке 23,82 тыс. дал виноматериалов составляет:

$$23\,820 \times 6,66 = 158,5 \text{ тыс. руб}$$