

МАРТЫНЕНКО НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ПРЕПАРАТИВНЫХ ФОРМ
ДРОЖЖЕЙ РОДА SACCHAROMYCES**

03.00.23. – «Биотехнология»

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва, 2009 г.

Работа выполнена на кафедре «Биотехнология» Московского Государственного Университета Пищевых Производств (ГОУ ВПО МГУПП МОН РФ), в отделе «Биотехнология ферментных препаратов в пищевой промышленности» Всероссийского научно-исследовательского института пищевой биотехнологии (ГНУ ВНИИПБТ) РАСХН.

Научный консультант: Доктор технических наук, профессор
Римарева Любовь Вячеславовна

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук, профессор
Чернов Иван Юрьевич

Доктор биологических наук, профессор
Албулов Алексей Иванович

Доктор технических наук, профессор
Кривова Анна Юрьевна

Ведущая организация: ОАО Государственный научно-исследовательский институт биосинтеза белковых веществ Федерального агентства по управлению Федеральным имуществом (ФГУП ГОСНИИ Синтезбелок)

Защита диссертации состоится «15» мая 2009 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д.006.069.01 ГНУ Всероссийского научно-исследовательского и технологического института биологической промышленности РАСХН (ВНИИТИБП РАСХН) по адресу: 141142, Московская обл., Щелковский р-н, п/о Кашинцево, пос. Биокомбината.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВНИИТИБП.

Отзыв на автореферат в двух экземплярах, заверенный печатью учреждения, просим присылать по адресу: 141142, Московская обл., Щелковский р-н, п/о Кашинцево, пос. Биокомбината. ВНИИТИБП, ученому секретарю Совета.

Автореферат разослан «_____» _____ 2009 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
Кандидат биологических наук

Фролов Ю.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы В условиях современного технически развитого общества, характеризующегося неблагоприятной экологической обстановкой, потребителей всё больше интересует, как питание может отразиться на их здоровье. Анализ информации о состоянии окружающей среды свидетельствует о том, что её загрязнение стало актуальной и очень сложной проблемой.

Несовершенство технологических процессов, отрицательное воздействие на окружающую среду привело к нерациональному использованию огромного количества сырья, изымаемого из природной среды и повышению себестоимости выпускаемой продукции в перерабатывающих отраслях АПК.

Разработка новых ресурсосберегающих технологий при использовании инновационных подходов, позволяющих увеличить объём производимой продукции при сохранении её высокого качества является актуальным решением современных задач всех отраслей пищевой промышленности, включая и винодельческое производство.

Повышение рентабельности производства и улучшение качества готовой продукции может быть обеспечено совершенствованием технологии использования дрожжей-сахаромицетов, играющих важнейшую роль в обеспечении ключевых биотехнологических процессов. В связи с этим огромный практический интерес представляет возможность создания новых активных препаративных форм сухих и иммобилизованных дрожжей, используемых уже за рубежом в ряде технологий. Эти формы дрожжей отличаются от традиционной дрожжевой разводки легкостью и удобством использования, максимальным проявлением всех положительных качеств, новыми ценными свойствами.

Промышленная технология получения таких новых форм дрожжей в России ещё не разработана, поэтому исследования, проводимые в этом направлении, важны, актуальны и представляют несомненный интерес для усовершенствования отечественных биотехнологий, например, в винодельческом и спиртовом производствах.

Создание активных сухих дрожжей (АСД), использование которых дает возможность в любой момент времени получать необходимое количество активно бродящих дрожжей является особенно актуальным, так как значительно облегчит работу заводов, как в сезон, так и в период их запуска. С другой стороны, использование сухих дрожжей ускорит процесс брожения, увеличит выход продукта и улучшит его качество.

В плодово-ягодном виноделии за рубежом практически отсутствуют технологии АСД, а рекомендуемые для этой цели универсальные препараты не пригодны. В России за последние 20-30 лет вообще не проводились работы по выделению и изучению рас дрожжей для производства плодовых вин.

Создание и организация производства высокоэффективных препаратов сухих дрожжей на основе отбора лучших отечественных рас дрожжей по их важнейшим физиологическим и биохимическим признакам, приспособленных к местным условиям и формирующим привычный вкус и аромат готового вина, является важной, актуальной и своевременной проблемой, выходом из создавшегося положения.

Помимо препаратов АСД немаловажное значение имеет и использование иммобилизованных дрожжей (ИД). Сейчас их применение пока ограничено, но создание и использование ИД позволяет решать серьёзные и уникальные задачи,

такие, как ликвидация процесса ремюажа в шампанском производстве, интенсификация брожения за счёт создания сверхвысоких концентраций дрожжей в сусле или виноmateriale, биологическое кислотопонижение вин, устранение недобродов, значительное улучшение органолептических показателей готовых вин.

Эффективных решений по использованию ИД в виноделии пока нет, хотя и встречаются некоторые данные по этому вопросу в зарубежной и отечественной литературе, поэтому актуальным является поиск такого носителя для иммобилизации, который был прочным, обладал хорошими массообменными характеристиками, был бы инертен для вина и исключал бы выход дрожжей в вино в период брожения.

Использование АСД и ИД, безусловно, даёт возможность получения большого экономического эффекта для многих производств, основанных на биотехнологии дрожжей рода *Sacharomycetes*. Научное обоснование биотехнологических процессов получения ИД и АСД позволит не только повысить эффективность бродильных производств, но и внести весомый научный вклад в развитие биотехнологической промышленности.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состояла в разработке теоретических и экспериментальных основ создания высокоэффективных препаратов активных сухих и иммобилизованных форм отечественных винных и спиртовых рас дрожжей рода *Saccharomycetes*.

В задачи исследования входило:

- на основе селекционных работ осуществление скрининга активных рас винных дрожжей по их бродильной активности, ароматическим и другим технологически важным физиолого-биохимическим особенностям;
- изучение основных культуральных, морфологических, физиолого-биохимических, биохимических и технологических свойств отобранных штаммов;
- улучшение морфолого-физиологических, молекулярно-биологических, биохимических и технологических свойств селекционированных рас дрожжей;
- отбор рас дрожжей, наиболее устойчивых к сохранению бродильной активности, на основе которых возможно создание наиболее эффективных препаратов АСД и ИД для производства спирта, шампанских вин, белых и красных виноградных вин, сортовых плодовых вин повышенного качества, устранения недобродов;
- создание биотехнологии винных и спиртовых АСД и ИД;
- разработка способов подавления выхода иммобилизованных клеток дрожжей во время брожения из матрицы носителя для повышения эффективности их действия;
- разработка научных основ и технологии применения АСД и ИД в виноделии и спиртовом производстве;
- разработка эффективных способов реактивации и подготовки к брожению препаратов АСД и ИД;
- проведение промышленных испытаний созданных препаратов АСД и ИД на заводах отечественной винодельческой и спиртовой промышленности;

Рассматриваемые проблемы решались в соответствии с программой «Биотехнология» УНЦ РХТУ им. Менделеева «Влияние экологических факторов на качество пищевых продуктов и пищевых добавок на основе микробного синтеза и разработка более совершенных стандартов контроля качества этих продуктов»; с Межведомственной инновационной программой «Биотехнология для медицины и агропромышленного комплекса»; программы «Научные исследования высшей школы по приоритетным направлениям науки и техники»; проекта «Новые

эффективные биотехнологические процессы микробного синтеза ферментов, антибиотиков, белково-жировых кормовых компонентов и других биологически активных соединений» предложенного ВНИИ Биотехнологии; программы Министерства образования РФ «Университеты России»; Федеральной целевой программы «Интеграция науки и высшего образования России».

Научная новизна работы. В представленной диссертационной работе разработаны биотехнологические основы высокоэффективных препаративных форм дрожжей рода *Sacharomyces*, при этом теоретически обосновано и экспериментально установлено и доказано:

- на основе многоступенчатой селекции и новых экспериментальных данных по результатам сравнительных исследований выделенных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* показана перспективность 13 рас дрожжей, из которых 5 физиологически активных рас обладают высокой биосинтетической способностью по отношению к этанолу и наиболее важным метаболитам, характерным для плодово-ягодного виноделия;
- с использованием современных методов анализа изучены морфологические, физиологические, биохимические и молекулярно-биологические особенности 62 важнейших отечественных селекционированных рас винных и спиртовых дрожжей, установлена их принадлежность к одному биологическому виду *S. cerevisiae*, различающихся между собой по ряду признаков, обозначенных в определителе как переменные;
- впервые обнаружено 5 межвидовых гибридов дрожжей *S. cerevisiae* × *S. bayanus* var. *uvatum*, построено генеалогическое древо штаммов изученных дрожжей;
- получены новые экспериментальные данные и подобраны условия сепарации и обезвоживания дрожжей на сушилке кипящего слоя, позволяющие сохранить до 90% живых клеток, подобрана оптимальная композиция стабилизаторов для обезвоживания дрожжей;
- на основе установленных закономерностей впервые научно обоснована и разработана биотехнология подготовки сухих дрожжей к брожению, позволяющая сократить лаг-фазу развития дрожжевых клеток, интенсифицировать процесс брожения при одновременном улучшении качества продукта;
- исследованы культуральные и технологические свойства сухих винных и спиртовых дрожжей, определены их физиолого-биохимические параметры, используя различные методы оценки качества и хранения препаратов АСД;
- разработаны методы подготовки и хранения биокатализаторов к брожению для ИД;
- исследованы способы иммобилизации дрожжей, свойства и характеристики возможных носителей, свойства иммобилизованных дрожжей;
- впервые разработаны способы подавления выхода клеток иммобилизованных дрожжей в вино во время брожения.

Практическая значимость работы. Проведенные исследования явились основой для создания биотехнологии новых высокоэффективных препаратов активных сухих и иммобилизованных форм отечественных винных и спиртовых рас дрожжей рода *Saccharomyces*, усовершенствования отечественной технологии винодельческого и спиртового производства. Использование сухих и иммобилизованных дрожжей позволяет ускорить процесс брожения, увеличить выход и улучшить качество готового продукта. Наряду с получением ценных продуктов, автором решены следующие ключевые вопросы:

- селекционированы и запатентованы две новые высокоэффективные расы дрожжей-сахаромицетов для производства спирта и направлены на патентование 5 рас для производства плодовых вин;
- разработана и запатентована новая высокопроизводительная и экономичная технология винных и спиртовых АСД, обеспечивающая получение продукции высокого качества;
- составлены ТИ и ТУ технологии винных и спиртовых дрожжей;
- разработана технология применения винных и спиртовых АСД, позволяющая значительно повысить эффективность данных препаратов;
- представленная технология успешно апробирована на Московском дрожжевом заводе, наработаны опытные партии перспективных рас дрожжей;
- подобраны условия реактивации АСД, позволяющие сохранить лаг-фазу развития сухих дрожжей, увеличить процент реактивируемых клеток на 10-15 % даже в неблагоприятных условиях, сократить время подготовки к брожению для шампанских АСД до 2-3 часов;
- определены факторы ингибирования АСД во время их хранения, а также реактивации и брожения, и изучен механизм их действия;
- подобраны наиболее перспективные флуорохромные красители для экспресс-контроля качества АСД с помощью люминисцентной микроскопии, сопряженной с компьютерным анализом изображений;
- разработана и запатентована технология ИД для виноделия на основе криогеля ПВС;
- проведены заводские испытания препаратов АСД и ИД и получены положительные результаты при использовании на винозаводах: ООО «Крона» (Нижегородская обл.), ОАО АПФ «Фанагория» (Краснодарский край), ОАО «Миллеровский винзавод» (Ростовская обл.), ОАО «Корнет» (г. Москва), ОАО «Игристые Вина» (г. Санкт-Петербург), ООО «Ливадия» (г. Ялта, Украина) и спиртзаводе ОАО «Золотой Алтай» (г. Бийск, Алтайский край);
- проведены заводские испытания препаратов ИД при получении шампанских вин бутылочным способом на ОАО «Корнет» (г. Москва).

Разработанные в результате исследований технологии винных и спиртовых АСД и ИД способствуют созданию высокоэффективной технологии шампанских, белых и красных виноградных вин, плодовых вин и технологии спирта.

Результаты исследований по селекции при отборе наиболее продуктивных рас дрожжей, обладающих более ценными свойствами, и изучению ключевых физиолого-биохимических, технологических и молекулярно-биологических особенностей важнейших рас дрожжей рода *Saccharomyces*, будут востребованы при использовании последних в отечественной винодельческой и спиртовой промышленности.

Разработанные в результате исследования технологии новых высокоэффективных препаратов сухих и иммобилизованных дрожжей позволят значительно упростить технологию дрожжей на заводах, облегчая и ускоряя работу заводов, как в сезон, так и в период запуска, интенсифицировать процесс брожения, увеличат выход продукта и улучшат его качество.

Теоретические и прикладные положения работы нашли конкретное воплощение при формировании курса лекций и проведении практических занятий в Московском Государственном Университете пищевых производств, изложены в методических указаниях для студентов высших учебных заведений по

специальности «Биотехнология» и «Технология виноделия», в монографии «Современные препаративные формы дрожжей для виноделия», курсовых и дипломных проектах и работах, а также на многих предприятиях винодельческого и спиртового производства.

Значимость работы подтверждена проведением заводских испытаний новых препаратов АСД и ИД на вин- и спиртзаводах России и Украины, дипломами 1-ой степени по номинации «Биопрепараты и биологически активные добавки» на выставке-конкурсе Министерства образования РФ, Министерства промышленности, науки и технологий РФ, МГУПП, Золотой медалью агропромышленной выставки «Золотая осень-2008».

Основные положения, выносимые на защиту:

- теоретические положения систематики, генетических особенностей и идентификации дрожжей рода *Saccharomyces*, критерии отбора важнейших винных и спиртовых дрожжей для получения препаратов АСД и ИД;
- селекционированные расы винных и спиртовых дрожжей, их морфолого-физиологические, молекулярно-биологические, биохимические и технологические особенности;
- теоретическое и экспериментальное обоснование биотехнологии препаративных форм винных и спиртовых АСД и ИД;
- способ подавления выхода клеток иммобилизованных дрожжей в вино во время брожения;
- технологии применения АСД и ИД в виноделии и спиртовом производстве;
- эффективные способы реактивации и подготовки к брожению АСД и ИД;
- промышленные испытания новых препаратов АСД и ИД на заводах отечественной винодельческой и спиртовой промышленности и на Украине.

Личный вклад автора. Автором на основе анализа научно-технической и патентной литературы теоретически обосновано направление исследований, сформулированы цель и задачи, разработана методология проведения исследований.

Автор лично планировал, организовывал проведение всех испытаний и внедрений, а также обобщал полученные результаты.

Под его руководством и при непосредственном участии определены критерии отбора важнейших винных и спиртовых дрожжей-сахаромицетов, получения препаратов АСД и ИД для винодельческого и спиртового производств; исследованы и определены расы дрожжей для создания новых наиболее эффективных препаратов АСД и ИД для шампанских вин, белых и красных виноградных вин, производства спирта и сортовых плодовых вин; установлены морфолого-физиологические, молекулярно-биологические, биохимические и технологические особенности селекционированных дрожжей.

Автором теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены биотехнологии винных и спиртовых АСД и ИД; под его непосредственным руководством и участии разработаны способы подавления выхода клеток иммобилизованных дрожжей во время брожения; технологии применения АСД и ИД в виноделии и спиртовом производстве, а также эффективные способы реактивации и подготовки к брожению АСД и ИД.

С участием автора и специалистов заводов проведены промышленные испытания новых препаратов АСД и ИД на заводах отечественной винодельческой и спиртовой промышленности и на Украине.

Личное участие автора подтверждается научно-технической и патентной документацией, актами промышленных испытаний.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на российских и международных научно-технических конференциях и симпозиумах: «Пища. Экология. Человек» (МГУПП, май, 1999); «Молодые ученые - пищевым и перерабатывающим отраслям АПК (технологические аспекты производства)» (МГУПП, декабрь, 1999; декабрь 2000); «Biocatalysis-2000: Fundamentals and applications» (Moscow, MSU, 10-15 June, 2000); «Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых ресурсов» (Москва, РХТУ, сентябрь, 2000); «Bioencapsulation in Biomedical, Biotechnological and Industrial Applications» (Warsaw, 11-13 May, 2001); «Качество, безопасность и экология пищевых продуктов и производств. Прогресс в агроиндустрии» (Ялта, 21-25 мая 2001 г.); «Научно-технический прогресс в спиртовой и ликеро-водочной отрасли промышленности» (Москва, 19-20 апреля 2001 г.); «Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях» (Тверь, 2002 г.); «Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии» (Тверь, 2002 г.); «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2003 г.); «Высокоэффективные пищевые технологии и технические средства для их реализации» (Москва, 2003); «Прогрессивные технологии и современное оборудование - важнейшие составляющие успеха экономического развития предприятий спиртовой и ликеро-водочной промышленности» (Москва, 23-24 апреля 2003 г.); «Экологической науке - творчество молодых» (Гомель, 2003); «Биотехнология: состояние и перспективы развития», (Москва, 14-18 марта, 2005); «9-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых» (Пушино, 18-22 апреля, 2005); XXII International Conference on Yeast Genetic and Molecular Biology (Bratislava, 7-12 August 2005); «10-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых» (Пушино, 18-22 апреля, 2006); XXV International Specialized Symposium on Yeasts ISSY-25 (Helsinki, 2006); International Congress on Bioprocessing in Food Production (18-21 June 2006, Patras, Greece, 2006), международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты». Минск. 2008.

По материалам выполненных исследований опубликовано 66 работ, общим объёмом 54 печатных листов, в том числе 38 – в центральных изданиях, получено 6 патентов РФ, опубликована 1 монография.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 485 страницах, включающих 138 таблиц, 134 рисунка и состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследований, 4 глав собственных исследований, выводов, списка литературы, включающего 435 источников, и приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** дано обоснование актуальности проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, охарактеризована научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Глава 1. Обзор литературы.

В литературном обзоре представлены сведения об основных изменениях систематики дрожжей рода *Saccharomyces*, приведена современная классификация рода *Saccharomyces*, которая основана на новой концепции генетического рода

дрожжей. Рассматриваются основные данные зарубежных и отечественных авторов, касающиеся молекулярно-биологических методов идентификации дрожжей, представлены примеры и предложения по идентификации дрожжей рода *Saccharomyces*, используемых в плодово-ягодном виноделии. Освещены вопросы, касающиеся производственных рас дрожжей для получения различных плодово-ягодных вин, показаны технологические особенности каждой расы. Проведен анализ и обобщены данные о применении активных сухих и иммобилизованных дрожжей в виноделии, сделан обзор существующих методов культивирования, сушки и иммобилизации дрожжей. Обоснован вывод о необходимости поиска новых рас дрожжей для сбраживания плодово-ягодных вин, разработки новых технологий плодово-ягодного виноделия и производства спирта при использовании инновационных подходов, позволяющих увеличить объёмы производимой продукции при сохранении её высокого качества, основываясь на использовании абсолютно сухих и иммобилизованных препаративных форм дрожжей. Анализ литературных данных позволил сформулировать цель и задачи данного исследования.

Экспериментальная часть.

Общая схема проведения эксперимента представлена на рисунке 1.

Глава 2. Материалы и методы исследований.

2.1. Объекты исследования.

Объектами исследования были более 80 важнейших винных и спиртовых рас дрожжей рода *Saccharomyces* наиболее часто используемые в различных отраслях бродильных производств (виноградном и плодово-ягодном виноделии: шампанском, спиртовом производстве, пивоварении и хлебопечении), полученные из коллекций: Центральной коллекции Минсельхоза России («Чистые культуры дрожжей, применяемые при производстве пива, безалкогольных напитков и вина); коллекции микроорганизмов Института винограда и вина «Магарач» г. Ялта, Украина; кафедры «Биотехнология» МГУПП; коллекции микроорганизмов ВНИИ пищевой биотехнологии.

Для ПЦР-анализа в качестве контролей использовали моноспоровые культуры *S.cerevisiae* CBS 1171, *S.bayanus* CBS 380, *S.pastorianus* CBS 1538, *S.uvarum* BRM Y-1146, *S.paradoxus* CBS 432 (CBS-Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, the Netherlands).

2.2. Методы исследования.

В работе использовались основные общепринятые методы исследований и селекции, принятые в системе микробиологической промышленности.

Выделение ДНК из клеток дрожжей осуществляли с использованием лизисного буфера [Naumov et al., 1997]. Выделение хромосомной ДНК проводили по методике, описанной Д.Шварц и К.Кантор [Schwarz D.H. et al., 1984] с использованием ферментного препарата Novozym 234 (Novozymes, Дания).

Аmplификацию 5.8S – ITS, IGS2 фрагментов рДНК, генов MET2 и ACT1, митохондриального гена *COX2*, а также ПЦР с микросателлитным праймером (GTG)₅ и множественную ПЦР осуществляли на ДНК-амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) в режимах, описанных в литературе [Наумов Г.И. и др., 2003; Nguen H.V. et al.; Naumova E.S., 2003; Наумова Е.С., 2006].

Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60-65В в 0,5хТВЕ в течение 2 часов.

Анализ полиморфизма длин рестриктазных фрагментов (ПДРФ-анализ) 5.8 S-ITS и IGS2 районов рДНК осуществляли с помощью эндонуклеаз *HpaII*, *HaeIII* и *AluI*, *BanI*, соответственно (“Fermentas” Литва). Рестриктазный анализ амплифицированных генов *MEL* проводили с помощью эндонуклеаз *Hinc II* и *Hind III* (“Fermentas”, Литва). ПДРФ-анализ фрагмента гена *MET2* проводили с помощью эндонуклеаз *EcoRI* и *PstI* (“Fermentas”, Литва), митохондриального гена *COX2* – с помощью эндонуклеазы *PstI* (“Fermentas”, Литва).

Разделение фрагментов рестрикции осуществляли в 1,6%-ном агарозном геле при 60 В в 0,5x TBE в течение 3 ч.

Для разделения хромосомной ДНК использовали аппарат CHEF- DRTM III (“Bio-Rad”, США). Образцы помещали в щели 1%-ного агарозного геля. Пульс-электрофорез проводили при 200В в течение 24 часов: 15 часов при времени переключения полей 60 с и 9 часов при времени переключения полей 90 с (охлаждение до 14°C).

Перенос хромосомных ДНК на нитроцеллюлозную мембрану проводили Саузерн-блотом [Маниатис Т.И. и др., 1984]. В качестве зонда использовали *HindIII*-фрагмент гена ARG4 длиной 3000 п.н., изолированный из плазмиды pINAI. Метку вводили нерадиоактивным методом по инструкции фирмы “Roche Applied Science” (Германия) с использованием дигоксигенина DIG-II-dUTP [Naumov G.I. et al., 1991]. Гибридизацию и проявление гибридизационных сигналов также проводили по инструкции этой же фирмы.

Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе «Vilber Lourmat» (Франция).

Филогенетические родственные связи изучаемых дрожжей-сахарамицетов устанавливали путем сравнения профилей ПЦР-продуктов, амплифицированных с микросателлитным праймером (GTG)₅. Дендрограмму строили с помощью компьютерного пакета TREECON, используя Neighbor-Joining метод [Van de Peer Y. et al., 1994].

При изучении гибридов амплифицированные фрагменты гена *MET2* элюировали из геля с помощью набора “GeneClean Kit” согласно протоколу фирмы-изготовителя (“Bio-101 Inc.” США). Нуклеотидные последовательности фрагмента гена *MET2* размером в 330 п.н. определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 373A (“Applied BioSystem, Англия). На основании сравнительного анализа полученных и уже известных нуклеотидных последовательностей участка гена *MET2* строили филогенетическое древо с помощью компьютерного пакета TREECON, используя алгоритм Neighbor-Joining с поправкой Jukes и Cantor.

Культивирование дрожжей проводили на установке ФК-20, а также дрожжерастильных аппаратах объемом 360; 1200 и 6300 литров, снабженных системой аэрации и мешалкой. Расход питательных веществ при культивировании дрожжей рассчитывали методами, принятым в дрожжевом производстве (Новаковская, 1990; Фараджева, 2002). Сушку дрожжей проводили на сушилке с кипящим слоем марки «Aegomatic» (Германия).

При выполнении аналитических исследований применялись общепринятые физико-химические, микробиологические и биохимические методы анализа, описанные в специальной научно-технической и отраслевой литературе.

Все исследования по световой микроскопии проводили на микроскопе Axioskop 40 FL Zeiss, увеличение объектива ×100. Система документирования:

цифровая камера AxioCam MRc, программа AxioVision 3.1. Фиксированные и нефиксированные клетки окрашивались различными красителями для выявления запасных веществ и органелл. Все методы окраски были адаптированы к изучаемому объекту.

Флуоресцентную микроскопию осуществляли на микроскопе МЛ-2 (ЛОМО, Россия), оснащенном цифровой фотокамерой DSC-S85 (“Sony”, Япония). Источником света служила ртутная лампа ДРШ-250. Учет количества живых клеток проводили при помощи микроскопа Axioscop 40 FL Zeiss (блок светофильтров №02, G 365 нм, FT 395 нм, LP 420 нм, объектив ×40) и цифровой камеры AxioCam MRc, подключенной к компьютеру.

Электронную микроскопию осуществляли на микроскопе “Jeol” (JEM-100B). Подготовка образцов для электронной микроскопии - фиксация в растворе $KMnO_4$ и контрастирование по Рейнольдсу. После резки на ультратоме проводили двойное окрашивание ультратонких срезов на металлических сеточках по Рейнольдсу (1 час в 4% уранилацетате, затем промывка в 3 сменах бидистиллированной воды, окрашивание 30 минут в лимоннокислом свинце в присутствии кристаллов NaOH и снова промывка в 3 сменах бидистиллированной воды).

Основные показатели соков и полученных виноматериалов определяли методами, принятыми на предприятиях винодельческой промышленности [Государственный контроль качества винодельческой промышленности, 2003].

Анализ основных ароматических компонентов осуществляли методами газовой хроматографии - масс – спектрометрии (ГХ-МС), газовой хроматографии - пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД), а также газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Исследование сахаров, кислот и фенольных веществ осуществляли методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы Agilent Technologies (модель 1100), детектор спектрофотометрический на УФ-область. Количественное определение аминокислот в сусле и виноматериалах проводили по известным методикам [Бурьян, 1997; Меледина, 2002] на автоматическом анализаторе KLa-3В фирмы «Hitachi» (Япония).

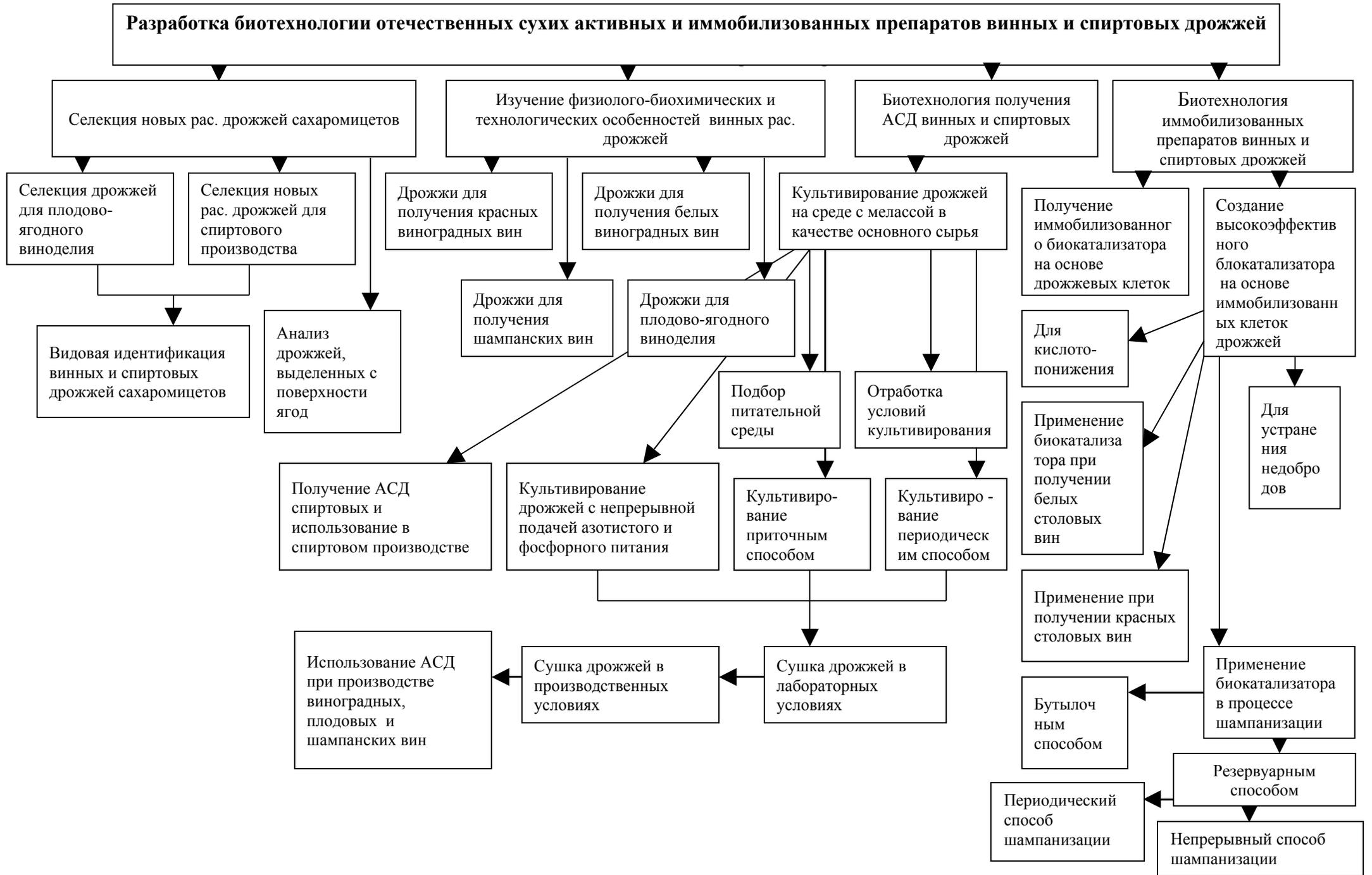
Получение биокатализатора на основе дрожжей, иммобилизованных в криогель ПВС (марка 16/1, «Acros», Бельгия), осуществляли двумя методами: 1) согласно методике, разработанной в лаборатории криохимии биополимеров ИНЭОС РАН, используя криогрануляционную колонну, заполненную гидрофобной жидкостью; 2) суспензию клеток в растворе ПВС распределяли по различным формам, используя дозатор, и замораживали при $-20^{\circ}C$ в воздушной среде, выдерживали в замороженном состоянии $14 \div 18$ ч, а затем размораживали при $+2 \div +8^{\circ}C$.

Жизнеспособность и метаболическую активность иммобилизованных клеток контролировали, определяя концентрацию внутриклеточного АТФ люциферин-люциферазным методом, используя реагент фирмы «Люмтек» (Россия) и люцинометр Microluminometr 3560 New Horizons Diagnostics Co (США).

Микрофотографии гранул криогеля ПВС, получали, используя сканирующий электронный микроскоп Jeol JSM-S300LV (Япония) и световой микроскоп Intel Play QX3 (США).

Полученные экспериментальные данные обрабатывались с применением методов математической статистики [Грачев Ю.П., 2005].

Общая схема проведения экспериментальных исследований представленной работы



Результаты их обсуждение

Глава 3. Селекция новых рас дрожжей-сахаромицетов.

Селекция дрожжей для плодово-ягодного виноделия проводилась путем ступенчатого скрининга дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, выделенных при исследовании дрожжевой микрофлоры плодов и ягод Западной Беларуси. Всего было изучено 481 штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Исследования бродильной активности, накопления спирта, органолептических показателей готового виноматериала, позволило установить 13 штаммов дрожжей, представляющих значительный интерес для использования в плодово-ягодном виноделии. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Штаммы исследуемых дрожжей, рекомендуемых для использования в плодово-ягодном виноделии

№	Название штамма	Субстрат выделения	Место выделения
1.	ВВ-1	виноград	Волковысский р-н, Беларусь
2.	ВВ-2	виноград	Волковысский р-н, Беларусь
3.	ГВ-1	виноград	Гродненский р-н, Беларусь
4.	ГВ-4	виноград	Гродненский р-н, Беларусь
5.	ГСЧ-1	черная смородина	Гродненский р-н, Беларусь
6.	ГСЧ-5	черная смородина	Гродненский р-н, Беларусь
7.	ГСЧ-8	черная смородина	Гродненский р-н, Беларусь
8.	ГСЧ-11	черная смородина	Гродненский р-н, Беларусь
9.	ДЧК-1	черника	Дятловский р-н, Беларусь
10.	ВЧР-3	черноплодная рябина	Волковысский р-н, Беларусь
11.	ГМ-8	малина лесная	Гродненский р-н, Беларусь
12.	ГМ-15	малина лесная	Гродненский р-н, Беларусь
13.	ГМ-17	малина лесная	Гродненский р-н, Беларусь

При дальнейшем изучении биохимических свойств полученных 13-ти штаммов дрожжей при сбраживании яблочного и других соков были выделены пять винных штаммов, представляющих особенный интерес:

- **штамм ГВ-4**, рекомендуемый для сбраживания яблочного сула, отличающийся высокой скоростью брожения и накоплением этанола, глицерина, эфиров, и обеспечивающий наиболее высокую дегустационную оценку полученным виноматериалам. Этот штамм депонирован в ВКПМ под номером У-3098 и в данный момент находится на патентовании (Заявка на получение патента РФ №2003132274);
- **штамм ГСЧ-1**, рекомендуемый для получения яблочных и черносмородиновых виноматериалов с пониженным синтезом высших спиртов и ацетальдегида, и отличающийся высокой бродильной активностью. Штамм депонирован в ВКПМ под номером У-3100 и в данный момент находится на патентовании (Заявка на получение патента РФ №2003132274);
- **штамм ГМ-8**, рекомендуемый для получения яблочных и малиновых виноматериалов с повышенным содержанием спирта и наименьшим содержанием нежелательных летучих компонентов. Штамм депонирован в ВКПМ под номером У-3097 и в данный момент находится на патентовании (Заявка на получение патента РФ №2003132274);

- **штамм ДЧК-1**, рекомендуемый для получения черничных виноматериалов с высокими органолептическими показателями. Штамм задепонирован в ВКПМ под номером У-3096 и в данный момент находится на патентовании (Заявка на получение патента РФ №2003132274);
- **штамм ВЧР-3**, рекомендуемый для получения черноплодно-рябиновых виноматериалов с высокими органолептическими показателями, отличающийся высокой скоростью брожения. Штамм задепонирован в ВКПМ под номером У-3099 и в данный момент находится на патентовании (Заявка на получение патента РФ №2003132273).

Среди спиртовых рас дрожжей были выделены дрожжи расы 985Т и 987-0 обладающие повышенной устойчивостью к повышенным температурам и обладающие осмофильными свойствами (данные представлены в таблице 2).

- **штамм 985-Т**, энергично сбраживающий концентрированное зерновое сусло (СВ-22-26%) при температуре 38-39°C. Штамм задепонирован в ВКПМ под номером У-3137 и запатентован (Патент РФ №2331667);

- **штамм 987-0**, энергично сбраживающий высококонцентрированное зерновое сусло (СВ-32%) при температуре 30-32°C. Штамм задепонирован в ВКПМ под номером У-3136 и запатентован (Патент РФ №2331666).

При сравнении полученных штаммов с наиболее широко используемыми культурами спиртовых дрожжей было показано, что наилучшим вариантом для условия интенсивного спиртового производства является штамм 985-Т, обладающими как термотолерантными, так и осмофильными свойствами и сбраживающими сусло с накоплением наибольшего количества спирта и минимального количества побочных метаболитов за короткое время. Штамм 985-Т является наилучшей исходной культурой для создания препаратов сухих спиртовых дрожжей.

Таблица 2.

Характеристика бродильной активности и синтеза побочных метаболитов различных спиртовых рас дрожжей.

Раса дрожжей	Время брожения						Содержание побочных метаболитов в готовой бражке, мг/дм ³
	24 часа		48 часов		56 часов		
	РВ,г / 100 мл	спирт, % об.	РВг / 100 мл	спирт, % об.	РВ г/100 мл	спирт, % об.	
985-Т	6,10	7,5	1,80	10,0	0,35	10,6	3806
987-0	6,50	7,3	1,80	10,0	0,70	10,3	4138
У-717	6,90	7,0	4,60	8,3	1,40	10,0	4704
У-1986	6,60	7,2	2,00	9,8	1,0	10,2	4809
К-81	10,15	5,0	5,50	7,8	1,90	9,8	6150
ХП-Т	8,35	6,1	4,00	8,5	1,90	9,8	6340
Г-660	8,70	5,9	4,55	8,3	2,30	9,5	6460
985	6,65	7,2	2,30	9,6	1,50	10,0	4360
ВПУ-408	8,20	6,2	3,85	8,6	1,80	9,9	4990

Глава 4. Видовая идентификация важнейших отечественных винных и спиртовых рас дрожжей *Saccharomyces*.

Следующим этапом работы было проведение видовой идентификации важнейших отечественных винных и спиртовых рас дрожжей *Saccharomyces*., так как за последние годы систематика дрожжей рода *Saccharomyces* подверглась многократным пересмотрам и изменениям. Используя современные физиолого-биохимические и молекулярно-биологические методы, проведена идентификация 62 важнейших селекционированных нами рас дрожжей, используемых в спиртовой и винодельческой промышленности до вида согласно последнему определителю дрожжей [Kurtzman, 1998]

Проведено физиологическое тестирование рас дрожжей, в результате изучения морфологических признаков стандартными методами установлено, что большинство исследуемых дрожжей относятся к роду *Saccharomyces* и по определению [Vaughan-Martini A. et.al., 1998] к биологическому виду *S. cerevisiae*, способные сбраживать сахарозу и раффинозу; не сбраживать лактозу, трегалозу; ассимилировать глюкозу, сахарозу, мальтозу трегалозу, раффинозу, этанол; не ассимилировать рибозу, лизин, манит, этиламин; расти при 35 °С; не расти на среде с 0,1% содержанием антибиотика на среде, не содержащей витаминов

Одновременно были выявлены отклонения от стандартного описания для вида *S. cerevisiae*, штаммы ВВ-1, ГСЧ-5, ГСЧ-8, ДЧК-1, Феодосия 1-19, 47-К, 985-Т проявили способность к слабому сбраживанию трегалозы, свойственную дрожжам вида *S. barnettii*; штамм Харьковская-39 ассимилирует рибозу, что характерно для видов *S. castellii* и *S. dairenensis*; штамм 985-Т усваивает рибозу и лизин; штамм У-717 слабо ассимилирует рибозу и лизин; штамм ВВ-2 ассимилирует этиламин и слабо ассимилирует лизин, что характерно для представителей вида *S. kluyveri*; штамм «Я» вырос на среде, содержащей 0,1% антибиотика (циклогексимида), что характерно для штаммов вида *S. exiguous*; все штаммы, выделенные в Беларуси, дали слабый рост на лизине, характерный для *S. kluyveri*, *S. unisporus*, *S. spenserorum* и отдельных штаммов *S. transvaalensis*. Довольно варибельным признаком оказалось сбраживание галактозы - все расы дрожжей разделились по нему на две большие группы.

Ассимиляционные тесты, которые были расширены до 38 источников углерода, так называемый «пестрый ряд», показали, что все исследуемые штаммы ассимилируют глюкозу, сахарозу, мальтозу, трегалозу, раффинозу, галактозу (кроме рас Корнет и Яблочная Анис-6, давшие на ней слабый рост) и этанол. Все штаммы не ассимилируют сорбозу, рамнозу, ксилозу, L- и D-арабинозу, мелибиозу, лактозу, целлобиозу, арбутин, салицин, инулин, глюкозамин, эритрит, рибит, маннит, дульцит, инозит, 5-кетоглюконат, лимонную кислоту. Однако некоторые штаммы *S. cerevisiae* отличаются от стандартного описания. К ним относятся:

- **ВВ-2**, отличающийся способностью расти на среде с этиламином, характерной для вида *S. kluyveri*. Но не сбраживают мальтозу и мелибиозу и ассимилируют маннит.

- **Вишня-18, Сидровая-101, Шампанская 11/12, ГМ-15, ГМ-17, Штейнберг-92, Кокур-3, 47-К** растущие на глицерине, что характерно для вида *S. bayanus*, но все без исключения исследуемые штаммы не растут на безвитаминовой среде;

-штамм **Я**, который вырос на среде с 0,1 % антибиотика, что свойственно *S. exiguous*. Однако, эти дрожжи, в отличие от штамма Я, сбраживают трегалозу, не сбраживают мальтозу, и не растут при 37°C;

-штаммы **985-Т** и **У-717** ассимилируют рибозу и лизин. Ни один из видов рода *Saccharomyces* не проявляет этих двух физиологических свойств одновременно. Ассимиляция рибозы характерна для дрожжей *S. castellii* и *S. dairenensis*, но они не сбраживают сахарозу, мальтозу и раффинозу, а рост на среде с лизином одновременно со способностью сбраживать сахарозу и раффинозу характерен для вида *S. kluyveri*. Но дрожжи этого вида, в не сбраживают мальтозу, что характерно для 62 исследуемых штаммов.

Таким образом, по результатам бродильных и ассимиляционных тестов все исследуемые штаммы относятся к биологическому виду *S. cerevisiae*. Отличия между отдельными штаммами по способности сбраживать отдельные сахара, попадают в разряд переменных признаков. Остальные расхождения между отдельными штаммами находятся в пределах, допустимых для ассимиляционного спектра, определяющего вид.

Далее определяли максимальные температуры роста каждого штамма на твердой питательной среде с содержанием СВ 7%. Диапазон температур 28-53°C. Первый просмотр проводился через 3 дня после высева культур, второй - еще через 3-4 дня. Максимальной температурой роста дрожжевых штаммов считается промежуточная между самой высокой, при которой рост не проявляется в течение 7 дней и предыдущей более низкой температурой. Было выявлено 4 группы дрожжей:

1. При температуре 35-37°C - Корнет; Харьковская-39, Шампанская 11/12, Груша-7, Груша-10, Крыжовниковая-48, Брусничная-7, Яблочная-17, Земляничная Виктория-14, Малиновая Ленинградская, Малиновая-10, Черносмородиновая-5, Рислинг.

2. При температуре 44-46°C - ГСЧ-8, ГСЧ-11, ГМ-8, ГМ-15, ДЧК-1, ВЧР-3, Вишня-18, Яблочная -7, Сидровая-101, Феодосия 1-19, Кокур-3, 47-К, Я, Яблочная Анис-6, К-17, Минская-120, Шампань ПЯ-16, Москва-30, Слива-23, Крыжовниковая-27, Черносмородиновая-7, Смородиновая-22, Вишня-6, Вишня-33, Земляничная-4, Слива-21, Земляничная-9, Холодостойкая-21, Киевская, Бордо-20, Ленинградская, Магарач-125, Магарач 17-35, Ашхабадская-3, Каберне-5, Берегово-1, Ркацители-6.

3. При 46-49°C - ВВ-1, ВВ-2, ГВ-1, ГСЧ-1, ГСЧ-5, ГМ-17, Штейнберг-92.

4. При температуре 49-53°C - 985-Т, У-717.

Полученные данные учитывались при выборе штаммов дрожжей для культивирования и обезвоживания с целью получения препаратов АСВД.

Молекулярно-биологическое исследование штаммов дрожжей проводилось путем изучения амплифицированных 5.8S-ITS и IGS2 фрагментов рДНК исследуемых дрожжей показало, что размеры их одинаковы у всех изученных и тестерных штаммов и составляют соответственно примерно 850 и 1300 п.н., что подтверждает их принадлежность к роду *Saccharomyces*.

Проведён ПДРФ-анализ амплифицированных 5.8S-ITS фрагментов рДНК всех исследуемых штаммов дрожжей, с использованием эндонуклеаз *HpaII* и *HaeIII* показано, что все они имеют идентичные профили с двумя фрагментами размером примерно 730 и 120 п.н., т.е. среди них отсутствуют дрожжи видов *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*. По сходству *HaeIII* рестриктазных профилей все изученные дрожжи разделились на 2 группы. В первую группу вошло

подавляющее большинство изученных штаммов, и ее представители характеризуются наличием четырех *HaeIII*-фрагментов размером примерно 320, 230, 170 и 130 п.н. (рис.2, дорожки 3 и 10-18).



Рис.2

Рис. 2. Рестриктазный анализ амплифицированных 5.8S-ITS-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеазы *HaeIII*. Дорожки: 1- *S. pastorianus* CBS 1538; 2 - *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 380; 3-*S. cerevisiae* CBS 1171; 4 - *S. bayanus* var. *uvarum* ВКМ Y-1146; *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *uvarum*: 5 - ГСЧ-5, 6 - ГСЧ-8, 17 - ГСЧ-11, 8 - Л-80-4, 9 - Шампанская-11/12; *S. cerevisiae*: 10 - Корнет, 11 - Штейнберг-92, 12 - Харьковская-39, 13-301, 14-261, 15- 125, 16-ГВ-1, 17-ГВ-4, 18 - ГСЧ-1. М - маркер молекулярных весов (п.н.) "100 bp DNA Ladder" ("Fermentas", Литва)

Аналогичную картину имеет *HaeIII* рестриктазный профиль типового штамма *S. cerevisiae* CBS 1171. Во вторую группу вошли пять штаммов - ГСЧ-5, ГСЧ-8, ГСЧ-11, Шампанская-11/12, Л-80-4, обладающие уникальными *HaeIII*-профилями 5.8S-ITS участка рДНК (рис.2, дорожки 5-9 соответственно). Штаммы этой группы имеют сложные паттерны, в которых объединены три фрагмента, характерные для *S. bayanus* (около 490, 230 и 130 п.н.) и четыре фрагмента, характерные для *S. cerevisiae* (около 320, 230, 170 и 130 п.н.).

Аналогично разделяются исследуемые штаммы дрожжей по результатам ПДРФ-анализа амплифицированных IGS2 фрагментов рДНК, проведенного с использованием эндонуклеаз *AluI* и *BanI*. Рестриктазные профили некоторых штаммов представлены на рис.3.

Таким образом, проведенный нами ПДРФ-анализ показал, что большинство изученных штаммов относятся к виду *S. cerevisiae* и только пять штаммов (ГСЧ-5, ГСЧ-8, ГСЧ-11, Шампанская-11/12, Л-80-4), представляют собой гибриды *S.cerevisiae*×*S. bayanus* var. *uvarum*

Проведенный кариотипический анализ подтвердил, что большинство штаммов относятся к виду *S. cerevisiae*. Хромосомные ДНК этих штаммов были разделены на 11-14 полос. Согласно интенсивности свечения окрашенных полос некоторые из них содержат более одной хромосомы. Некоторые спиртовые (985-Т, У-717), а также изученные пивные и пекарские штаммы дрожжей обладают сложным кариотипом, насчитывающим более 16 хромосомных полос. Для этих штаммов характерно наличие четырех хромосомных полос размером штамма ГСЧ-5, ГСЧ-8 и ГСЧ-11 по кариотипам не отличались от штамма ГСЧ-1, также изолированного с ягод черной смородины и отнесенного нами по рестриктазным профилям к *S. cerevisiae* (рис. 3А, дорожки 5-8).

Штамм Шампанская-11/12 по своему кариотипу существенно отличается от большинства штаммов и стандарта YNN 295: у него имеется хромосомная полоса

размером около 1300 п.н., характерная для дрожжей *S. bayanus* и *S. pastorianus* (рис. 3А, дорожки 2-4), по своему кариотипу этот штамм напоминает гибридные дрожжи *S. pastorianus*. Два других сбраживающих мелибиозу штамма ВВ-2 и Харьковская-39 имеют кариотипы, типичные для вида *S. cerevisiae*.

Гибридизация по Саузерну выявила только по одной гибридизационной полосе у всех изученных штаммов (рис. 3В), за исключением штамма Шампанская 11/12, у которой маркер характерен для дрожжей *S. bayanus* и *S. pastorianus*, тогда, как у остальных штаммов, включая четыре гибрида (ГСЧ-5, ГСЧ-8, ГСЧ-11, Л-80-4) в положении, характерном для *S. cerevisiae* (рис. 3В, дорожки 1, 5-12)

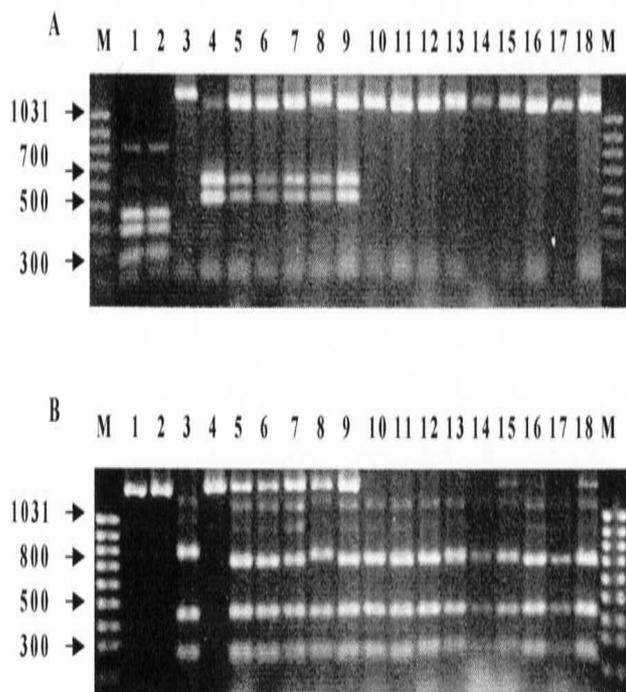


Рис. 3. Рестриктазный анализ амплифицированных IGS2-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеаз *AluI*. (А) и *BanI* (В).

Дорожки: 1- *S. pastorianus* CBS 1538; 2-*S. bayanus* var. *bayanus* CBS 380; 3 - *S. cerevisiae* CBS 1171; 4 - *S. bayanus* var. *ivarum* ВКМ Y-1146; *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *ivarum*: 5 -ГСЧ-5, 6 - ГСЧ-8, 7 - ГСЧ-11, 8 - Л-80-4, 9 - Шампанская-11/12; *S. cerevisiae*: 10 - Корнет, 11 - Штейнберг-92, 12 - Харьковская-39, 13-301, 14-261, 15 - 125, 16-ГВ-1, 17-ГВ-4, 18-ГСЧ-1. М - маркер молекулярных весов (п.н.) "100 bp DNA Ladder" ("Fermentas", Литва).

Рис.3

Множественная ПЦР с двумя парами праймеров, специфичных для *S. cerevisiae* и *S. bayanus*, также подтвердила видовую принадлежность исследуемых дрожжей. У 50 исследованных нами штаммов винных дрожжей амплифицировался только один фрагмент размером около 1700 п.н., характерный для дрожжей *S. cerevisiae* (рис. 4, дорожки 2-10). Для штаммов Шампанская-11/12, ГСЧ-5, ГСЧ-8, ГСЧ-11, Л-80-4, характерно два фрагмента размером около 1700 п.н. и 330 п.н., что соответствует, виду *S. cerevisiae* и *S. bayanus* (рис. 6, дорожки 11-17), что подтверждает их гибридную природу.

Внутривидовой полиморфизм дрожжей *S. cerevisiae* изучали с помощью полимеразной цепной реакции с микросателлитным праймером (GTG)₅. Большинство анализируемых штаммов *S. cerevisiae* имеют ПЦР-профили с мажорными фрагментами размером около 750, 670, 450 и 350 п.н.

На основании сходства паттернов с праймером (GTG)₅ была построена дендрограмма, представленная на рис. 5. Изученные штаммы сформировали отдельный кластер относительно тест-штамма *S. bayanus* var. *ivarum* ВКМ Y-1 146, изолированного с ягод винограда. Внутри этого кластера выделяются несколько групп, объединяющих штаммы с более сходными ПЦР-профилями. Наиболее

многочисленную группу, составили штаммы, выделенные из соков и с поверхности ягод плодово-ягодных растений. Внутри этой группы можно выделить три подгруппы, одна из которых представлена в основном штаммами, выделенными из малинового и грушевого соков. Вторую подгруппу сформировали штаммы, изолированные из земляничного сока, а также из соков ягод кустарниковых растений (смородина и крыжовник). Третья подгруппа включает плодово-ягодные штаммы, выделенные в различных районах Белоруссии. Часть шампанских и винных дрожжей сгруппированы на дендрограмме вместе.

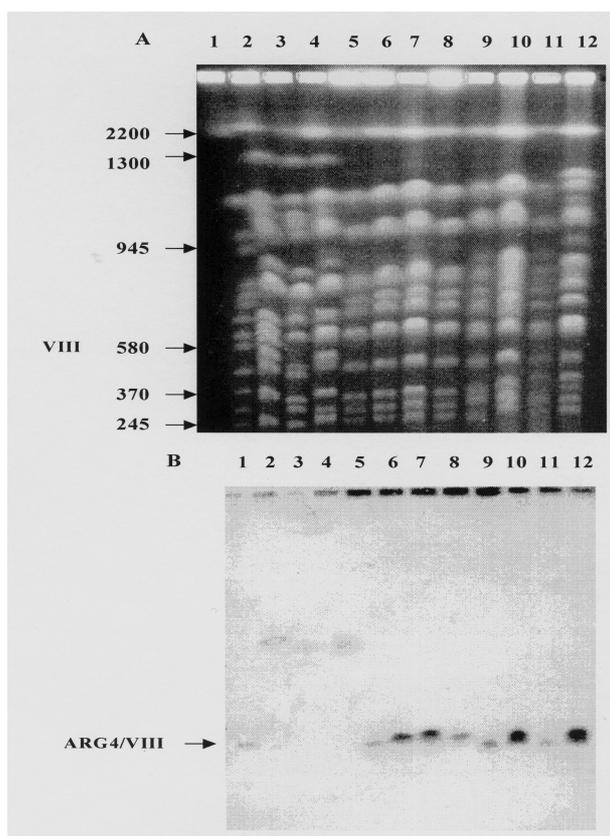


Рис.4. Пульс-электрофорез хромосомных ДНК дрожжей *Saccharomyces* (A) и Саузерн-гибридизация с зондом *ARG4* (B). Дрожжи: 1- *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2- *S. bayanus* var. *ivarum* ВКМ Y-1 146; 3 - *S. pastorianus* CBS 1538; *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *ivarum*: 4 - Шампанская-11/12, 5 - ГСЧ-5, 6 - ГСЧ-8, 7 - ГСЧ-11, 9 - Л-80-4; *S. cerevisiae*: 8 - ГСЧ1, 10 - 301, 11 - 985-Т, 12 - У-717. У717.

Состав геномов обнаруженных нами гибридных штаммов *S. cerevisiae* × *S. bayanus* var. *ivarum* - ГСЧ-5, ГСЧ-8, ГСЧ-11, Л-80-4 и Шампанская-11/12С был подробно изучен с помощью Саузерн-гибридизации, ПДРФ-анализа и секвенирования ядерного гена *MET2* и ПДРФ-анализа митохондриального гена *COX2*. На рис. 6 и 7 указаны результаты ПДРФ-анализа соответственно ядерного гена *MET2* и митохондриального гена *COX2*. Полученные данные свидетельствуют о том, что гибриды ГСЧ-5, ГСЧ-8, ГСЧ-11 и Л-80-4 содержат более полный геном дрожжей *S. cerevisiae*, включая митохондриальную ДНК, и частичный геном *S. bayanus* var. *ivarum*. В то время как гибрид *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *ivarum* (штамм Шампанская 11/12), наоборот, содержит более полный геном *S. bayanus* var. *ivarum* и частичный геном *S. cerevisiae*.

Таким образом, подавляющее большинство винных и спиртовых штаммов дрожжей России, Украины и Беларуси принадлежат к биологическому виду *S. cerevisiae*. Дрожжи вида *S. bayanus* var. *ivarum* среди исследованных отечественных штаммов дрожжей нами не обнаружены, однако установлено, что среди них, особенно в Беларуси, могут встречаться гибриды *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *ivarum*, впервые выделенные нами из естественной среды

Рис.5 Дендрограмма родства штаммов *Saccharomyces*, основанная на матрице различий по ПЦР-профилям с микросателлитным праймером (GTG)s. В качестве внешней группы использован штамм *S. bayanus* var. *ivarum* ВКМ Y-1 146. Данные обработаны по программе Neighbor-Joining из компьютерного пакета TREECON.

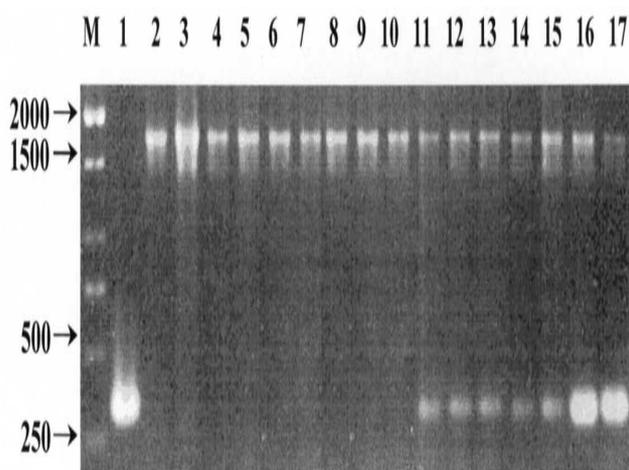
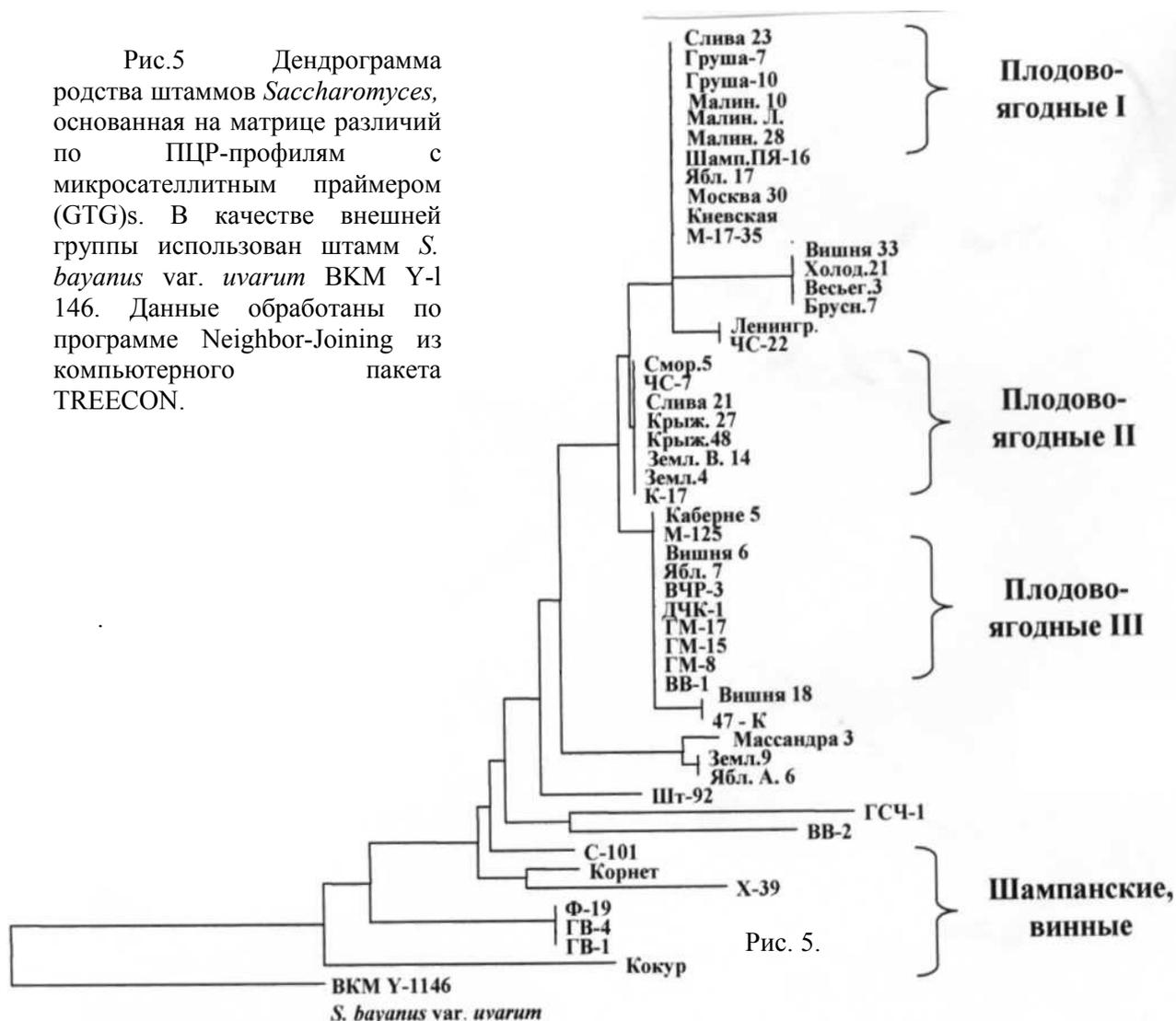


Рис. 6.

Рис.6. Идентификация дрожжей *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и их межвидовых гибридов с помощью множественной (multiplex) ПЦР. Дорожки: *S. bayanus* var. *ivarum*: 1 - ВКМ Y-1 146; *S. cerevisiae*: 2 - ВКМ Y-502; 3 - ГСЧ-1; 4 - ВВ-1; 5 - Яблочная-17; 6 - Крыжовниковая-27; 7 - Слива-23; 8 - Киевская; 9 - Магарач 125; 10 -Холодостойкая 21; *S. cerevisiae* × *S. bayanus* var. *ivarum*: 11 - Шампанская-11/12; 12 - ГСЧ-5; 13 - использован штамм *S. bayanus* var. *ivarum* ВКМ Y-1 146. Данные обработаны по программе Neighbor-Joining из компьютерного пакета TREECON.

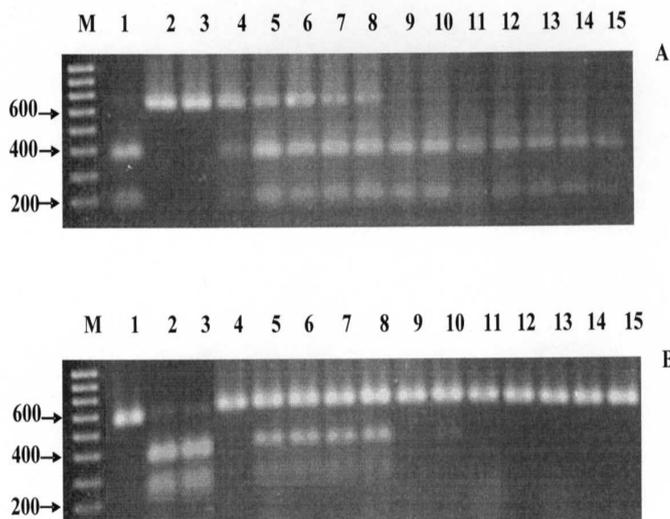


Рис. 7.

Рис. 7 Рестриктазный анализ гена *MET2* штаммов *Saccharomyces* с использованием эндонуклеаз *EcoIII* (А) и *PstI* (Б).

Дрожжи: *S. cerevisiae*: 1 - ВКМ Y-502; 10 - ГСЧ 1; 11 - Сидровая 101, 12 - К 17; 13 - Крыжовниковая-27; 14 - Вишневая-6; Брусничная-7; *S. bayanus* var. *uvarum*: 2 - ВКМ Y-1 146; *S. bayanus* var. *bayanus*: 3 - CBS 380; *S. pastorianus*: 4 - CBS 1538; *S. cerevisiae* × *S. bayanus* var. *uvarum*: 5 - ГСЧ-5; 6 - ГСЧ-8; 7 - ГСЧ-11; 8 - Л-80-4; 9 - Шампанская-11/12. М - маркер молекулярных весов (п.н.) "100 bp DNA Ladder" ("Fermentas").

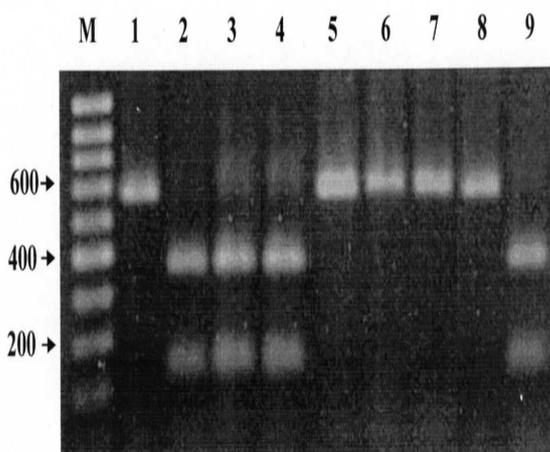


Рис. 8.

Рис. 8 . Рестриктазный анализ амплифицированного фрагмента митохондриального гена *COX2* дрожжей *Saccharomyces* с использованием эндонуклеазы *PstI*.

Дрожжи: 1 - *S. cerevisiae* ВКМ Y-502; 2-5. *bayanus* var. *uvarum* ВКМ Y-1 146; 3 - *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 380; 4- *S. pastorianus* CBS 1538; *S. cerevisiae* × *S. bayanus* var. *uvarum*: 5 - ГСЧ-5; 6 -ГСЧ-8; 7 - ГСЧ-11; 8 - Л-80-4; 9 - Шампанская-11/12. М - маркер молекулярных весов (п.н.) "100 bp DNA Ladder" ("Fermentas", Литва).

Глава 4. Исследование физиолого-биохимических особенностей винных штаммов дрожжей рода *Saccharomyces*.

Исследования проводились с 10 штаммами дрожжей, отобранными нами из нескольких десятков штаммов в результате предварительных испытаний по следующим показателям: бродильной активности, синтезу ароматических веществ, влиянию на качественный и количественный состав органических кислот, фенольных соединений.

Дрожжи для получения красных виноградных вин.

Бродильная активность. Исследована динамика потребления глюкозы и фруктозы и накопление спирта wybranными расами дрожжей, что позволило отобрать штаммы Бордо-20 и Берегово-1 (т), накапливающие наибольшее количество спирта. Установлено также, что среди исследованных дрожжей нет штаммов-фруктофилов – все они быстрее сбраживают глюкозу, а фруктоза остается основным компонентом несброженных сахаров.

Синтез ароматических веществ. Значительное внимание уделено исследованию закономерностей синтеза ароматических веществ штаммами дрожжей. Установлены штаммы 47-К и Берегово-1 (т), у которых не наблюдается резкого увеличения содержания высших спиртов в конце брожения, что, по-видимому, обусловлено большей устойчивостью их клеток к автолизу. Накопление многоатомных спиртов исследованными штаммами происходило постепенно в ходе всего брожения, достигая максимума на 12-15 сутки, что несколько отличается от имеющихся в литературе данных (Ribero-Gayon, 2000). При этом наибольшим накоплением глицерина отличаются штаммы 47-К и Каберне-5. Накопление ацетальдегида, а также этилацетата и других сложных эфиров подчиняется закономерностям, описанным в литературе (Скурихин, 1988). Наилучшим эфиروобразованием отличаются штаммы Феодосия 1-19(т), Каберне-5, а также Ашхабадская-3 и Бордо-20, а наименьшим накоплением ацетальдегида - Ашхабадская-3 и 47-К. Отмечена также отрицательная корреляция между накоплением C_6-C_{10} жирных кислот и бродительной активностью изученных дрожжей.

Влияние на качественный и количественный состав органических кислот.

Что касается органических кислот, то наибольший практический интерес представляет яблочная кислота, повышенное содержание которой является одной из проблем отечественного виноделия. В результате проведенных исследований отобран штамм Берегово-1, который способен усваивать до 17% яблочной кислоты, и может использоваться для частичного кислотопонижения суслу во время его сбраживания. Установлено, что в наибольшей степени содержание яблочной кислоты снижается в самом конце брожения.

Винная кислота дрожжами используется очень мало – максимально установленное снижение – 7-9% при использовании штамма Феодосия 1-19 (т). Содержание лимонной кислоты резко снижается в самом начале брожения, достигая минимума на 10-13 сутки, после чего начинает понемногу возрастать. Отобраны штаммы Феодосия 1-19 (т), Ашхабадская-3 и Берегово-1 (т) способствующие максимальному снижению лимонной кислоты в вине. Содержание янтарной кислоты быстро возрастает с начала брожения, достигая максимума на 10-13 сутки, однако в самом конце брожения ее содержание резко снижается. Содержание пировиноградной кислоты возрастает с самого начала брожения, достигая максимума на 7-8 сутки, после чего оно постепенно снижается. Молочная и уксусная кислоты активно накапливались с начала брожения, однако содержание их было в норме во всех вариантах.

Влияние дрожжей на состав фенольных соединений представляет особый интерес, так как в литературе практически отсутствуют данные по этому вопросу.

Установлено, что в начале процесса брожения доминируют процессы экстракции фенольных веществ (в основном мономерных форм и антоцианов). Особенно это выражено при использовании штаммов Бордо-20, 47-К и Ашхабадская-3, что, по-видимому, обусловлено более высокой активностью в указанных штаммах экстрацеллюлярных ферментов. К концу брожения, наряду с отмиранием клеток дрожжей и осветлением виноматериала, которые сопровождаются снижением концентрации полифенольных соединений и антоцианов в среднем на 30%, резко возрастает интенсивность процесса трансформации полифенольных соединений, о чем свидетельствует возрастание

содержания проантоцианидинов. Установлено, что повышенные дозировки SO₂ способствуют не только ускорению перехода полифенольных соединений во время мацерации, но и сохранению их на стадии осветления виноматериала.

Изучено поведение отдельных групп фенольных веществ во время брожения. Катехины в процессе брожения слабо подвергаются трансформации, их концентрация, увеличивается во время мацерации и снижается на стадии осветления. В большей степени подвержен трансформациям эпикатехин, в то время как катехин и эпикатехингаллат только накапливаются. Антоциановые пигменты подвергаются изменениям, почти не изменяя своего пропорционального соотношения. Нами идентифицированы два новых антоциановых пигмента образующиеся в процессе брожения – это продукты конденсации мальвидин-3-гликозида с пировиноградной кислотой (витисин А) и с п-кумаровой кислотой (витисин В). Содержание кафтаровой и коутаровой кислот непрерывно и плавно снижается во время брожения, а галловой - наоборот возрастает, очевидно, за счет кислотного гидролиза эпикатехингаллата входящего в структуру полимерных процианидинов. Концентрация кверцетина также возрастает к концу процесса брожения, что связано с улучшением его растворимости при повышении содержания спирта в виноматериале. Вещества группы стильбенов, в частности ресвератрол и его гликозид пицеид, обнаружены не были.

Таким образом, исходя из полученных данных, для получения высококачественных красных вин рекомендовано использовать штаммы Бордо-20 и Каберне-5, а для сбраживания высококислотных красных сусел – Берегово-1.

Дрожжи для получения белых виноградных вин.

Бродильная активность. Отобраны штаммы Кокур-3, Ленинградская и Магарач-17-35, накапливающие наибольшее количество спирта. Исследование динамики сбраживания сахаров показало, что, хотя фруктоза более активно потребляется в самом начале брожения, она все же остается основным компонентом несброженных сахаров в вине.

Синтез ароматических веществ. Установлено, что синтез ароматических веществ изученными дрожжами в целом подчиняется закономерностям, описанным в литературе. При этом наиболее благоприятными ароматическими свойствами характеризуются дрожжи Кокур-3, отличающиеся максимальным синтезом сложных эфиров, и 47-К, накапливавшие наименьшее количество высших спиртов и ацетальдегида. В отличие от красных вин, отрицательной корреляции между накоплением C₆-C₁₀ жирных кислот и бродильной активностью не обнаружено. Так, дрожжи Кокур-3, накапливавшие наибольшее их количество, обладали высокой активностью брожения.

Влияние на качественный и количественный состав органических кислот. При изучении закономерностей превращения органических кислот в ходе брожения было установлено, что содержание яблочной кислоты возрастает в первые 4 суток, а затем плавно снижается. В наибольшей степени снижение яблочной кислоты наблюдается при сбраживании дрожжами Ленинградская, что может быть использовано для кислотопонижения сусла.

Винная кислота потребляется в белых винах значительно больше, чем в красных. При этом максимально способствуют ее сохранению штаммы Феодосия 1-19 и Холодостойкая-21. При их использовании концентрация винной кислоты в вине на 0,6-0,8 г/л выше, чем при использовании других штаммов. Лимонную кислоту максимально потребляют Феодосия 1-19, Холодостойкая-21 и Ркацители-6.

Янтарная кислота непрерывно накапливается в течение всего процесса брожения, наименьшим накоплением характеризуется дрожжи Ркацетели-6, Магарач 17-35 и Кокур-3, наибольшим 47-К. Содержание молочной и уксусной кислоты было в норме во всех вариантах.

Влияние на качественный и количественный состав фенольных веществ. Характер изменений концентрации полифенольных веществ в процессе сбраживания сусла сходен для всех использованных дрожжей. При этом прослеживается резкий прирост концентрации фенолов на третьи сутки и плавное снижение ее весь последующий период. Резкое повышение концентрации полифенольных соединений обусловлено их высвобождением из твердых частиц под действием экстрацеллюлярных ферментов дрожжей. В наибольшей степени это выражено для штаммов Магарач 17-35, Ленинградская, Кокур-3 и Массандра-3. Снижение концентрации фенолов свидетельствует о приросте биомассы и меньшим влиянием процессов окисления на формирование полифенольных соединений вина. Наименее окисленные виноматериалы были получены с использованием дрожжей Ркацетели-6, Рислинг Анапский и 47-К.

Состав комплекса полифенолов белого вина, исследованный нами методами ВЭЖХ, представлен на таблице 3.

Таблица 3.

Содержание полифенольных соединений в виноматериалах Рислинг полученных с использованием различных рас дрожжей.

	Галловая	Тирозол	В1	Катехин	В3	Эпикатехин	В2	Эпикатехин-галлат	В7	Кафтаровая	Кутаровая	Кофейная	п-Кумаровая
47-К	1	29	49	8,5	12	12	29	3	4,8	33	3	8	0,3
Кокур-3	0,3	25	43	5	11	12	31	3	4	33	4	8	0,3
Ленинградская	0,3	25	53	5,6	11	14	41	2,9	4,2	31	3,5	7,9	0,3
Магарач-125	0,3	19	49	8	12	12	30	2,9	4,3	34	3,6	8,4	0,3
Магарач-17-35	0,3	25	45	7,7	10	12	30	2,9	4,5	34	3,9	8,4	0,3
Массандра-3	0,5	20	49	9,5	16	12	37	2,9	5	32	3,4	8,1	0,3
Рислинг Анапский	0,3	18	50	4,8	11	12	28	2,9	4,5	32	3,3	8,1	0,3
Ркацетели-6	0,3	18	50	5,6	11	13	32	3,2	4,5	32	3,4	7,9	0,4
Феодосия-1-19	0,1	23	47	11	20	10	31	2,1	4,3	34	2,7	6,3	0,4
Холодостойкая-21	0,1	17	38	9,3	18	10	31	2,4	4,5	33	2,7	6,3	0,4

Показано, что в сусло на первых этапах брожения переходят из твердых частичек в основном только процианидины, далее в процессе брожения концентрация большинства полифенольных соединений снижается. Наиболее подверженными окислительным и конденсационным процессам являются катехин и процианидины. Эпикатехин и эпикатехингаллат менее подвержены трансформации в процессе брожения. Производные оксикоричных кислот в процессе брожения мало подвержены трансформации. Незначительно возрастает концентрация кофейной кислоты образующейся при гидролизе кафтаровой кислоты, концентрация которой несколько снижается на ранних этапах брожения. Концентрация тирозола в процессе брожения возрастает, что объясняется выделением этого компонента в процессе автолиза отмирающих клеток дрожжей.

Сопоставляя результаты анализов комплекса полифенольных соединений белых виноматериалов можно выделить штаммы Ленинградская и Ркацители-6, с наименьшей окислительной активностью, обеспечивающие получение виноматериалов с более высоким содержанием легко окисляемых полифенольных соединений, в то время как дрожжи Холодостойкая-21 и Кокур-3 в наибольшей степени трансформируют полифенольные соединения в процессе брожения.

На основании полученных данных и результатов дегустации виноматериалов рекомендуется использовать для получения высококачественных белых вин штаммы 47-К и Кокур-3. Штамм Ленинградская рекомендуется для переработки высококислотных белых сусел.

Дрожжи для получения игристых вин.

Исследования проводились с 11 штаммами дрожжей, предназначенных для получения шампанских вин. Изучение их бродильной активности позволило отобрать штаммы Харьковская-39, Корнет и Шампанская-39, наиболее активно проводящие шампанизацию вина и накопившие максимальное количество спирта. Изучение ароматических свойств данных штаммов и органолептической оценки шампанских вин показало, что наилучшими являются дрожжи Харьковская-39, обеспечивающие накопление наименьшего количества высших спиртов, и наибольшего количества высших спиртов, и наибольшего – глицерина, а также обеспечивающего получение шампанского с максимальной дегустационной оценкой, что позволяет рекомендовать эти дрожжи как наиболее перспективные для создания препаративных форм.

Дрожжи для получения плодовых вин

Развитие плодово-ягодного виноделия в России на основе отечественных рас дрожжей является очень важной и актуальной проблемой, так как многие вопросы плодово-ягодного виноделия до сих пор не изучены.

В работе использовали яблочные, грушевые, вишневые, черничные, голубичные, черноплоднорябиновые, черносмородиновые, красносмородиновые, брусничные, клюквенные, малиновые и клубничные виноматериалы и 50 рас дрожжей селекционированных в России, Украине, Беларуси для получения плодовых вин.

Для получения высококачественных плодово-ягодных виноматериалов отбирались культуры дрожжей максимально полно сбраживающие сахара сусла (сахарозу, глюкозу и фруктозу), накапливающие наибольшее количество спирта, полиолов, фенолэтанола, сложных эфиров, терпеновых и других веществ, определяющих сортовой аромат вин, и наименьшее количество ацетальдегида, метанола, высших спиртов, жирных кислот и производных фурфурола - все эти соединения определяют вкус и аромат вина. Значительное внимание также уделялось способности дрожжей максимально полно сохранять наиболее полезные для здоровья человека компоненты плодовых вин - аскорбиновую и эллаговую кислоты, а также флавонолы. Исследовался также количественный и качественный состав аминокислот и изменение их содержания в процессе брожения.

На основе комплексного исследования ключевых биохимических и технологических свойств важнейших рас дрожжей для плодово-ягодного виноделия установлено, что лучшими являются следующие штаммы дрожжей: для получения яблочных виноматериалов – ГВ-4 и Сидровая – 101; грушевых – ГВ-4 и груша – 10; вишневых – Вишня-6 и Вишня-18; черноплодно-рябиновых – Вишня-18 и Москва-30; черничных – Вишня-18 и ДЧК-1; голубичных – Вишня-18

и Москва-30; красносмородиновых – Москва-30; малиновых – Москва-30 и ГСЧ-1; клюквенных-ГВ-4; брусничных – Брусничная 7 и ГВ-4; клубничных – Вишня-18 и Земляничная-9.

Глава 5. Технология препаратов винных и спиртовых АСД на основе мелассы, как основного сырья для культивирования дрожжей.

Эта часть работы посвящена разработке технологии получения препаратов винных и спиртовых АСД на основе определенных ранее лучших рас дрожжей и использования их в виноделии (АСВД) и спиртовом производстве (АССД).

При создании отечественных АСВД и АССД при культивировании дрожжей была использована меласса, в качестве основного субстрата. Меласса является довольно необычным субстратом для культивирования этих дрожжей. Поэтому необходимо было скорректировать такие параметры культивирования, как концентрация питательных веществ, температура и рН среды.

На первом этапе исследований определяли возможность роста винных и спиртовых дрожжей на концентрированных мелассных субстратах, так как эти дрожжи менее осмофильно стойкие. Культивирование винных и спиртовых дрожжей на мелассных средах концентрацией СВ от 2% до 17% показало, что в данных условиях они хорошо накапливают биомассу. Установлено, что наиболее экономически выгодным для винных дрожжей является использование мелассных сред с до СВ 14%, а для спиртовых дрожжей 985-Т-среды с СВ до 17%.

На следующем этапе исследований были определены наиболее оптимальные для культивирования винных и спиртовых дрожжей значения температуры и рН. Показано, что температурный оптимум роста винных дрожжей находится от 27 до 33⁰С; шампанских - при 27 ⁰С, и спиртовых – при 35⁰С. Учитывая необходимость применения повышенных температур при получении сухих дрожжей, для стимуляции синтеза трегалозы, можно рекомендовать выращивание шампанских дрожжей в диапазоне температур 27-30⁰С; винных – 30-33⁰С; спиртовых - 33-35⁰С. При температуре 35⁰С растут все дрожжи, что особенно важно при получении АСД шампанских рас – Харьковская 39.

Культивирование при рН 3,0 позволяет снизить риск инфицирования всего технологического процесса, но при этом снижается накопление биомассы, поэтому оптимальным рН среды культивирования для получения винных и спиртовых АСД признан диапазон рН 3,8-4,2.

На практике для получения дрожжей реально используется 2 способа культивирования: периодический и приточный. Первоначально нами было отдано предпочтение периодическому способу, так как он позволяет вести процесс в асептических условиях.

Получение АСД при культивировании периодическим способом.

Разработку технологии препаратов АСД для винодельческого и спиртового производства начали с шампанских дрожжей раса Харьковская-39, поскольку, с одной стороны, к этим дрожжам предъявляются более высокие требования, такие, как чистота брожения и вкус готового вина, а, с другой стороны, они являются значительно менее термостойкими и осмофильноустойчивыми, чем расы дрожжей для других отраслей виноделия и спиртовые дрожжи.

Была разработана технологическая схема производства сухих винных дрожжей, которая предусматривала следующие стадии:

1) Приготовление посевного материала (3 этапа):

- пересев из пробирки в колбу со 100 мл солодового сусла (СВ=10%);
- рассев содержимого колбы в 6 таких же колб. со 100 мл. солодового сусла (СВ=10–12%);
- засев инокулятора общим объемом 10 литров (рабочим – 8 литров), оснащенного системой аэрации содержимым из этих 6 колб. Среда культивирования: смесь мелассы и сусла 1:1 – СВ = 12–14%, K_2HPO_4 – 480 мг; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15 г; MgSO_4 – 48 мг; рН довести серной кислотой до 4,2, дрожжевой автолизат – 80 мл; пеногаситель (Лапрол 3003) – 2 мл.

Длительность каждой из этих 3 лабораторных стадий – 16–18 часов. Культивирование ведут при температуре 27 °С.

2) После окончания культивирования содержимое инокулятора переносят в дрожжерастильный аппарат общим объемом 360 л с объемом среды 250–280 л концентрацией СВ 10%. Соли азота и фосфора вносятся из расчета содержания азота – 4,9%, фосфора – 3,4%, сульфат аммония – 0,523 кг; диаммонийфосфат – 0,198 кг. Дополнительно вносят также источники калия – KCl – 0,16 кг, а также микроэлементы, биотин и пантотеновую кислоту. Культивирование проводят в анаэробных условиях в течение 24 часов. Полученную биомассу дрожжей – 3 кг переводят в дрожжерастильный аппарат общим объемом 1200 литров с объемом среды 950 литров с концентрацией СВ 11%. Источники азота и фосфора вносили из расчета содержания азота – 4,2%; фосфора – 2,9%; сульфат аммония – 2,685 кг; диаммонийфосфат – 1,013 кг. Культивирование проводили при очень слабой аэрации 25 м³ воздуха на 1 м³ среды в час в течение 11 часов. При этом ожидается получение 21 кг биомассы дрожжей. Температуру на стадиях ЧК следовало поддерживать на уровне 27 °С.

Товарную стадию предполагалось проводить в дрожжерастильном аппарате общим объемом 6300 литров, в который добавляют мелассу из расчета концентрации СВ=11%, доводят общий объем среды до 4500 литров. При этом рассчитывали получить 120 кг дрожжей. Соли азота и фосфора вносились из расчета содержания в дрожжах азота – 2,2%, фосфора – 0,9% (оптимальные концентрации при получении сухих дрожжей) – диаммонийфосфата – 2,097 кг; сульфата аммония – 10,676 кг. Дополнительно предполагалось вносить 3,5 кг KCl , микроэлементы, биотин и пантотеновую кислоту. Культивирование предполагалось вести 24 часа, при усиленной аэрации 1 л воздуха / 1 л среды в минуту.

В ходе проведения культивирования выяснилось, что шампанские дрожжи обладают несколько большей удельной скоростью роста, чем это предполагалось. Так в ЧК-1 она составляла 0,147 против 0,112 расчетных, в ЧК-2 – 0,149 против 0,108 расчетных, и на товарной стадии – 0,133 против 0,108. Известно, что выход дрожжей при такой же технологии составляет около 25%, а выход шампанских дрожжей в наших опытах был в 1,5 раза меньшим, что вероятнее всего объясняется несколько иным обменом веществ у шампанских дрожжей. Далее полученную биомассу сепарировали, промывали водой, фильтровали под вакуумом, гранулировали и отправляли на сушку.

Сушка винных дрожжей.

Анализ данных литературы показал, что наиболее перспективными видами сушки являются лиофильная и сушка в кипящем слое. Однако, оборудование для лиофильной сушки очень дорогое, сложное в эксплуатации: процесс сушки на нем

очень длительный и малопродуктивный, поэтому ни один дрожжевой завод не использует лиофильную сушку. В связи с этим, все исследования проводились на сушилке кипящего слоя «Аэроматик» (Германия). Были разработаны несколько режимов сушки, представленные в таблице 4. Полученные данные показывают, что шампанские дрожжи, выращенные периодическим способом, сушку переносят очень тяжело – при этом погибает 70–85% клеток. Наиболее оптимальными при этом были режимы, обозначенные в таблице под номерами 3 и 4.

Таблица 4

Режимы высушивания шампанских дрожжей расы «Харьковская-39»

	Время высушивания, мин.	Заданная температура, t°C	T _{вход}	T _{выход}	Влажность, W, %	Мертвые клетки,
1	0-7	56	20-57	26-30		
	7-12	48	57-50	30-38		
	12-17	42	50-43	38-38	8,62	85%
	17-22	38	43-39	38-37		
	22-27	36	38-37	37-36		
2	0-4	48	25-48	27-27		
	4-8	46	48-46	27-27		
	8-12	42	46-43	27-28		
	12-15	38	43-40	28-30		
	15-20	36	40-36	30-33	7,44	75%
	20-25	33	36-32	33-32		
	25-30	30	32-30	32-31		
	30-37	32	30-32	31-30		
3	0-4	50	30-50	30-30		
	4-8	46	50-47	30-30		
	8-12	40	47-42	30-35	8,46	70%
	12-20	36	42-37	35-35		
	20-35	32	37-32	35-32		
4	0-5	50	25-51	27-39		
	5-18	48	51-49	39-39		
	8-12	40	49-42	39-39	7,58	70%
	12-20	36	42-37	39-32		
	20-30	32	37-34	32-32		
5	0-5	52	23-52	25-28		
	5-8	48	52-50	28-38	8,02	80%
	8-12	42	50-44	38-38		
	12-25	36	44-37	38-35		

Испытания полученных препаратов. Исследования, проведенные на аппарате Варбурга и представленные в таблице 5, показали, что, несмотря на довольно высокое количество мертвых клеток, полученные препараты шампанских АСД обладают значительной дыхательной и бродительной активностью.

Таблица 5.

Активности дыхания и брожения шампанских дрожжей расы Харьковская-39, высушенных в различных режимах.

Варианты	Бродильная активность (мкл CO ₂)	Дыхательная активность (мкл O ₂)
Вариант-1	31,2	35,4
Вариант-2	39,6	58,7
Вариант-3	61,2	69,6
Вариант-4	70,8	89,7
Вариант-5	26,4	24,8
Препарата Seccoferm	23,8	22,5
Контроль Харьковская -39	90,5	107,4

Примечание: №№ вариантов соответствуют №№ режимов сушки

Шампанизация вина в бутылках показала, что все опытные препараты сухих дрожжей даже превосходят по сбраживающей способности и сухие дрожжи Saccoferm производства Дании, и дрожжевую разводку, о чем свидетельствует более высокое содержание спирта (в среднем на 0,3–0,4%), и повышенное давление CO₂ в шампанском, полученном с использованием наших препаратов.

Интересно, что количество физиологически активных клеток в опытных вариантах в конце шампанизации было несколько выше, чем в контроле – несмотря на то, что первоначальное количество живых клеток в них было намного меньше. Общее содержание альдегидов в опытных вариантах было несколько выше, чем в контроле, что свидетельствует об их большей окисленности. Несколько снижалась в опытных вариантах титруемая кислотность, и увеличивалось содержание общей SO₂. По результатам дегустации лучшим был признан опытный вариант №4, полученный с использованием дрожжей, высушенных по режиму №4. Учитывая также и то, что шампанское, полученное с этими дрожжами, имело и ряд других положительных характеристик – высокое содержание спирта, давление углекислоты, количество жизнеспособных клеток и низкое содержание альдегидов – нами рекомендуется использовать для сушки шампанских дрожжей режим №4.

Однако, несмотря на хорошие технологические показатели полученных АСД, высокий % мертвых клеток в них следует считать недопустимым. Это показывает, что культивирование винных дрожжей периодическим способом не дает возможности подготовить их к сушке и поэтому не может быть использовано для получения качественных АСВД. В связи с этим было решено культивировать винные и спиртовые дрожжи приточным способом.

Получение шампанских, винных и спиртовых АСД приточным способом культивирования.

Режим приточного культивирования (его товарная стадия) был отработан на установке ФК-20. Работу проводили с расами шампанских дрожжей Харьковская 39 и Корнет; винных дрожжей Кокур-3 и Вишня-18; спиртовых дрожжей 985-Т.

Поскольку какие-либо сведения по приточному культивированию винных или спиртовых дрожжей в литературе отсутствуют, то режим внесения мелассы был разработан нами эмпирически в расчете на удельную скорость роста 0,090. Было также предложено поднимать в конце культивирования рН среды с 4,2 до 5,8–6,2 для стимуляции синтеза трегалозы. Кроме того, был исследован температурный режим выращивания дрожжей. При этом сравнивались два режима: первый предусматривал выращивание дрожжей при оптимальной температуре и подъем температуры за 2 часа до окончания культивирования до 34–35 °С. Другой режим культивирования предусматривал более высокую температуру 32–34 °С для всех рас дрожжей и поднятие её до 35 °С в конце культивирования. Спиртовые дрожжи культивировали только при t=33 °С с дальнейшим подъемом до 36–38 °С.

Выход дрожжей Харьковская 39 и Корнет снижался при повышении температуры до 65,5% по сравнению с 72,2% при их оптимальной температуре роста, дрожжи Кокур-3 до 60% по сравнению с 69,37% соответственно; Вишня-18 до 60% по сравнению с 69,37% при оптимальных температурах культивирования.

Далее проводили сушку дрожжей по режиму 4, подобранному для сушки дрожжей, культивированных периодическим способом. Результаты свидетельствуют о том, что культивирование дрожжей приточным способом обеспечивает значительно большую выживаемость их при сушке, особенно при культивировании их при повышенных температурах, где выживаемость дрожжей

при сушке была на 19,3-24,7% выше, чем при культивировании при температуре, оптимальной для роста.

Кроме того, нами была изучена возможность повышения выживаемости дрожжей путем их обработки композицией поверхностно-активных веществ, используемых при сушке хлебопекарных дрожжей. Композиция состояла из глицеридов стеариновой кислоты, лимонной кислоты и этиленгликоль стеарата, добавлялась в количестве 0,3-1,0% к сухому весу дрожжей в виде водной эмульсии с СВ 5-25% и выдерживалась 20-30 минут. Данные по влиянию эмульгатора на выживаемость дрожжей во время сушки представлены в таблице 6. Как видно из таблицы процент мертвых клеток при концентрации эмульгатора 0,3 % к сухому весу составлял в среднем 26%, дальнейшее увеличение эмульгатора малоэффективно и кроме того снижаются органолептические показатели готового вина.

Таблица 6

Влияние концентрации эмульгатора на выживаемость шампанских и винных дрожжей во время сушки (% мертвых клеток).

Раса дрожжей	Концентрация эмульгатора, %					
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Харьковская -39	38,2	32,3	29,3	29,4	30,1	26,2
Кокур-3	35,4	28,3	25,8	27,1	26,8	23,1
Вишня-18	38,2	34,4	29,3	30,2	30,0	28,2
985-Т	37,1	33,4	25,6	27,3	26,2	26,6

Установлено также, что режим подачи азота и фосфора при культивировании дрожжей играет важную роль в обеспечении получения их, устойчивых к сушке. Наилучшим вариантом является внесение 15% источников азота и фосфора в складку, а остальное количество – равными частями на протяжении всего процесса культивирования за исключением последних 3 часов. Данный режим притока азота и фосфора практически не оказывает эффекта на выход биомассы дрожжей, но значительно повышает устойчивость дрожжей к сушке.

Таблица 7

Сушка винных и спиртовых дрожжей, выращенных с непрерывным режимом притока азота и фосфора.

Раса	Влажность, %	Доля мертвых клеток, %
Харьковская -39	7,26	26,2
Вишня-18	7,13	25,0
985-Т	7,72	19,5

Промышленные испытания разрабатываемой технологии АСВД и АССД проводили в экспериментальном цехе Московского дрожжевого завода ООО «Дербенёвка-2», оборудованного дрожжерастильными аппаратами объёмом 360 дм³, 1200 дм³ и 6300 дм³, а также сушилкой кипящего слоя «Aeromatic». Режимы культивирования разрабатывались с учетом производственных возможностей предприятия. Разработанная технология АСВД и АССД предполагает культивирование дрожжей в 4 стадии:

- 1) лабораторная (в 3 этапа) аналогично описанной ранее для культивирования дрожжей периодическим способом;
- 2) стадия ЧК-1 - проводится в аппарате объёмом 360 дм³ по технологическому режиму, приведенному в таблице 8;
- 3) стадия ЧК-2 – проводится в аппарате объёмом 1200 дм³ по технологическому режиму, приведенному в таблице 9;

- 4) товарная стадия – проводится при повышенной температуре, подобранной для каждой расы дрожжей в предварительных исследованиях, по схеме с использованием сразу двух аппаратов объемом по 6300 дм³. При этом биомасса дрожжей предварительно наращивается в одном аппарате, а затем половина полученной биомассы используется в качестве засевого материала для другого аппарата и затем культивирование ведут еще 10-12 часов уже в двух аппаратах.

В качестве примеров, в таблицах 10,11 и 12 приведены технологические режимы культивирования, разработанные соответственно для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* рас Харьковская-39, Кокур-3 и 985-Т.

Таблица 8.

Технологический режим культивирования винных и спиртовых дрожжей на стадии ЧК-1.

Время задачи	Масса загружаемых материалов	Вап парата	Концентрация		Т	рН	Аэрация	
			дрожжей	СВ				
час	кг	м ³	г/дм ³	%	°С	ед.		
0	Меласса, М46 (раствор 700 кг М46/м ³)	0,23		16	31	4,3-4,8	Слабая непрерывная	
	-52,2 (75 л)							
	Диаммонийфосфат							-0,15
	Сернокислый аммоний							-0,05
	Калий хлористый							-0,18
	Биотин, мг							-8,3
	Пантотенат кальция, г							-2,61
	Микроэлементы, табл.							-1
	Вода							-155
Серная кислота, см ³	-250							
Стерилизация питательной среды подачей острого пара в аэрационную систему: при давлении Р=1,8 кгс/см ² в течение т = 0,5-1,0 ч								
0	Засевные дрожжи (8 дм ³ - 200 г. биомассы)	0,25	0,4	14-15	28-33	4,5-5,0	Слабая непрерывная	
14-16	Конечные дрожжи – 2,8-4,0 кг	0,25	16	4-4,5	28-33	4,3-4,6	Слабая непрерывная	

Таблица 9.

Технологический режим культивирования винных и спиртовых дрожжей на стадии ЧК-2.

Время	Масса загружаемых материалов	Вап	Концентрация		Т	рН	Аэрация	
			дрожжей	СВ				
час	кг	м ³	г/дм ³	%	°С	ед.		
0	Меласса, М46 (раствор 700 кг М46/м ³)	0,5		16	33	4,3-4,8	Слабая непрерывная	
	-113,4 (162 л)							
	Диаммонийфосфат							-0,6
	Сернокислый аммоний							-1,02
	Калий хлористый							-0,4
	Биотин, мг							-18,1
	Пантотенат кальция, г							-5,67
	Микроэлементы, табл.							-3
	Вода							-338
Серная кислота, см ³	-650							
Стерилизация питательной среды подачей острого пара в аэрационную систему: при давлении Р=1,8 кгс/см ² в течение т = 0,5-1,0 ч								
0	Засевные дрожжи (2,8-4,0 кг – 0,25 м ³)	0,75	2,9	14-15	12-13	4,5-5,0	Слабая непрерывная	
14-16	Конечные дрожжи – 21-30,0 кг	0,75	42,9	4-4,5	28-33	4,3-4,6	Слабая непрерывная	

Таблица 10.

**Производственное культивирование шампанских дрожжей Харьковская-39.
Товарная стадия. Аппарат Т-1**

Время брожения	Меласса	СА	ДАФ	KCl	Набор	T	CB	pH	Ф.ч	Накопление	Биомасса
ч	л	кг	кг	кг	м ³	°C	%	ед	мл	г/л	кг
Р.	17	1,91	0,67	0,38	2,0	33		4,2			
Н/б	16	1,12	0,28	-	3759	33	2,1	4,2	1,8	9,2	34,5
1	19					33		4,2			
2	23	1,61	0,39	-	4190	33	2,1	4,25	2,0	8,4	35,2
3	20				4190	33				11,6	48,6
4	20	2,06	0,51	0,93	4190	33	2,2	4,3	2,2	12,8	53,6
5	25					33				14,7	
6	25	2,5	0,6	-	4344	33	2,5	4,3	3,0	15,2	66,0
7	25					33				17,6	
8	41	3,58	0,89	-	4498	33	2,8	4,4	2,8	20,4	91,8
9	45		-			33				20,4	
10	25	—		—	5268	33	2,8	34,2	3,4	16,8	88,5
11	35	1,5	0,7	0,57	2804	33	3,0	4,2	3,2	27,6	77,4
12	40					33		4,2			
13	40	1,5	0,4		3112	33	3,5	4,3	3,0	35,2	109,5
14	40					33		4,4			
15	45	—	0,9	-	3266	33	3,6	4,6	3,0	40,0	130,6
16	45					33		4,6			
17	45		0,9	1,2	3574	33	3,6	4,6	2,0	40,0	142,9
18	20				3605	33	3,6	4,6	1,2	43,2	144,2
19	20					33,5		4,7		45,0	162,2
20	40				3882	34	3,8	5,0	0,8	43,2	167,7
21						34,5		5,2	0,6		
22					4036	35	3,9	5,4	0,4	48,4	195,3

**Производственное культивирование шампанских дрожжей Харьковская-39.
Товарная стадия. Аппарат Т-2**

Время брожения	Меласса	СА	ДАФ	KCl	Набор	T	CB	pH	Ф.ч	Накопление	Биомасса
ч	л	кг	кг	кг	м ³	°C	%	ед		г/л	кг
Р.	25	-	0,9	0,57		32					
Н/б	35	0,5	0,7		2837	33	3,0	4,2	3,2	31,2	88,5
1	40	0,5				33		4,2			
2	40	0,5	0,4		2961	33	3,5	4,2	3,4	30,4	90,0
3	40	0,5		1,2		33		4,2			
4	45	0,5	-		3270	33	3,8	4,2	3,4	37,6	123,0
5	45	0,5				33		4,2			
6	45		0,9		3580	33	3,5	4,15	2,0	44,4	158,9
7	25				3611	33	3,8	4,3	1,4	46,4	167,5
8	25					33,5		4,7		49,5	178,7
9	40				4013	34	3,8	5,0	0,8	44,0	176,6
10	дображивание					34,5		5,2			
11					4137	35	3,9	5,4	0,4	45,6	188,6

Таблица 11.

**Производственное культивирование винных дрожжей Кокур-3.
Товарная стадия. Аппарат Т-1.**

Время брожения	Меласса	СА	ДАФ	KCl	Набор	T	СВ	pH	Ф.ч	Накопление	Биомасса
ч	дм ³	кг	кг	кг	м ³	°C	%	ед	мл	г/дм ³	кг
Р.	17	1,91	0,67	0,38	2,0	33		4,2			
Н/б	16	1,12	0,28	—	3759	33	2,1	4,2	1,8	10,0	37,59
1	19					33		4,2			
2	23	1,61	0,39	—	4190	33	2,1	4,25	2,0	9,3	38,97
3	20				4190	33					
4	20	2,06	0,51	0,93	4190	33	2,2	4,3	2,0	13,4	56,15
5	25					33					
6	25	2,5	0,6	-	4344	33	2,5	4,3	1,7	15,9	69,07
7	25					33					
8	41	3,58	0,89	-	4498	33	2,8	4,4	1,8	22,5	101,21
9	45		-			33					
10	25	—		—	5268	33	2,8	4,2		21,8	114,84
11	35	1,5	0,7	0,57		33	3,0	4,2	2,2		
12	40				3112	33		4,2		29,3	91,18
13	40	1,5	0,4			33	3,5	4,3	2,0		
14	40				3266	33		4,4		37,0	120,84
15	45	—	-	1,2		33	3,8	4,6	2,0		
16	45				3574	33		4,6		43,5	155,47
17	45		0,9			33	3,8	4,6	2,0		
18	20				3605	33	3,8	4,6	1,2	48,2	173,76
19	20					33,5		4,7			
20	40		0,9		3882	34	3,9	5,0	0,7	49,9	193,71
21						34,5		5,2	0,5		
22					4036	35	4,0	5,4	0,2	52,3	211,08

**Производственное культивирование винных дрожжей Кокур-3.
Товарная стадия. Аппарат Т-2.**

Время брожения	меласса	СА	ДАФ	KCl	Набор	T	СВ	pH	Ф.ч.	Накопление	Биомасса
ч	л	кг	кг	кг	м ³	°C	%	ед		г/л	кг
Р.	25	-	0,9	0,57		32					
Н/б	35	0,5	0,7		2837	33	3,0	4,2	2,4	32,0	90,78
1	40	0,5				33		4,2			
2	40	0,5	0,4		2961	33	3,6	4,2	2,4	36,2	107,19
3	40	0,5				33		4,2			
4	45	0,5		1,2	3270	33	3,9	4,2	1,6	38,9	127,20
5	45	0,5				33		4,2			
6	45		0,9		3580	33	3,8	4,15	1,4	47,9	171,48
7	25				3611	33	3,8	4,3	1,2	51,6	186,33
8	25					33		4,7			
9	40				4013	34	3,9	5,0	0,8	49,3	197,84
10	дображивани					35		5,2	0,5		
11					4137	35	4,0	5,4	0,4	52,8	218,43

Таблица 12.

**Производственное культивирование спиртовых дрожжей 985-Т.
Товарная стадия. Аппарат Т-1.**

Время брожения	Меласса	СА	ДАФ	КСІ	Набор	Т	СВ	рН	Ф.ч	Накопление	Биомасса
ч	дм ³	кг	кг	кг	м ³	°С	%	Ед.	мл	г/дм ³	кг
Р.	17	1,91	0,67	0,38	2,0	33		4,2			
Н/б	16	1,12	0,28	-	3759	33	2,1	4,2	1,8	10,7	37,59
1	19					33		4,2			
2	23	1,61	0,39	—	4190	33	2,1	4,25	2,0	10,9	38,97
3	20				4190	33					
4	20	2,06	0,51	0,93	4190	33	2,2	4,3	2,0	14,2	56,15
5	25					33					
6	25	2,5	0,6	-	4344	33	2,5	4,3	1,7	17,1	69,07
7	25					33					
8	41	3,58	0,89	-	4498	33	2,8	4,4	1,8	24,9	101,21
9	45		-			33					
10	25	-		-	5268	33	2,8	34,2		22,3	114,84
11	35	1,5	0,7	0,57		33	3,0	4,2	2,2		
12	40				3112	33		4,2		31,3	91,18
13	40	1,5	0,4			33	3,5	4,3	2,0		
14	40				3266	33		4,4		39,3	120,84
15	45	-	-	1,2		33	3,8	4,6	2,0		
16	45				3574	33		4,6		45,7	155,47
17	45		0,9			33	3,8	4,6	2,0		
18	20				3605	33	3,8	4,6	1,2	51,3	173,76
19	20					34		4,7			
20	40		0,9		3882	35	3,9	5,0	0,7	57,8	193,71
21						36		5,2	0,5		
22					4236	38	4,0	5,4	0,2	57,9	224,08

**Производственное культивирование спиртовых дрожжей 985-Т.
Товарная стадия. Аппарат Т-1.**

Время брожения	меласса	СА	ДАФ	КСІ	Набор	Т	СВ	рН	Ф.ч	Накопление	Биомасса
ч	л	кг	кг	кг	м ³	°С	%	ед	.	г/л	кг
Р.	25	-	0,9	0,57		32					
Н/б	35	0,5	0,7		2837	33	3,0	4,2	2,4	32,7	90,78
1	40	0,5				33		4,2			
2	40	0,5	0,4		2961	33	3,6	4,2	2,4	38,1	107,19
3	40	0,5				33		4,2			
4	45	0,5		1,2	3270	33	3,9	4,2	1,6	40,3	127,20
5	45	0,5				33		4,2			
6	45		0,9		3580	33	3,8	4,15	1,4	49,8	171,48
7	25				3611	33	3,8	4,3	1,2	53,8	186,33
8	25					33		4,7			
9	40				4013	34	3,9	5,0	0,8	54,2	197,84
10	дображивание					35		5,2	0,5		
11					4337	35	4,0	5,4	0,4	56,9	225,6

Схема с одновременным задействованием двух товарных аппаратов позволяет эффективнее использовать имеющиеся производственные мощности. Как показывают данные таблиц 10-12, разработанный нами режим культивирования позволяет получить 384-450 кг биомассы дрожжей (СВ=25%) с двух дрожжерастильных аппаратов объемом по 6,3 м³ каждый при задействовании их в течение 22 и 11 часов.

Химический анализ полученных винных и спиртовых АСД показал, что содержание трегалозы в них 14,7%, что свидетельствует о стойкости их к высушиванию и длительному хранению. Содержание живых клеток – в пределах 75-80%, содержание азота и фосфора 1,7% и 0,97% соответственно, влажность – 7,6%, посторонней микрофлоры не более 0,01% от общего количества клеток, в том числе диких дрожжей $\leq 0,005$, бактерий $\leq 0,02\%$.

Полученные препараты АСВД полностью отвечают требованиям, предъявляемым МОВВ к препаратам активных сухих дрожжей.

Исследование качества сухих винных и спиртовых дрожжей.

Изучены различные методы оценки жизнеспособности АСВД и АССД. Особое внимание было уделено усовершенствованию методов флуоресцентной микроскопии. В этой связи был проведен различных флуорохромов, позволяющих эффективно и избирательно проводить дифференциальную окраску поврежденных и интактных клеток сухих дрожжей. Установлено, что наиболее перспективными являются бромид этидия (3,8 диамино-5-этил-6-фенилфенантридиниум, бромид) и ДАПИ (4,6-диамидино-2-фенилиндол, дилактат). Витальная окраска этими двумя флуорохромами, имеющими разный цвет флуоресценции, с одной стороны позволяет достоверно определять поврежденные клетки дрожжей, а с другой - дает возможность применять компьютерные методы обработки и анализа изображений, основанные на избирательности по цвету, что значительно ускоряет и упрощает количественный анализ, по сравнению с традиционными методами.

Исследованы также методы хранения полученных препаратов АСД. Установлено, что оптимально хранить сухие дрожжи в вакуумной упаковке при температуре 4-6°C. В этих условиях падение активности полученных препаратов составляет около 1% в месяц. Показано, что при разгерметизации упаковки жизнеспособность дрожжей падает с 70% до 5% за 2 месяца, даже при хранении их при оптимальной температуре.

Разработка методов высокоэффективной подготовки АСВД и АССД.

В ходе исследований по данной теме была впервые разработана и научно обоснована технология подготовки сухих дрожжей к брожению. При этом были изучены цитологические и физиолого-биохимические особенности сухих дрожжей при различных способах восстановления их активности, показавшие что:

- на первых этапах реактивации сухие дрожжи крайне чувствительны к различным ингибиторам, наибольшее значение среди которых имеют этиловый спирт и низкое значение рН ($\leq 2,5$) среды. Исследованы механизмы действия данных ингибиторов. В то же время установлено, что высокое содержание сахаров в среде реактивации (до 20%) ингибирующего действия практически не оказывает;

- предварительная регидратация сухих дрожжей, рекомендуемая многими исследователями, крайне слабо влияет на ход их дальнейшего восстановления жизнеспособности и практически является бесполезной;

- на восстановление активности сухих дрожжей большое значение имеет присутствие в среде углеводов, среди которых наибольшим стимулирующим

действием обладает сахароза в концентрации 10%, и источников азота, лучшими из которых являются соли аммония. Некоторым стимулирующим действием обладает также витамин В₁, однако его следует использовать очень осторожно, поскольку при использовании его повышенных дозировок наблюдается обратный эффект – ухудшение физиологической активности клеток и нарушение их структуры;

- особенный интерес для быстрого восстановления активности дрожжей представляют комплексные активаторы брожения, созданные на основе солей аммония, витамина В₁ и микроэлементов, наиболее эффективным из которых был признан коммерческий препарат «Суперактиватор ДЧ» (производство компании «Dal Cin», Италия).

- лучшим вариантом подготовки сухих дрожжей к брожению является непосредственное их внесение, содержащую 10% сахарозы, и 0,3 г/л комплексного активатора «Суперактиватор ДЧ» с выдержкой в ней в течение 2-3 часов при температуре 35°C. Принципиально важным является то, чтобы для ее приготовления не использовались виноматериалы или другие спиртосодержащие жидкости. Данный способ подготовки позволяет дрожжам восстановить структуру их клеток и подготовить их к дальнейшему контакту со спиртом, что особенно важно для сухих шампанских дрожжей.

- разработанный метод позволяет не только интенсифицировать процесс брожения, но и улучшить качество готового продукта за счет большего накопления спирта, глицерина и других важных веществ.

Физиолого-биохимические особенности сухих винных дрожжей

Исследования в этом направлении особенно интересны, поскольку несмотря на большое количество работ, посвященных сухим винным дрожжам, в литературе практически отсутствуют работы, где сравнивались бы препараты винных АСД и культуры исходных дрожжей, на основе которых они были созданы.

Наши исследования показывают, что высушенные дрожжи обладают целым рядом особенностей по сравнению с обычными дрожжами:

- они характеризуются меньшей удельной бродильной активностью, но при этом более активно размножаются, что приводит к накоплению большего количества клеток;

- высушенные дрожжи обеспечивают более глубокое выбраживание сахаров, накапливая больше спирта и СО₂, последнее особенно ценно при производстве шампанских вин.

- при использовании высушенных дрожжей происходит увеличение содержания в вине как желательных (глицерин, фенилэтанол), так и нежелательных его компонентов (изопентанол, уксусная кислота, и ацетальдегид). Влияние же на синтез большинства других ароматических компонентов процесса высушивания является неоднозначным и зависит от расы дрожжей;

- высушенные дрожжи способствуют повышенной экстракции фенольных веществ, в частности, антоцианов, во время сбраживания красных виноградных и плодовых вин и положительно влияют на интенсивность окраски полученных виноматериалов.

В целом, применение сухих дрожжей в наших исследованиях благоприятно сказывалось на качестве вин и виноматериалов, обеспечив ему в производственных испытаниях более высокую дегустационную оценку, по сравнению с обычными дрожжами, что подтверждается актами испытаний с винозаводов России и Украины.

Глава 6. Разработка биотехнологии иммобилизованных дрожжей в виноделии.

Иммобилизованная форма дрожжей в виноделии представляет значительный практический интерес, но дает возможность решать достаточно серьёзные проблемы в аспекте повышения рентабельности производства при значительном улучшении качества продукта.

Целью настоящей части работы является получение иммобилизованных винных дрожжей и изучение возможности их использования в виноделии.

Первым этапом работы была иммобилизация дрожжей в криогель ПВС, включающая стадии накопления биомассы, приготовление растворов ПВС, замораживание суспензии клеток в растворе полимера и оттаивание гранул, что представляет довольно сложный процесс, с точки зрения многочисленности факторов, влияющих на характеристики биокатализатора

В работе необходимо было подобрать такие условия иммобилизации дрожжей в криогель ПВС, при которых обеспечивалась бы максимальная жизнеспособность дрожжей в процессе формирования биокатализатора с последующей максимальной метаболической активностью иммобилизованных клеток в бродильных процессах.

Для этого в работе были использованы клетки дрожжей *Sacharomycetes cerevisiae* Шампанская-39, выращенные традиционным способом (на винном материале, pH 3,0) и выращенные в других условиях на традиционной среде роста на винном материале, но со значениями pH 5,0 и 7,0, при разной температуре: 15°C, 20°C, 30°C, а также на питательной полусинтетической среде (pH 5,6), часто применяемой для культивирования дрожжей.

С увеличением температуры культивирования от 15°C до 30°C удельная скорость роста дрожжей на винном материале увеличивалась практически пропорционально, примерно в 1,5 чем при культивировании на полусинтетической среде, pH не влияло на удельную скорость роста и на накопление биомассы дрожжей. Выход влажной биомассы клеток на винной среде составляло 7г/дм³, а на полусинтетической -15г/дм³.

Далее проверялось влияние условий культивирования клеток, изменение состава среды, температура и длительность процесса на бродильную активность дрожжей.

Бродильная активность дрожжей, выращенных на полусинтетической среде, практически не отличается от активности дрожжей, выращенных на винном материале, однако по биохимическим характеристикам имеются существенные отличия. Удельная концентрация трегалозы в дрожжевых клетках, выращенных на полусинтетической среде почти на 120 % выше, чем на винном материале, что свидетельствует о лучшей подготовке дрожжей к стрессовой ситуации, возникающей при их иммобилизации, так как трегалоза сохраняет целостность клетки при неблагоприятных условиях культивирования.

Уровень внутриклеточного АТФ в дрожжевых клетках, выращенных на полусинтетической среде, был также высокий, причем максимум величины удельной концентрации АТФ был в конце логарифмической фазы роста.

Анализ жирнокислотного состава липидов биомассы дрожжей показал, что уровень ненасыщенности жирных кислот в клетках, выращенных при 20°C в два раза выше, чем в клетках, выращенных при 30°C. Высокий общий уровень ненасыщенности мембранных липидов гарантирует поддержание проницаемости и

текучности мембран, что обеспечивает адаптацию микроорганизмов к воздействию низких температур, что очень важно для криоиммобилизации клеток, поэтому $t = 20^{\circ}\text{C}$ принята как оптимальная для культивирования дрожжей перед иммобилизацией в криогель ПВС.

Разработаны подходы к созданию высокоэффективного биокатализатора на основе иммобилизованных клеток дрожжей. Для иммобилизации были взяты дрожжевые клетки, выращенные в аэробных условиях на полусинтетической среде при температуре 20°C до конца логарифмической фазы роста. Концентрация клеток в биокатализаторе составляла 2 масс. %. Полученный биокатализатор использовали в процессе шампанизации вина в бутылках.

Для оценки эффективности функционирования полученного биокатализатора использовали иммобилизованные клетки дрожжей, выращенные по вышеописанной методике на виноматериале. Контролем в работе были свободные клетки. Исходная концентрация дрожжевых клеток во всех исследуемых вариантах была одинаковой - 1×10^6 кл/мл. Определяли бродильную активность биокатализаторов и свободных клеток в бутылках в процессе шампанизации вина. Показано, что клетки, выращенные на полусинтетической среде, обладают более высокой бродильной активностью по сравнению с клетками, выращенными на виноматериале, независимо от того, в свободном или иммобилизованном виде они использовались для шампанизации вина.

Были проанализированы основные химические характеристики шампанского, получено после 4-х недель брожения. Наблюдается сходство их как для шампанского, полученного с использованием свободных клеток, так и с использованием иммобилизованных клеток дрожжей, правда лучшая метаболическая активность иммобилизованных клеток лучше, чем свободных (более низкая концентрация остаточного сахара и несколько выше концентрация этанола), уровень концентрации АТФ выше в два раза.

Таким образом, независимо от типа питательной среды, использованной для наращивания биомассы дрожжей, характеристики иммобилизованных клеток, а именно, бродильная активность и концентрация внутриклеточного АТФ, были лучше по сравнению со свободными клетками. Этот факт подтвердил преимущества использования клеток, иммобилизованных в криогель ПВС, для производства шампанских вин бутылочным способом перед свободными клетками. Одной из важных характеристик шампанского является концентрация свободных клеток дрожжей в продукте. Проблема накопления свободных клеток в среде брожения при использовании иммобилизованных биокатализаторов является серьезным препятствием для широкого применения иммобилизованных клеток дрожжей.

В связи с этим встает вопрос о подавлении роста клеток в процессе шампанизации. Для этого одну часть гранул биокатализатора обрабатывали d_1 – фактором в концентрации 0,001%, другую 10%-м раствором этилового спирта, третью часть выдерживали в среде, насыщенной CO_2 в течении трех часов. Уровень жизнеспособности клеток определяли по концентрации внутриклеточного АТФ. Удельная концентрация АТФ в этих иммобилизованных клетках после воздействия различных факторов снизилась в 2 - 4 раза, тогда как в дрожжевых клетках, выращенных на контрольной среде (виноматериале рН 3,0) - в 6÷15 раз, что свидетельствует о более высокой резистентности клеток, выращенных на полусинтетической среде.

Гранулы биокатализаторов, обработанные различными ингибиторами роста клеток, помещали в бутылки с виноматериалом для исследования метаболической активности иммобилизованных клеток.

В процессе шампанизации вина измеряли давление углекислого газа, накапливающегося в бутылках и отбирали пробы для подсчета свободных клеток, и определяли концентрацию внутриклеточного АТФ в иммобилизованных клетках.

По окончании брожения в бутылках с шампанским давление углекислого газа было равным 0,4-0,45 МПа практически во всех представленных образцах.

Наибольшее количество свободных клеток в готовом шампанском (0,6 млн кл/мл) наблюдалось в пробах с необработанным биокатализатором. В шампанском, приготовленном с помощью обработанных иммобилизованных дрожжей, количество свободных клеток было ниже в 3-6 раз. Наименьшая концентрация свободных клеток наблюдалась в шампанском с использованием иммобилизованных клеток в среде, насыщенной CO_2 . Однако известно, что концентрация свободных клеток в готовом шампанском после ремюажа должна составлять не более 7×10^3 клеток/мл, в то время как в полученных образцах шампанского концентрация клеток была в 10-100 раз выше нормы что свидетельствует недостаточности длительности экспонирования гранул биокатализатора (3 ч); а также концентрации этанола, d_1 -фактора и CO_2 , необходимых для полного подавления роста иммобилизованных дрожжевых клеток.

Обработка биокатализаторов различными ингибиторами более эффективна для иммобилизованных клеток, выращенных на виносодержащих средах, что связано, по-видимому, с более низким уровнем жизнеспособности клеток, выращенными на виноматериале, чем на полусинтетической среде. Одним из эффективных вариантов подавления роста клеток в процессе шампанизации вина, может быть признана экспонирование гранул иммобилизованного биокатализатора в среде, насыщенной CO_2 .

Разработанный нами ранее (Мартыненко, 2001, 2004) метод включения клеток дрожжей в криогель ПВС предполагал формирование гранул биокатализатора в среде петролейного эфира, нежелательной для применения на производстве из-за своей пожароопасности, а также токсичности для клеток. В связи с этим было решено изменить условия иммобилизации и проводить ее на воздухе. Такой подход был апробирован впервые.

С помощью электронной микроскопии было показано, что макропоры носителя, полученного формированием на воздухе, имели больший размер до 50 мкм, чем поры носителя, сформированного в среде гидрофобного растворителя, что должно было способствовать улучшению массообменных процессов внутри гранул.

Концентрация полимера в составе получаемого биокатализатора была в интервале от 10 до 17% с целью получения механически прочной матрицы с хорошими массообменными характеристиками. Большая концентрация клеток обеспечивает более высокие скорости процесса брожения, при этом органолептические показатели готовой продукции существенно зависят от концентрации клеток, участвующих в процессе брожения (Liger-Belair, 2004). В связи с этим концентрацию клеток в биокатализаторе варьировали от 2 до 10 % (масс).

Как видно из таблицы при дополнительном исследовании характеристик получаемого шампанского было установлено, 10% концентрации клеток дрожжей в составе иммобилизованного препарата является лучшей.

Таблица 13.

Характеристики шампанского, приготовленного в бутылках, с применением дрожжей, иммобилизованных в криогель ПВС

Исходная концентрация клеток в биокатализаторе, %	Давление CO ₂ , кПа	Свободные клетки, кл/мл вина	Сахара, г/л	Спирт, об %	Титруемая кислотность, г/л	Дегустационная оценка
2а	450	(3,5±0,3)х 10 ⁵	1,6	11,30	7,4	н/и
2б	500	(3,1±0,3)х 10 ³	1,4	11,60	7,3	8,70
10б	540	(3,4±0,4)х 10 ³	1,1	11,85	7,2	8,75
Свободные клетки	430	(1,0±0,1)х 10 ⁷	1,8	11,0	7,4	8,60

а-Биокатализатор, полученный по ранее разработанной методике, б-Биокатализатор, полученный по методике, разработанной в данной работе.

Анализ содержания основных ароматических веществ в шампанском, полученном с помощью свободных и иммобилизованных дрожжей, отражается на качестве готового продукта - метанол, пропанол, изобутанол, уксусная кислота, были ниже на 10-17 % по сравнению с шампанским, приготовленным с помощью свободных дрожжей.

Таблица 14.

Содержание различных ароматических веществ в шампанском, приготовленном с использованием свободных иммобилизованных клеток дрожжей.

Вещества, мг/л	Исходный виноматериал	Шампанское	
		Свободные дрожжи	Иммобилизованные дрожжи
Уксусный альдегид	673,7	549,1	500
Этилацетат	20,2	21,4	22,6
Метанол	22,4	24,71	14,11
Пропанол	9,8	9,8	8,0
Изобутанол	17,3	17,8	16,3
Изоамиловый спирт	141,2	122,6	107,4
Уксусная кислота	1207,9	838,2	688,2
Бутиленгликоль	1445,5	843	679
Фенилэтиловый спирт	152,1	126,5	81,9
Глицерин	16174,5	13603,8	12300

Исследование стабильности биокатализатора при многократном его использовании в процессе шампанизации вина в бутылках, а также стабильности биокаталитических характеристик иммобилизованных клеток после их длительного хранения в замороженном виде позволило установить, что расчетный период полуинактивации полученного биокатализатора составляет 360 сут, период полуинактивации при хранении ~6,5 лет.

Было исследовано влияние концентрации иммобилизованного биокатализатора в среде на скорость сбраживания виноматериала в бутылках. Конечный уровень давления CO_2 во всех образцах независимо от исходной концентрации иммобилизованных клеток был практически одинаковым (~500 кПа) после 28 сут брожения. Однако, максимальная удельная скорость накопления этанола в сбраживаемом вине была установлена при введении в среду 18 г/л биокатализатора.

Полученный иммобилизованный биокатализатор использовали в технологии получения вин резервуарным периодическим способом, предусматривающем проведение процесса без перемешивания в герметичных металлических резервуарах. В качестве ферментационной среды использовали виноматериал, такой же, как при шампанизации вина в бутылках. Вторичное брожение проводили в течение 24 суток при 15°C , одни и те же иммобилизованные клетки использовали в течение 3 циклов сбраживания. Загрузка реактора биокатализатором оставляла 18 г/дм³. Использование этой концентрации позволило далее установить, что при проведении непрерывной шампанизации вина продуктивность 1 г биокатализатора составляет 120 см³/сут за исследованный период времени, что в 4 раз больше, чем при шампанизации вина в бутылках (30 см³/сут). При этом качество шампанского, получаемого в непрерывном режиме, по основным характеристикам практически не отличалось от шампанского, приготовленного в бутылках с использованием того же биокатализатора.

Разработанный биокатализатор был использован в технологии получения различных видов вин, а именно, при получении белых и красных столовых вин при использовании свободных и иммобилизованных клеток дрожжей.

В работе было проведено сбраживание виноградного сока иммобилизованных в криогель ПВС клетками дрожжей, была изучена кинетика роста винных дрожжей. Полученная дрожжевая биомасса была иммобилизована по способу, разработанному для шампанских дрожжей.

Было показано, что концентрации спирта и сахарозы в полученном вине, приготовленном с использованием как иммобилизованных, так и свободных клеток разных штаммов винных дрожжей, практически одинаковы, немногим большая концентрация спирта и меньше сахаров отмечалась в пробах с вином, приготовленным с помощью иммобилизованных дрожжей.

Анализ основных органических кислот в полученных винах не показал существенных отличий при использовании, как свободных, так и иммобилизованных клеток. Однако анализ ароматических компонентов полученного вина позволил установить, что, концентрации высших спиртов (пропанола, изобутанола, изоамилового спирта), метанола, и этилацетата, высокие концентрации которых нежелательны для вина, были меньше в 1,5-150 раз в вине, полученном с использованием иммобилизованных винных дрожжей по сравнению с вином, приготовленным при использовании тех же свободных клеток в свободном состоянии

Дегустация образцов белых столовых вин, полученных с использованием свободных и иммобилизованных клеток винных дрожжей, показала преимущество использования иммобилизованных клеток в иммобилизованном виде. Образцы вина, полученного с использованием иммобилизованных клеток дрожжей штаммов «47К», «Кокур-3» и «Ленинградская», были оценены как образцы очень хорошего качества с развитыми сортовыми особенностями в букете и слаженным гармоничным вкусом.

Аналогичные результаты были получены и при использовании разработанного биокатализатора в технологии получения красных вин. Органолептическая оценка была выше у образцов вина, полученного при использовании иммобилизованных клеток. Вина характеризовались хорошим качеством с развитым, характерным для красных столовых вин, богатым букетом и слаженным вкусом.

Учитывая то, что иммобилизованные дрожжи значительно устойчивее к воздействию различных ингибирующих веществ, чем свободные клетки, было решено испытать их для устранения винных недобродов и для биологического кислотопонижения вина.

Было показано, что в результате дображивания виноматериалов с использованием иммобилизованного биокатализатора концентрация этанола может быть увеличена на 6-28% от исходного уровня.

Также было апробировано использование иммобилизованных в криогель ПВС клеток дрожжей для кислотопонижения вина, получаемого из виноградного и крыжовникового соков. Было установлено, что в результате спирто-яблочно-молочнокислого сбраживания соков с применением разработанного биокатализатора, получается вино с концентрацией этанола 45-86 г/дм³ пониженным содержанием яблочной кислоты на 18-23% от исходного уровня.

ВЫВОДЫ

1. Проведён скрининг 481 расы дрожжей вида *Saccharomyces*, выделенные в Западной Белоруси. Отобрано и рекомендовано 13 рас дрожжей для получения плодовых вин, из которых 5 рас имеют особо ценные свойства и представляют значительный интерес для производства, и 2 расы для спиртового производства.
2. Изучены и селекционированы 62 важнейшие отечественные расы винных и спиртовых дрожжей. Установлена их принадлежность к одному биологическому виду *Saccharomyces cerevisiae* на основании стандартных физиологических тестов, обозначены их различия между собой по ряду признаков в определители как переменные. Впервые изучены молекулярно-биологические их особенности современными методами анализа генома, даны морфологические и физиолого-биохимические характеристики, построено генеалогическое древо штаммов и обнаружено среди них 5 межвидовых гибридов дрожжей *S. cerevisiae* x *S. bayanus* Var. *Uvarum*.
3. Определены максимальные температуры роста исследуемых дрожжей и установлено, что они лежат в диапазоне 28-53 °С. Выявлены 4 группы дрожжей, которые растут при разных температурах: при t=35-37°C; при t = 44-46°C; при t=46-49°C; при t=49-53°C.
4. Отобраны 13 штаммов винных дрожжей рода *Saccharomyces*, имеющие наилучшие физиолого-биохимические особенности, для получения АСД и

дальнейшего их использования при производстве красных и белых виноматериалов, игристых и плодовых вин, а, именно: для красных виноградных вин-Каберне-5; белых виноградных вин-Кокур-3 и 47-К; шампанских вин резервуарным и бутылочным способом – Харьковская-39; плодово-ягодных вин: яблочных – ГВ-4 и Сидровая-101; грушевых-ГВ-4 и Груша-10; вишнёвых – Вишня-6 и Вишня-18; черноплоднорябиновых – Вишня-18 и Москва-30; черничных – Вишня-18 и ДЧК-1; голубичных – Вишня-18 и Москва-30 ; черносмородиновых -Вишня 18 и Москва-30; красносмородиновых-Москва-30; малиновых- Москва-30 и ГСЧ-1; клюквенных-ГВ-4; брусничных- Брусничная-7 и ГВ-4; клубничных- Вишня-18 и Земляничная-9.

4. Определены оптимальные составы сред, условия и режимы культивирования дрожжей для получения биомассы для дальнейшего высушивания и иммобилизации.

5. Разработана высокоэффективная технология винных и спиртовых АСД, обеспечивающая получение продукта высокого качества. Созданная технология предусматривает использования мелассы как основное сырьё при культивировании дрожжей, предназначенных для получения АСД, промывку на сепараторе и сушку в кипящем слое, использование стабилизаторов. Составлены ТИ и ТУ, проведена апробация её на ООО «Дербенёвка-2» Московского дрожжевого завода и наработаны опытные партии дрожжей.

6. Изучены различные методы обезвоживания винных и спиртовых дрожжей. Подобрана оптимальная композиция стабилизаторов для обезвоживания на сушилке кипящего слоя дрожжей, выращенных на мелассе, повышающая выживаемость дрожжей на 40-50% по сравнению с необработанным контролем.

7. Изучены физиолого-биохимические свойства сухих винных и спиртовых дрожжей и условия их хранения. Показана их способность сбрасывать сахара и накапливать практически те же метаболиты, что и обычные дрожжи. Хранение их следует осуществлять в вакуумной упаковке при 4-6⁰С, при этом падение активности составляет 1% в месяц. При разгерметизации упаковки жизнеспособность дрожжей падает до 5% за 2 месяца.

8. Проведены заводские испытания полученных препаратов АСД на винозаводах ООО «Крона» (Нижегородская обл.), ОАО АПФ «Фанагория» (Краснодарский край), ОАО «Миллеровский завод» (Ростовская обл.), ОАО «Корнет» (г. Москва) и спиртзаводе ОАО «Золотой Алтай» (Алтайский край). Отмечены высокие технологические показатели АСД – активное проведение брожения, высокий выход спирта, получение продукции с высокими органолептическими показателями.

9. Разработана технология получения биокатализатора на основе иммобилизованных в криогель ПВС клеток дрожжей *S.cerevisiae* Шампанская-39, выращенных на полусинтетической среде, для использования в технологии шампанизации вина.

10. Показана возможность многократного использования биокатализатора на основе иммобилизованных клеток дрожжей в процессе шампанизации вина классическим бутылочным и резервуарным периодическим и непрерывным методами, обеспечивающими получение качественного продукта.

11. Определена возможность использования разработанного иммобилизованного биокатализатора в технологии получения виноградных вин по красному и белому

методам, для устранения винных недобродов с исходно высокой концентрацией этанола (10,5-13,5 об.%), для биологического кислотопонижения вина.

12. Проведены заводские испытания препаратов ИД для получения шампанских вин бутылочным методом на ОАО АПФ «Фанагория» (Краснодарский край) и ОАО «Корнет» (г. Москва), для получения красных и белых вин на винзаводах ОАО АПФ «Фанагория» (Краснодарский край), ОАО «Миллеровский винзавод» (Ростовская обл.), ООО «Ливадия» (г. Ялта, Украина). Средняя дегустационная оценка вин – 7,80 - 7,95.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах.

Монография:

1. Мартыненко Н.Н. Современные препаративные формы дрожжей для виноделия. М.: Россельхозиздат. 2006. 278 с.

Патенты РФ:

2. Тулякова Т.В., Джафаров А.Ф., Бакулин В.П., Гагарин М.А., Гагарин А.М., Мартыненко Н.Н. Способ получения дрожжей для производства игристых вин. Патент РФ №2180912 от 27.04.2001 г.

3. Мартыненко Н.Н., Грачева И.М., Эль-Регистан Г.И., Зубов А.Л., Лозинский В.И. Способ получения биокатализатора для производства спиртосодержащих игристых напитков // Патент РФ №2239658. 2004. БИ №31.

4. Коновалова Е.Ю., Мартыненко Н.Н., Астафьев Е.И., Нугманова Т.А., Эль-Регистан Г.И. Способ получения сухих активных дрожжей для пищевой промышленности. Патент РФ № 2218393 от 10.12.2003 г. БИ. №34.

5. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова И.Н., Мартыненко Н.Н., Коновалова Е.Ю. Применение штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-3136 в качестве средства, снижающего образование побочных метаболитов в процессе получения спирта. Патент РФ №2331666. От 30.11. 2005 г. Опубликовано 20.08. 2008 г. БИ №23.

6. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова И.Н., Мартыненко Н.Н., Коновалова Е.Ю. Применение штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-3137 в качестве средства, снижающего образование побочных метаболитов в процессе получения спирта. Патент РФ №2331667. От 30.11. 2005 г. Опубликовано 20.08. 2008 г. БИ №23.

7. Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Мартыненко Н.Н., Грачева И.М. Способ получения иммобилизованного биокатализатора и биокатализатор для производства спиртосодержащих напитков. Патент РФ №2322499. Опубликовано 20.04. 2008 г. БИ №8.

Статьи и тезисы международных конференций:

8. Мартыненко Н.Н. Использование иммобилизованных дрожжей в процессах шампанизации вин // Тезисы докладов третьей международной научно-технической конференции «Пища. Экология. Человек». М. МГУПП. 1999. С. 63.

9. Мартыненко Н.Н., Аكوпова Н.А., Корнеясева Е.В., Эль-Регистан Г.И. Регулирование метаболизма шампанских дрожжей ауторегуляторными факторами d₁ // Тез. докл. научно-технической конференции «Молодые ученые – пищевым и перерабатывающим отраслям АПК (технологические аспекты производства)». С. 57–58. М. МГУПП, 1999.

10. Мартыненко Н.Н., Саришвили Н.Г., Милкин Д.Б., Шипачев Е.С. Применение иммобилизованных дрожжей в производстве шампанского классическим

(бутылочным) способом // Тез. докл. научно-технической конференции «Молодые ученые – пищевым и перерабатывающим отраслям АПК (технологические аспекты производства)». С. 58. М. МГУПП, 1998.

11. Martinenko N.N., Zubov A.L., Sarishvili N.G., El-Registan G.I., Lozinsky V.I. PVA-cryogel – entrapped yeast cells for the bottle-fermented production of champagne-type wines // Proceedings International conference “Biocatalysis–2000: Fundamentals & applications”. Moscow, Moscow State University, 2000.

12. Мартыненко Н.Н., Милкин Д.Б., Шипачев Е.С. Получение бутылочного шампанского с использованием дрожжей, иммобилизованных в криогелях ПВС и новый подход к проблеме выхода клеток из матрицы носителя // Тезисы докладов Международной конференции молодых ученых «Молодые ученые – пищевым и перерабатывающим отраслям АПК (технологические аспекты производства). М.: МГУПП, 2000. С. 73–74.

13. Мартыненко Н.Н., Жолудева М.В. Получение активных сухих дрожжей для производства шампанского // Тезисы докладов Международной конференции молодых ученых «Молодые ученые – пищевым и перерабатывающим отраслям АПК (технологические аспекты производства). М.: МГУПП, 2000. – С. 75–77.

14. Мартыненко Н.Н., Милкин Д.Б., Шипачев Е.С. Применение дрожжей, иммобилизованных в криогелях для получения шампанского бутылочным способом // Тез. докл. Международной конференции молодых ученых «Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых природных ресурсов». М. РХТУ, 2000. С. 70–71.

15. Martinenko N.N., Zubov A.L., Gracheva I.M., Sarischvili N.G., El-Registan G.I., Lozinsky V.I. The production of sparkling wines by “Champenoise” method with using PVA-cryogel entrapped yeast cells and the new approach to the problem of cell leakage from the carrier // Proceedings IX International BRG Workshop and 62-th ICB Seminar “Bioencapsulation in Biomedical, Biotechnological and Industrial Applications” Warsaw, May 11–13. 2001. P. 13–16.

16. Мартыненко Н.Н., Милкин Д.Б., Шипачев Е.С. Получение бутылочного шампанского с использованием дрожжей, иммобилизованных в криогелях ПВС, и новый подход к проблеме выхода клеток из матрицы носителя // В сборнике научных трудов «Качество, безопасность и экология пищевых продуктов и производств. Прогресс в агроиндустрии». М. МГУПП. 2001. С.73-74.

17. Мартыненко Н.Н., Жолудева М.В. Получение активных сухих дрожжей для производства шампанского // В сборнике научных трудов «Качество, безопасность и экология пищевых продуктов и производств. Прогресс в агроиндустрии». М. МГУПП. 2001. С.75-77.

18. Гусева Т.И., Радина Н.В., Мартыненко Н.Н. Промышленный опыт применения ферментных препаратов компании «Эндэ Индустриал Корпорэйшн» // Ликероводочное производство и виноделие. 2001. №1. С.4-6.

19. Гусева Т.И., Радина Н.В., Мартыненко Н.Н. Опыт применения ферментных препаратов компании «Эндэ Индустриал Корпорэйшн» при производстве спирта // Научно-технический прогресс в спиртовой и ликероводочной отрасли промышленности. М.: Пищевая промышленность. 2001. С.83-93.

20. Шипачев Е.С., Мартыненко Н.Н. Технологические аспекты производства активных сухих винных дрожжей (АСВД) // Материалы Всероссийской заочной конференции «Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях». Вып.4. Тверь: ТГТУ. 2002. С. 63-66.

21. Степанов Н.А., Мартыненко Н.Н., Ефременко Е.Н. Оптимизация условий получения активного биокатализатора для шампанизации вин на основе дрожжевых клеток, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта // Материалы Международной конференции молодых ученых «От фундаментальной науки – к новым технологиям. Химия и биотехнология биологически активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии» Тверь: ТГТУ. 2002. Вып. 2. С.100-102.
22. Мартыненко Н.Н., Грачева И.М. Иммобилизованные шампанские дрожжи. Физиолого-биохимические особенности и участие в шампанизации вин (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. №5. С. 501-508.
23. Мартыненко Н.Н., Грачева И.М., Саришвили Н.Г., Зубов А.Л., Эль-Регистан Г.И., Лозинский В.И. Иммобилизация шампанских дрожжей включением в криогель ПВС, предотвращение выхода клеток из матрицы носителя // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. №2. С.186-193.
24. Мартыненко Н.Н. Совершенствование ремюажа. Характеристика процесса. Оклеивающие вещества, механические приспособления, агломерирующие дрожжи // Виноделие и виноградарство. 2003. №2. С.22-23.
25. Мартыненко Н.Н. Совершенствование ремюажа (иммобилизованные дрожжи) // Виноделие и виноградарство. 2003. №3. С.14-16.
26. Мартыненко Н.Н., Хасикова А.А., Гагарин А.М., Бакулин В.П., Кононова О.Н., Гагарин М.А. Новые активные дрожжи для шампанского на основе отечественных рас // Виноделие и виноградарство. 2003. №4. С.14-16.
27. Мартыненко Н.Н., Хасикова А.А., Гагарин А.М., Бакулин В.П., Кононова О.Н., Гагарин М.А. Повышение качества шампанского путем применения сухих дрожжей // Виноделие и виноградарство. 2003. №6. С.22-23.
28. Мартыненко Н.Н. Активные сухие винные дрожжи. Технологические аспекты производства и практического использования // Индустрия напитков. 2003. №1. С.34-37.
29. Мартыненко Н.Н. Активные сухие винные дрожжи. Характеристика важнейших препаратов АСВД // Индустрия напитков. 2003. №2. С.38-40.
30. Мартыненко Н.Н., Гусева Т.И. Актуальные вопросы ведения дрожжей в современном спиртовом производстве // Индустрия напитков. 2003. №4. С.40-42.
31. Гусева Т.И., Мартыненко Н.Н., Колдин Э.Н., Орлова Н.В. Производство высококачественного спирта с использованием ферментных препаратов и сухих дрожжей // В сб. Прогрессивные технологии и современное оборудование – важнейшие составляющие успеха экономического развития предприятий спиртовой и ликероводочной промышленности. М.: Пищевая промышленность. 2003. С. 59-74.
32. Мартыненко Н.Н., Садовская И. М. Исследование дрожжевой микро- флоры ягод в западных районах Беларуси // В сб. «Актуальные вопросы пищевой промышленности» Вып.1. М. МГУПП. 2003. С.64-66.
33. Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Мартыненко Н.Н., Грачева И.М. Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток дрожжей для шампанизации вина // Материалы II Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М.: РХТУ. 2003. Ч.1. С. 234.
34. Шипачев Е.С., Мартыненко Н.Н. Современные препараты АСД для шампанского производства и их практическое использование // В сб. «Актуальные вопросы пищевой промышленности» Вып.1. М. МГУПП. 2003. С.59-63.

35. Жолудева М.В., Мартыненко Н.Н., Колесник И. М., Кремлев Е.П. Исследование новых штаммов дрожжей для плодово-ягодного виноделия // В сб. «Актуальные вопросы пищевой промышленности» Вып.1. М. МГУПП. 2003. С.67-69.
36. Мартыненко Н.Н., Шипачев Е.С., Грачева И.М. Современные аспекты получения и применения сухих винных дрожжей // Сборник научных трудов Всероссийской научно-технической конференции-выставки «Высокоэффективные пищевые технологии и технические средства для их реализации» М.: МГУПП. 2003. С. 180-182.
37. Колесник И.М., Кремлев Е.П., Мартыненко Н.Н. Влияние условий культивирования на интенсивность размножения культур сахаромицетов // Материалы II Региональной научно-практической конференции "Экологической науке - творчество молодых". Гомель. 2003. С. 43-44.
38. Мартыненко Н.Н., Жолудева М.В., Шипачев Е.С., Грачева И.М. Исследование новых культур дрожжей для вторичного виноделия // В сб. «Актуальные вопросы пищевой промышленности» Вып.1. М. МГУПП. 2003. С.69-72.
39. Мартыненко Н.Н., Шипачев Е.С., Грачева И.М. Проблемы реактивации сухих шампанских дрожжей // В сб. «Актуальные вопросы пищевой промышленности» Вып.1. М. МГУПП. 2003. С.72-76.
40. Мартыненко Н.Н., Жолудева М.В., Грачева И.М., Колесник И.М. Поиск перспективных штаммов для плодово-ягодного виноделия в Западной Беларуси. 1. Характеристика культур, выделенных из винограда // Хранение и переработка сельхозсырья. 2003. №12. С.91-93.
41. Гусева Т.И., Мартыненко Н.Н. Новые технологии в производстве спирта // Индустрия напитков. 2003. №6. С. 38-39.
42. Колесник И.М., Мартыненко Н.Н., Грачева И.М. Исследование дрожжевой микрофлоры год в Западной Беларуси и поиск новых штаммов для плодово-ягодного виноделия // Хранение и переработка сельхозсырья. 2004. №1. С.27-28.
43. Мартыненко Н.Н., Грачева И.М., Колесник И.М. Поиск перспективных штаммов для плодово-ягодного виноделия в Западной Беларуси. 2. Культуры из ягод черной смородины // Хранение и переработка сельхозсырья. 2004. №1. С.32-34.
44. Мартыненко Н.Н. Активные сухие винные дрожжи. История создания и становление // Виноделие и виноградарство. 2004. №1. С.18-21.
45. Мартыненко Н.Н. Ароматические особенности сухих шампанских дрожжей // Хранение и переработка сельхозсырья. 2004. №3. С.39-42.
46. Мартыненко Н.Н. Активные сухие винные дрожжи. Промышленное производство и практическое применение // Виноделие и виноградарство. 2004. №2. С. 20-22.
47. Колесник И.М., Жолудева М.В., Мартыненко Н.Н., Грачева И.М. Новые штаммы для плодово-ягодного виноделия. Сахаромицеты из ягод черной смородины Западной Беларуси // Виноделие и виноградарство. 2004. №3. С.15-17.
48. Гусева Т.И., Калинина О.А., Мартыненко Н.Н. Использование дрожжевой подкормки Ист Лайф Экстра в спиртовом производстве // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2004. №3. С. 15-16.
49. Наумова Е.С., Жолудева М.В., Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярно-генетическая дифференциация культурных дрожжей *Saccharomyces* // Микробиология. 2005. Т.74. №2. С. 215-223.

50. Мартыненко Н.Н., Грачева И.М., Колесник И.М. Поиск перспективных штаммов для плодово-ягодного виноделия в Западной Беларуси. 3. Характеристика сахаромикетов из ягод малины // Хранение и переработка сельхозсырья. 2005. №6. С.48-50.
51. Степанов Н.А., Ефременко Е.Н., Мартыненко Н.Н., Грачева И.М. Биокаталитическая система на основе иммобилизованных дрожжей для шампанизации вина // 3-й Международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития", Москва, 14-18 марта, 2005, с. 214.
52. Степанов Н.А., Мартыненко Н.Н., Ефременко Е.Н. Иммобилизованный биокатализатор с улучшенными характеристиками для получения игристых вин // 9-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино. 18-22 апреля, 2005, с. 364.
53. Мартыненко Н.Н. Образование ароматических веществ иммобилизованными дрожжами при шампанизации вина // Хранение и переработка сельхозсырья. 2005. №10. С.32-34.
54. Мартыненко Н.Н., Верченков В.В., Римарева Л.В. Новые подходы к получению препаратов сухих винных и спиртовых дрожжей // Хранение и переработка сельхозсырья. 2005. №11. С.33-35.
55. Naumova E.S., Ivannikova Y.V., Martynenko N.N., Naumov G.I. Comparative analysis of genomes of cultured *Saccharomyces* yeasts // *Yeast*. 2005. V.22. № S1. P.33.
56. Мартыненко Н.Н., Верченков В.В., Римарева Л.В. Влияние углеводного состава среды на реактивацию сухих винных и спиртовых дрожжей // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2006. №1. С. 34-35.
57. Степанов Н.А., Мартыненко Н.Н., Ефременко Е.Н. Иммобилизация дрожжей в криогель поливинилового спирта – эффективный подход к улучшению биотехнологии получения вина // 10-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино. 17-21 апреля, 2006, с. 397.
58. Степанов Н.А., Мартыненко Н.Н., Грачева И.М., Ефременко Е.Н. Применение иммобилизованных клеток дрожжей для производства спиртосодержащих напитков // Известия вузов. Пищевая технология. 2006. №6. С. 45-47.
59. Колесник И.М., Мартыненко Н.Н. Дрожжевая флора яблок в Западном регионе Беларуси // Материалы международной конференции "Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» 1-2 июня 2006 г. Минск-Раков". Минск. Изд-во БелПищепром. 2006. С. 76-77.
60. Naumov G.I., Naumova E.S., Martynenko N.N. Comparative genomics of *Saccharomyces* yeasts from red berry and grape winemaking // Proceedings of XXV International Specialized Symposium on Yeasts ISSY-25 "Systems biology of yeasts from models to applications". Helsinki. VTT. 2006. P.84.
61. Stepanov N.A., Martynenko N.N., Efremenko E.N., Multipurpose biocatalyst for production of alcoholic beverages // Proceedings of International Congress on Bioprocessing in Food Production. 18-21 June 2006. Patras, Greece. 2006. P.173.
62. Efremenko E., Stepanov N., Martynenko N., Gracheva I. Cultivation conditions preferable for yeast cells to be immobilized into poly(vinyl alcohol) and used in bottled sparkling wine production // Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly. 2006. V.12. №1. P. 18-23.
63. Иванникова Ю.В., Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Характеристика генома дрожжей *Saccharomyces* плодово-ягодного виноделия // Микробиология. 2007. №2. С.

64. Мартыненко Н.Н., Верченков В.В., Римарева Л.В. Решение проблем реактивации сухих спиртовых дрожжей // Хранение и переработка сельхозсырья. 2007. №2. С.14-16.
65. Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Сравнительная геномика дрожжей *Saccharomyces* // Материалы международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты». Минск. Изд. Центр БГУ. 2008. С. 255-256.
66. Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярная диагностика винных дрожжей гибридного происхождения: *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii* // Биотехнология. 2009. №2. С. 20-25.

Мартыненко Николай Николаевич

Биотехнологические основы высокоэффективных препаративных форм дрожжей рода *Saccharomyces*

Резюме

В диссертации научно обоснована и экспериментально показана перспективность создания сухих и иммобилизованных препаратов дрожжей (АСД и ИД) и использования их в винодельческом и спиртовом производствах. Проведен скрининг 481 расы дрожжей, отобраны 13 рас дрожжей, используемых в винном и плодово-ягодном виноделии, среди них указаны 5 лучших винных 2 спиртовых рас. Изучены их морфологические и физиологические признаки, а также определены основные физико-химические показатели, проведена дифференциация штаммов современными молекулярно-биологическими методами анализа генома с применением техники ПЦР-анализа, молекулярного кариотипирования и Саузен-гибридизации. Определены максимальные температуры роста дрожжевых штаммов и выяснены наиболее термостабильные из них, что позволяет рекомендовать их к дальнейшему исследованию по получению препаратов АСД и ИД. Получены препараты АСД и ИД с целью их дальнейшего использования в виноделии. Опробированно производство АСД и ИД на Московском дрожжевом заводе ООО «Дербеневка» и использование их на винозаводах.

Summary

In the thesis is scientifically substantiated and experimentally shown the prospect of the creation of the dry and immobilized preparations of yeasts (ADY and IY) and its application in the winemaking and potable alcohol industry. Screening 481 of race of yeast(s) is carried out, 13 races of yeast(s), utilized in the grape and fruit winemaking, are selected, 5 best wine 2 alcohol races are indicated among them. Their morphological and physiological signs are studied, and basic physical chemistry indices are also determined, is carried out the differentiation of strains by the contemporary molecular - biological methods of the analysis of genome with the application of PCR- analysis, molecular karyotyping and Sauzen-hybridization technique. Maximum temperatures of an increase in the yeast strains are determined and are explained most thermostable of them which makes it possible to recommend them to further study on obtaining of preparations ASD and UD. Are obtained preparations ASD and UD for the purpose of their further used in the wine and potable alcoholmaking. Tasted and organized production ADY and IY at company "Derbenevka" of the Moscow yeast plant and their use at the wineries.