

СЕЛЕКТИВНИЙ ДОБІР ПЕРСПЕКТИВНИХ ДРІЖДЖОВИХ КУЛЬТУР *Saccharomyces cerevisiae* ДЛЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЦІЛЕЙ

В.М. БАЙРАКТАР

Одеський національний університет ім.І.І.Мечникова

Представлені результати добору дріжджових культур, виділених із сусла різних сортів винограду. Показано, що деякі дріжджові культури мають добрі біотехнологічні властивості і можуть бути рекомендовані для практичного використання, а інші як типові і тестові для науково-дослідницьких цілей.

Культури дріжджів, сорти винограду, біотехнологія дріжджів, живильне середовище

Біотехнологія одержання високоякісних вин з виноградного сусла супроводжується серією складних біохімічних процесів перетворення глюкози в етиловий спирт. Запускається цей процес мікробіологічно, дріжджами, які знаходяться на шкірочці дозрілого грона винограду. Ферменти виноградного сусла беруть участь у розкладанні глюкози на етиловий спирт і вуглекислий газ в анаэробних умовах [1,2].

У природі існує велика кількість диких рас дріжджів, які можуть брати участь в бродінні сусла. Однак, чиста культура дріжджів, що зумовлює керованість цим біотехнологічним процесом найбільш бажана [4]. Застосування чистих культур дріжджів, стійких рас проти зовнішніх умов: спирту, кислот, сульфатів, забезпечує можливість бродіння навіть у незвичайних, екстремальних умовах [1,6,7].

Для одержання високоякісного кінцевого продукту величезну роль відіграє не тільки видова приналежність дріжджової культури, але й

особливості самого використовуваного штаму, його висока бродильна активність [3,4,5]. Результати застосування чистої культури дріжджів багато в чому визначаються якістю приготовлених дріжджових розведень і кількістю дріжджових клітин у бродильній суміші, строгим дотриманням умов анаеробного бродіння [4].

Метою досліджень – виділення із різноманітних сортів винограду культур дріжджів, визначення їх видової приналежності, фізіологічних і біохімічних властивостей, а також депонування в колекції. Добір і селекція культур дріжджів, придатних для біотехнологічного промислового їх одержання і науково-дослідного використання.

Методика та умови проведення досліджень. Відбір проб виноградного суслу для виділення культур дріжджів проводили в сезон збору винограду на Винзаводі с. Шабо, Білгород-Дністровського району, Одеської області.

Для дослідження були відібрані винні сорти винограду: Шардоне, Каберне, Мерло, Совиньон, Рислінг Рейнський, Алиготе, Ркацители.

Інші сорти придбали в приватних фермерських господарствах, що вирощують виноград.

Зі столових сортів відібрали: Кеша, Кишмиш білий, Карабурну, Лідія, Одеський сувенір, Дністровський рожевий, Оригінал, Мускатний білий, Ізабелла, Кримський чорний, Молдова, Дойна, Королева виноградників, Аркадія, Бако, Сурученський, з гібридних сортів: Новак чорний, Тисяча перший гібрид, Двадцять восьмий гібрид, Зайбель чорний, Зайбель білий, Кудрек білий.

Виділення чистої культури здійснювали традиційним методом – послідовним висіванням проб на чашках Петрі з декількома видами агару [1].

Первинне виділення дріжджової культури проводили на повноцінному багатоконпонентному агаро-мікроелементному середовищі, інгібуючим цвіль, (IMA Inhibitory Mold Agar), другий пасаж – на живильному середовищі Wort Agar, що випускаються компанією Vecton Dickinson, США.

Культивування здійснювали в термостаті при температурі 24°C. Первинний ріст дріжджової культури від інокульованих на агар проб з'являвся

за 2-4 дні залежно від концентрації висіяної культури, ріст був насиченим із дрібними або великими маслянистими, блискучими, окремими колоніями. Для підтвердження чистоти виділених дріжджів і однорідності клітин провели мікроскопію колоній.

Порівняльна оцінка і характеристика виділених чистих культур дріжджів проводилася за морфологічними, культуральними, фізіологічними, біохімічними і біотехнологічними властивостями.

Стандартними референсами штамів дріжджів для контрольних досліджень слугували культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, придбані в різних культуральних колекціях країн Європи: *Saccharomyces cerevisiae* DMVP – 12-4-20 – в Charles University (Чехія); *Saccharomyces cerevisiae* NCYC-1006 – в Британській колекції дріжджів; *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-2177 – у ВКПМ; *Saccharomyces cerevisiae* ATCC-9743 – в компанії LGK Standards, Teddington (Великобританія).

При доборі виділених дріжджових колоній для консервування й зберігання перевага надавалася колоніям [рис. 1] великим, опуклим, білого кольору з блиском, при мікроскопії [рис. 6,7] клітини дріжджів у них круглі, великі й однорідні за формою і розміром. Відібрані для подальшої селекції сім штамів винних дріжджів цілком відповідали необхідним критеріям.

Кожну виділену культуру дріжджів інокулювали в підготовлені інсулінові скляні флакони об'ємом 6 мл. методом уколу в стовпчик на картопляно-глюкозному середовищі в напіврідкому 0,4%-ному агарі. Через 24 год інкубації в термостаті при температурі 30°C флакони щільно закривали гумовими пробками і алюмінієвими ковпачками. В такому стані анабіозу законсервовані дріжджові культури за нашими спостереженнями прекрасно зберігаються при температурі +4 °C впродовж року.

Штами дріжджів, виділені із сортів винограду: Шардоне, Совиньон, Рислінг рейнський, Аліготе мали чітку пилоподібну, а зі: Ркацителі, Каберне, Мерло виражену конгломератну структуру осаду.

Виділені культури дріжджів із усіх сортів винограду депоновані в колекції NRRL - Nord Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, USA.

Колекційні номери дріжджових культур виділені з винних сортів винограду: Аліготе USRCB Y-3362, Каберне USRCB Y-3363, Мерло USRCB Y-3364, Рислінг рейнський USRCB Y-3365, Ркацетелі USRCB Y-3366, Совиньон USRCB Y-3367, Шардоне USRCB Y-3368, депонованих дріжджів – з суслу столових сортів винограду: Кеша Y-3423, Кишмиш білий Y-3424, Карабурну USRCB Y-3393, Лідія USRCB Y-3399, Одеський сувенір USRCB Y-3375, Дністровський рожевий USRCB Y-3396, Оригінал USRCB Y-3406, Мускатний білий USRCB Y-3372, Ізабелла USRCB Y-3429, Кримський чорний USRCB Y-3373, Молдова USRCB Y-3391, Дойна USRCB Y-3398, Королева виноградників Y-3425, Аркадія USRCB Y-3402, Бако Y-3397, Сурученський Y-3400 та із суслу гібридних сортів винограду: Новак чорний Y-3374, Тисяча перший гібрид Y-3403, Двадцять восьмий гібрид Y-3405, Зайбель чорний USRCB Y-3426, Зайбель білий USRCB Y-3427, Кудрек білий Y-3395.



Рис.1. Ріст окремих, великих колоній дріжджів на середовищі Wort Agar, виділених з виноградного суслу сорту Бако, що перебродило. Депоновані в колекції NRRL під номером **USRCB Y-3397**.



Рис. 2. Насичений щільний ріст колоній дріжджів на середовищі MRS Agar, виділених з виноградного суслу сорту Аліготе, що перебродило. Депоновані в колекції NRRL під номером **USRCB Y-3362**.



Рис. 3. Ріст колоній дріжджів на середовищі MRS Agar, виділених з виноградного суслу, що перебродило, сорту Совиньон. Депоновані в колекції NRRL під номером **USRCB Y-3367**.



Рис. 4. Ріст окремих середніх колоній дріжджів на середовищі MRS Agar, виділених з виноградного суслу, сорту Аркадія, яке перебродило. Депоновані в колекції NRRL під номером **USRCB Y-3368**.



Рис. 5. Ріст окремих великих колоній дріжджів на середовищі Wort Agar, виділених з виноградного суслу сорту Аркадія, яке перебродило. Депоновані в колекції NRRL під номером **USRCB Y-3402**.

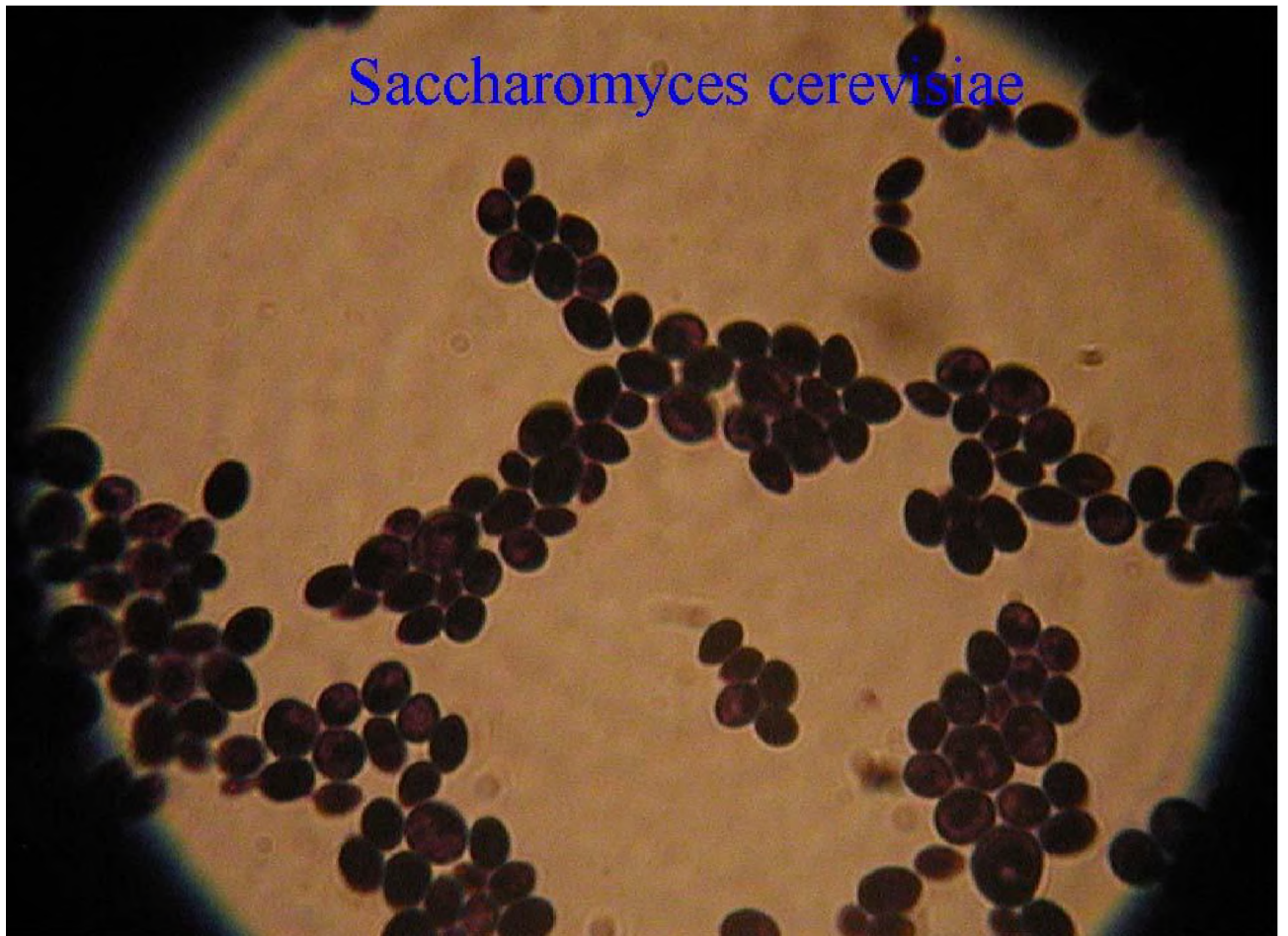


Рис. 6. Вигляд під мікроскопом дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* пофарбованих за Грамом, виділених з виноградного суслу, що перебродило.

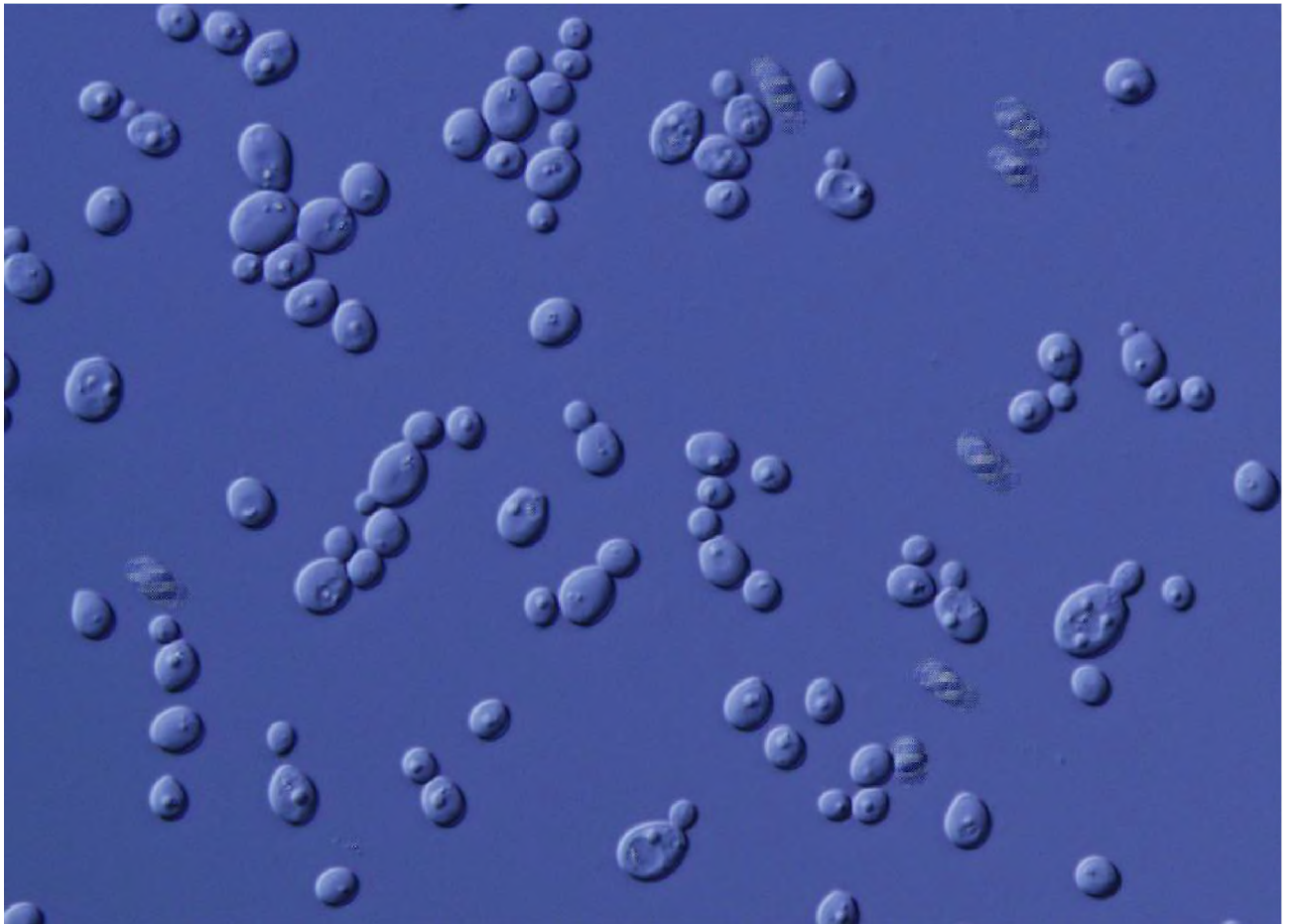


Рис. 7. Морфологічні властивості дріжджів, ділення дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae* брунькуванням. Дріжджові клітини були виділені з виноградного суслу, що перебродило.



Рис. 8. Ріст окремих великих колоній дріжджів на середовищі Wort Agar, виділених з виноградного сусла, гібридного сорту 23, яке перебродило. Депоновані в колекції NRRL під номером USRCB Y-3405.

Результати досліджень та їх обговорення. Порівняльна оцінка за біотехнологічними параметрами виділених культур дріжджів із тридцяти сортів винограду, отриманих у результаті спонтанної ферментації виноградного сусла, наведена в таблиці.

Дослідження проведені за морфо-фізіологічними, культуральними, біохімічними і біотехнологічними показниками дозволили відібрати найперспективніші дріжджові культури для практичного використання, інші рекомендується використовувати для науково-дослідних цілей як типові або як тест культури для проведення референс досліджень.

**Біотехнологічні властивості дріжджів, виділених від різних сортів
винограду**

Сорт винограду	Колекційні номери NRRL	Ріст при температурі +4°C	Ріст при температурі +42°C	Ріст при рН-2,5	Резистентність до 10%-ного етанолу	Утворення сірководню H ₂ S	Ріст на середовищі з 50%-ною глюкозою	Резистентність до сульфіту
Аліготе	Y-3362	+	+	+	+	-	+	+
Бак	Y-3397	-	-	+	+	-	-	+
Каберне	Y-3363	-	-	+	+	-	-	+
Мерло	Y-3364	-	-	+	+	-	-	+
Рислінг рейнський	Y-3365	-	-	-	+	-	-	+
Ркацителі	Y-3366	+	+	+	+	-	+	+
Совіньон	Y-3367	+	+	+	+	-	+	+
Сурученський	Y-3400	-	-	+	+	-	-	+
Сухолиманський	Y-3394	+	-	+	+	-	-	+
Шардоне	Y-3368	+	+	+	+	-	+	+
Кеша	Y-3423	+	-	-	-	-	+	-
Кишмиш білий	Y-3424	-	-	-	-	-	-	-
Карабурну	Y-3393	-	-	-	-	-	-	-
Лідія	Y-3399	+	+	+	+	-	+	+
Одеський сувенір	Y-3375	-	-	+	+	-	-	-
Дністровський рожевий	Y-3396	+	+	+	+	-	+	+
Оригінал	Y-3406	-	-	+	-	-	-	-
Мускатний білий	Y-3372	-	-	-	-	-	-	-
Ізабелла	Y-3429	+	+	+	+	-	+	+
Кримський чорний	Y-3373	+	+	+	+	-	+	+
Молдова	Y-3391	+	+	+	+	-	+	+
Дойна	Y-3398	+	+	+	+	-	+	+
Королева виноградників	Y-3425	-	-	-	-	-	-	-
Аркадія	Y-3402	-	-	-	-	-	-	-
Новак чорний	Y-3374	-	-	+	+	-	+	-
Тисяча перший гібрид	Y-3403	+	+	+	+	-	+	+
Двадцять восьмий гібрид	Y-3405	+	+	+	+	-	+	+
Зайбель чорний	Y-3426	-	-	+	+	-	+	+
Зайбель білий	Y-3427	-	-	+	+	-	+	+
Кудрек білий	Y-3395	+	+	+	+	-	-	-

У таблиці детально описані біотехнологічні параметри щодо кожного сорту винограду.

Найбільш перспективними за біотехнологічними показниками, критеріями оцінки яких були ріст дріжджових культур при граничних стресових температурах +4 і +41°C, гранично низьких кислих значеннях рН 2,5 за оцінкою резистентності до 10%-ного етанолу, вироблення сірководню, зростання на середовищі з 50%-ним розчином глюкози та резистентності до сульфітів є дріжджі виділені з сортів винограду: Аліготе USRCB Y-3362; Ркацителі Y-3366; Совіньон Y-3367; Сухолиманський Y-3394; Шардоне Y-3368; Лідія Y-3399; Дністровський рожевий Y-3396; Ізабелла Y-3429; Кримський чорний Y-3373; Молдова Y-3391; Дойна Y-3398; Тисяча перший гібрид Y-3403; Двадцять восьмий гібрид Y-3405; Кудрек білий Y-3395.

Всі інші досліджені культури дріжджів можуть бути використані як тест-культури при тестуванні і дослідженні вітамінів, ферментів, амінокислот, гормонів і рекомендовані при проведенні науково-дослідних робіт.

ВИСНОВКИ

1. Для подальшої селекції дріжджів відбирають найбільш крупні і блискучі колонії.
2. Бродіння сусла із винограду може здійснюватися клітинами дріжджів як близькими за морфологічними характеристиками, так і різними.
3. Особливо важливими показниками при доборі дріжджів є такі біотехнологічні параметри як структура осаду, кислотостійкість (стійкість проти низьких значень рН), холодо- і сульфітостійкість, відсутність накопичення в середовищі сірководню.
4. Для подальшого практичного використання можна рекомендувати 13 культур дріжджів, виділених з сортів винограду: Аліготе, Ркацителі, Совіньон, Сухолиманський, Шардоне, Дністровський рожевий, Ізабелла, Кримський чорний, Молдова, Дойна, Тисяча перший гібрид, Двадцять восьмий гібрид, Кудрек білий. Інші дріжджові культури із сортів винограду, які не

характеризуються високими біотехнологічними властивостями рекомендується використовувати як типові культури дріжджів у науково-дослідній роботі.

5. Рекомендується продовжити дослідження культури дріжджів, виділених зі столових і гібридних сортів винограду.

Враховуючи проведену об'ємну роботу в минулому сезоні під час збору врожаю винограду, у 2010 році планується розширити ареал дослідження в районах зростання столового винограду, таких як Херсонська, Миколаївська, Ужгородська області і Республіки Крим. Якщо серед читачів журналу є технологи, винороби, фахівці з виноградарства, зацікавлені в участі зразків їх винограду в наших подальших дослідженнях, будемо раді співробітничати і прийняти зразки з різних областей для виділення дріжджових культур та лактобактерій, а також дріжджів, що беруть участь в біологічному кислотозниженні вина.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Байрактар В.М. Симбіотична взаємодія дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і бактерій *Lactobacillus* виділених при спонтанній ферментації виноградного суслу/В.М. Байрактар // Виноград – 2010 – №5(28) – С.54–58.
2. Бур'ян Н.І. Мікробіологія виноробства / Н.І. Бур'ян, Л.В. Тюрина – М.: 1979. –255 с.
3. Бур'ян Н.І. Мікробіологія виноробства / Н.І. Бур'ян – Сімферополь: Таврида, 2002. – 433 с.
4. Кишковська С.А. Селекція дріжджів для шампанського виробництва / С.А.Кишковська., Н.І.Бур'ян., Т.П.Чичинадзе.// Виноградарство і виноробство.– 2009 – №3, – С.18-20.
5. Макарова А.С. Виробництво шампанського / А.С. Макарова – Сімферополь: Таврида, 2008. - 415 с.
6. Сарішвили Н.Г. Мікробіологічні основи технології шампанізації вина. / Н.Г. Сарішвили., Б.Б. Рейтблат – М.: Пищепромиздат, 2000.-346 с.

7. Мартиненко Н. Н. Імобілізовані шампанські дріжджі, фізіолого-біохімічні особливості, участь у шампанізації вин. / Н. Н. Мартиненко, І.М. Грачова // Прикладна біохімія й мікробіологія. – 2003, – Т.39, №5, – С. 501–508.

**Селективный отбор перспективных дрожжевых культур
Saccharomyces cerevisiae для биотехнологических целей**

В.Н. Байрактар

Освещены результаты экспериментальных исследований направленных на выделение дрожжевых культур из разных сортов винограда. Изучены свойства и отобраны наиболее перспективные сорта для практического использования в процессах биотехнологии.

Остальные дрожжевые культуры рекомендованы как тест культуры или типовые.

Культуры дрожжей, сорта винограда, биотехнология дрожжей, питательные среды.

**Selective isolation yeast cultures *Saccharomyces cerevisiae* which are
perspective for biotechnological purposes**

V.N.Bayraktar

In article given results of experimental research, which concerns isolation yeast cultures from different sorts of grapes. Selection yeast strains, which are most perspective for practical use in biotechnology of wine making.

Other isolated yeast cultures were recommended for scientific purposes. As test cultures for research for sensitivity to vitamins, enzymes, aminoacids and as type strains.

Yeast cultures, sort of grape, biotechnology of yeast, medies for yeast cultivation.