

ГЕНОМИКА И БИОХИМИЯ ВИННЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

©2016 г. М. А. ЭЛЬДАРОВ¹, С. А. КИШКОВСКАЯ²,
Т. Н. ТАНАЦУК², А. В. МАРДАНОВ¹

¹Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва,

²Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия "Магарач" РАН, г. Ялта

I. Введение. II. Филогения и биохимия винных штаммов *S. cerevisiae*. III. Геномика винных штаммов *S. cerevisiae*. IV. Микробная экология вина. V. Механизмы контроля винного брожения. VI. Биология и биотехнология хересных дрожжей. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Хлеб, вино и пиво – древнейшие известные человеку продукты, получение которых немислимо без использования дрожжей-сахаромицетов. История виноградарства и виноделия уходит корнями вглубь тысячелетий и неразрывно связана с историей человечества. Наиболее ранние археологические свидетельства о зарождении технологии производства ферментированных напитков на основе риса, меда и фруктов обнаружены в Китае в захоронениях древностью более 7000 лет до н.э. [1]. Данные химического анализа, подтверждающие

Принятые сокращения: ГПГ – горизонтальный перенос генов; ОРС – открытая рамка считывания; ЯМБ – яблочно-молочное брожение; ARS – автономно-реплицирующая последовательность; CNV – полиморфизм в числе копий определенного сегмента хромосомы; Indel – полиморфизм инсерции/делеции нуклеотидов; LTR – длинный концевой повтор ретроэлемента; QTL – локус количественного признака; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

Адрес для корреспонденции: eldarov@biengi.ac.ru

Работа поддержана Российским научным фондом (проект 16-16-00109).

Авторы признательны Н.В.Равину за ценные советы и комментарии при подготовке рукописи.

начало виноделия, датируются 5400 г. до н.э. [2], а данные об участии дрожжей в процессах винного брожения в Древнем Египте – 3150 г. до н.э. [3]. Из Египта и Месопотамии технология получения ферментированных напитков распространились в Европу и затем в Новый Свет [4].

Роль дрожжей в процессах спиртового брожения была установлена Пастером в 1860 году [5]. В начале 80-х годов 19 века Эмиль Христан Хансен из лаборатории Карлсберга получил первую чистую культуру дрожжей, которая затем была использована как инокулят для сбраживания винного суслу. Удивительно, но эта практика начала эффективно распространяться лишь с середины 20 века, и в настоящее время почти все коммерческое виноделие в мире основано на использовании стартовых культур. Использование тщательно отобранных коммерческих штаммов дрожжей существенно улучшило контролируемость и надежность процессов винного брожения, ограничило вариабельность в микробном составе вина и внесло существенный вклад в улучшение качества вина в последние десятилетия.

Широкое использование дрожжей в виноделии и других областях традиционной биотехнологии выдвинуло эти микроорганизмы на передний план исследований в области генетики, биохимии, клеточной биологии, физиологии, геномики и эволюционной биологии. Простота и удобство культивирования дрожжей, легкость генетических и генно-инженерных манипуляций, целый ряд других преимуществ, быстро сделали дрожжи излюбленным модельным объектом для изучения всех основных процессов, протекающих в клетке эукариот.

Расшифровка генома пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в 1996 году стала поворотным событием в геномике, впервые открыв возможность глобального исследования экспрессии и функционирования эукариотического генома [5], создав также предпосылки для исследований в области сравнительной, функциональной и эволюционной геномики [6].

Бурный прогресс методов геномного секвенирования привел к резкому росту числа расшифрованных геномов природных, промышленных, клинических изолятов сахаромицетов, значительно расширил наши представления о разнообразии, происхождении, естественной истории *S. cerevisiae* и родственных дрожжей.

В настоящем обзоре предпринята попытка обобщения последних достижений в области расшифровки геномов винных штаммов сахаромицетов, применения методов сравнительной геномики для изучения механизмов эволюции дрожжевого генома в условиях искусственного отбора, использования геномных и постгеномных

подходов для идентификации молекулярной природы важных для виноделия характеристик коммерческих штаммов сахаромицетов. Отдельный раздел посвящен физиологическим, генетическим и биохимическим особенностям хересных штаммов дрожжей, используемых для получения биологически-выдержанных вин.

II. ФИЛОГЕНИЯ И БИОХИМИЯ ВИННЫХ ШТАММОВ *S. CEREVISIAE*

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ВИННЫХ ШТАММОВ

Для *S. cerevisiae* характерен гапло-диплоидный жизненный цикл и преимущественно вегетативный способ размножения. Большинство выделенных из природных местообитаний штаммов являются диплоидами [6] с достаточно высоким уровнем гетерозиготности. Частота гетерозиготных SNP может составлять от 1 000 до 18 000 SNP на геном [7, 8], что может являться отражением частых в условиях искусственного отбора винных штаммов процессов скрещивания и полового размножения [9].

Многочисленные исследования последних лет [10–15] обеспечили глубокое понимание популяционной структуры и эволюционной истории *S. cerevisiae*. Показано, что «культурные» штаммы *S. cerevisiae* произошли от природных предков в результате независимых событий «доместикации» [12, 16]. При этом 95% винных штаммов принадлежат одному филогенетическому кластеру [12, 15], что предполагает их уникальное происхождение и последующую популяционную экспансию благодаря человеческой деятельности.

На основании полногеномного анализа изолятов *S. cerevisiae* из различных географических областей по всему миру были идентифицированы 5 основных филогенетических групп, отличающихся как местом происхождения, так и технологическими характеристиками (рис. 1). Были выявлены и многочисленные штаммы с мозаичными геномами, возникшие в результате скрещивания между представителями этих групп [14]. Важно, что удалось проследить устойчивые корреляции между генотипами секвенированных штаммов и их экспериментально-определенными фенотипическими характеристиками.

Генетические исследования дрожжей в пределах небольших популяций показали, что в целом их структура отражает адаптацию к различным экологическим нишам. При этом винные штаммы образуют отдельную филогенетическую группу с низкой степенью вариабельности [13, 14].

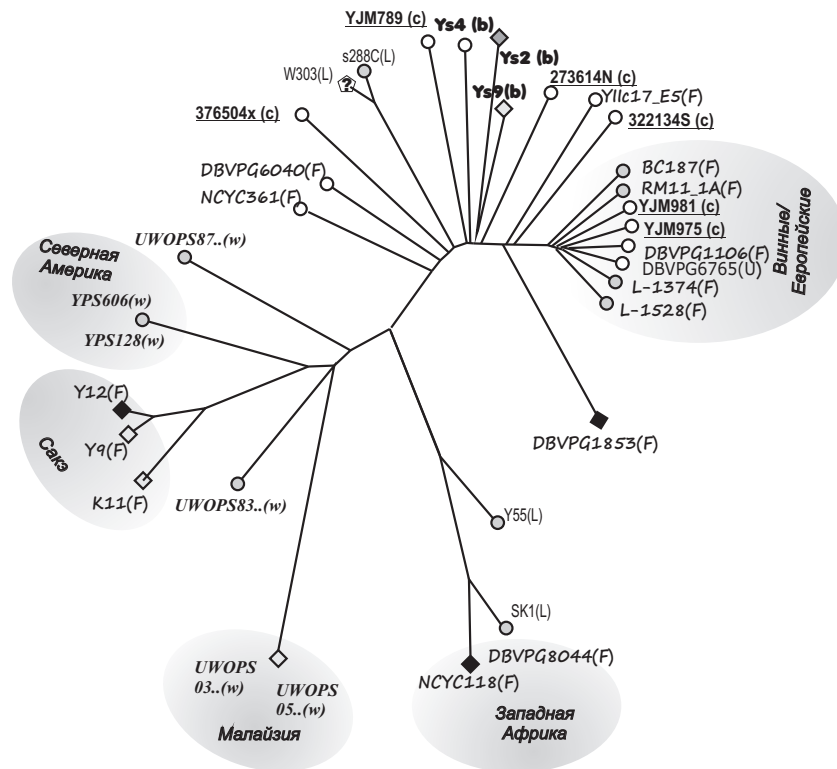


Рис. 1. Филогеномика дрожжей. Филогенетическое дерево изолятов *S. cerevisiae* из различных географических регионов и экологических ниш.

Серым выделены «чистые», немозаичные линии.

Географическая принадлежность – белые кружки – Европа, серые овалы – Америка, серые ромбы – Азия, темно-серые ромбы, черные ромбы – Африка.

Специфика штаммов: (w) – природный (дикий) изолят, (c) – клинический изолят (условный патоген), (b) – пекарский, L- лабораторный, F – бродильный (винный, пивной, спиртовой).

Воспроизведено с модификациями по [14].

Данные микросателлитного анализа предполагают Месопотамское происхождение Европейских винных штаммов [12, 17] с последующей их миграцией в Европу через Средиземное море или через Дунай вместе с сортами винограда [17].

Центром же происхождения и разнообразия *S. cerevisiae* могут являться первобытные леса Китая, на что указывают данные анализа большой выборки изолятов, выделенных из экологически и географически различных местообитаний [11].

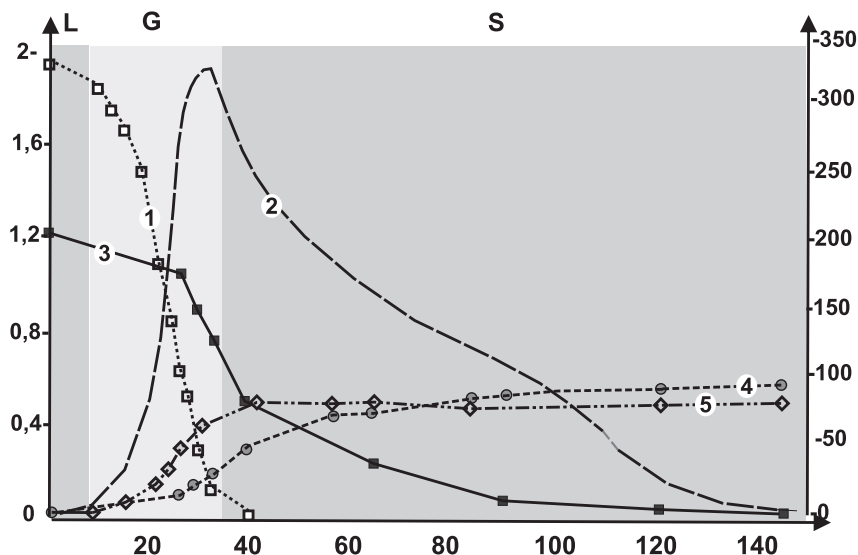


Рис. 2. Фазы винного брожения.

Динамика изменения основных характеристик при экспериментальном виноделии в синтетической среде с 200 г/л глюкозы (фруктозы) и 330 мг/л источников азота с помощью винного штамма EC118.

1 – Содержание азота, ($mg \cdot L^{-1}$),

2 – интенсивность брожения, $\frac{dCO_2}{dt}$ ($mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$),

3 – концентрация глюкозы, ($g \cdot L^{-1}$),

4 – плотность культуры $10^6 \cdot кл \cdot мл^{-1}$,

5 – продукция этанола, ($g \cdot L^{-1}$),

L – лаг-фаза, G – фаза роста, S – стационарная фаза.

Воспроизведено с модификациями по [20].

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИННЫХ ШТАММОВ

Процесс винного брожения сопровождается различными типами стресса – осмотический стресс, определяемый высокими концентрациями сахара, стрессы, связанные с закислением среды, повышенным содержанием сульфита, анаэробными условиями, недостатком источников азота, липидов, витаминов, высокими концентрациями этанола, температурными флуктуациями. Хорошие винные штаммы должны быть устойчивы к совместному действию этих абиотических факторов на всех основных фазах винного брожения (рис. 2) и обладать рядом других важных технологических характеристик (табл. 1).

Таблица 1. Ключевые производственные характеристики винных штаммов

«Бродильные» характеристики	Технологические свойства
Быстрое начало брожения	Генетическая стабильность
Высокая эффективность брожения	Высокая устойчивость к сульфиту
Высокая устойчивость к этанолу	Низкое пенообразование
Высокая осмоустойчивость	Способность к флокуляции
Низкий температурный оптимум	Компактный осадок
Умеренный выход биомассы	Устойчивость к высушиванию
Влияние на аромат и букет вина	Протеолитическая активность
Низкий уровень продукции сульфидов и тиолов	Низкая потребность в азоте
Низкая продукция летучих кислот	Другие метаболические особенности
Низкий уровень высших спиртов	Низкий уровень образования биогенных аминов
Способность к высвобождению гликозилированных пахучих веществ	
Высокий уровень глицерина	Низкий уровень образования этилкарбамата
Способность к автолизу	
Умеренная эстеразная активность	

Для сенсорных и органолептических свойств вина крайне важно и содержание многочисленных побочных продуктов брожения – глицерина, карбоновых кислот, альдегидов, высших спиртов, эфирных и серных соединений и пр., образуемых в результате деградации сахаров, аминокислот, жирных кислот, терпенов и тиолов винограда, что также во многом связано с особенностями используемых штаммов [18, 19].

Исход брожения зависит от многих факторов, в частности, от содержания и качества виноградного сусла. В основном это сахара (глюкоза и фруктоза в эквимолярных высоких концентрациях, 180–300 г/л), органические кислоты (винная и яблочная), неорганические катионы (калий), азотистые соединения и липиды (фитостеролы). Поскольку метаболизм фруктозы подвержен глюкозной репрессии, на поздних стадиях ферментации относительное содержание фруктозы

может быть значительным. Винные дрожжи должны сбраживать этот сахар в условиях длительных периодов голодания и в присутствии высоких концентраций этанола. Способность винных штаммов к эффективному сбраживанию фруктозы критически важна для поддержания высокой скорости ферментации на поздней стадии спиртового брожения.

Азот является другим важным нутриентом, влияющим на скорость брожения и содержание летучих веществ. В составе сула содержание азота ограничено, и недостаток азота – наиболее частая причина медленных или «застрявших» брожений [20]. Источниками азота для дрожжей могут быть ионы аммония, аминокислоты, олигопептиды, белки, амиды, биогенные амины и нуклеиновые кислоты. Принято считать, что для сбраживания 200 г/л сахара необходимо 140 мг/л источников азота [20].

Многие другие компоненты виноградного сула влияют на жизнеспособность и метаболизм дрожжей – липиды, витамины, различные ингибиторы. Однако, основным фактором стресса и фактором отбора винных дрожжей является их устойчивость к высоким концентрациям этанола.

III. ГЕНОМИКА ВИННЫХ ШТАММОВ *S. CEREVISIAE*

Еще в «догеномный» период стало понятно, что природные и промышленные штаммы сахаромицетов отличаются высоким генетическим разнообразием, приводящим к существенному различию в их характеристиках по сравнению с референсным лабораторным штаммом S288C. Эволюционные ограничения, произвольно наложенные человеком на геном *S. cerevisiae* в процессе «одомашнивания» дрожжей, привели к получению значительного числа штаммов с высокоспециализированными фенотипами, в наибольшей степени отвечающими конкретным приложениям [12]. За 20 лет прошедших с момента расшифровки генома штамма S288C число штаммов *S. cerevisiae*, для которых получена почти полная или частичная геномная последовательность, достигло несколько сотен. Прогресс этих исследований, очевидно, связан с недавней революцией в методах высокопроизводительного секвенирования, для которого дрожжи являются идеальными объектами в силу относительно небольшого размера генома и незначительного числа повторов (табл. 2).

В базе данных NCBI на сегодняшний день содержится информация о 237 практически полностью расшифрованных и аннотированных геномах различных изолятов *S. cerevisiae*.

Таблица 2. Базовые характеристики генома *S.cerevisiae**

Размер ядерного генома, пн	12 071 326
Размер митохондриального генома, пн	85 779
Число ОРС, всего:	6 604
из них с экспериментально подтвержденной функцией	5 152
Гены малых ядерных РНК	77
Гены тРНК, число	299
Мобильные элементы	50
Изолированные LTR	383
Участки ARS	352
Теломеры	32
Центромеры	16

* Референсный штамм S288C, по данным Saccharomyces genome database (на 23.07.2016).

МЕХАНИЗМЫ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ

Результаты расшифровки геномов штаммов винных и других штаммов дрожжей подтвердили «догеномные» представления об их существенной генетической гетерогенности, наличии многочисленных SNP и InDel, крупных хромосомных перестроек и CNV [12, 21] по сравнению с референсным геномом, вариаций в размерах ОРС [22], событий потери и приобретения генов.

Сравнение геномных последовательностей 100 природных, клинических и промышленных изолятов с геномом штамма S288C показало, что средняя частота SNP составляет 78 140 на геном, InDel – 7840, для 566 ОРС обнаружены вариации в их размере.

Степень варибельности нуклеотидных последовательностей геномов винных дрожжей, определенная для 236 штаммов, оказалась существенно ниже, указывая на то, что эти штаммы представляют высокоинбредную популяцию. Однако, в геномах винных штаммов дрожжей можно обнаружить примеры всех типов хромосомных полиморфизмов, а также следы интрогрессии и ГПГ [23–26], имеющими очевидное адаптивное значение (см. ниже).

ТРАНСЛОКАЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ

Основная причина хромосомного полиморфизма у дрожжей – эктопическая рекомбинация между Ту-элементами и другими повторами [27]. Наиболее часто делециям и амплификациям подвергаются расположенные в субтеломерных областях гены, отвечающие за транспорт ионов, сахаров и металлов, кодирующие факторы регуляции транскрипции и трансляции, различные адгезины. Эти наблюдения подтверждают высокую пластичность субтеломерных областей и их важную роль как источника вариабельности для быстрой адаптации винных дрожжей к меняющимся внешним условиям [7, 8].

Повышенная частота хромосомных перестроек у винных штаммов может быть связана с мутагенным действием высоких концентраций этанола, однако адаптивное значение этих вариаций не очень понятно.

Хорошо документированный пример хромосомной перестройки с адаптивным значением – распространенная у винных штаммов реципрокная транслокация между хромосомами VIII и XVI. Эта транслокация привела к формированию доминантного аллеля гена сульфитной помпы *SSUI-RI*. Уровень экспрессии данного аллеля гораздо выше, чем исходного гена *SSUI* [29], обеспечивая тем самым повышенный уровень устойчивости к сульфиту у штаммов-носителей [29, 30]. Недавно была обнаружена и другая транслокация между хромосомами XV и XVI, также приводящая к повышению экспрессии гена *SSUI* [31]. Две эти транслокации выявлены только у винных дрожжей, встречаются с высокой частотой и придают селективное преимущество за счет сокращения длительности лаг-фазы на среде с сульфитом. Таким образом, многовековая практика использования сульфита [32] могла сформировать «бутылочное горлышко», способствуя конвергентным эволюционным перестройкам, придающим адаптивное преимущество штаммам с химерным вариантом аллеля *SSUI*.

Другой пример доместикации с адаптивным значением – приобретение повышенной устойчивости к CuSO_4 . Сульфат меди широко используют в качестве фунгицида для защиты виноградников от мучнистой росы [33]. У штаммов европейских и японских линий эта устойчивость ассоциирована с увеличенным числом копий гена *CUP1*, кодирующего медь-связывающий белок металлотионеин [33, 34].

Вариация нуклеотидной последовательности промотора – другой способ усиления экспрессии гена *CUP1*, обнаруженный у штамма EC1118 [35].

Недавние полногеномные исследования выявили значительное число CNV винных штаммов с вероятным адаптивным значением.

Часто амплификации подвергаются гены транспортеров, дегидрогеназ, других белков, обеспечивающих устойчивость дрожжей к различным цитотоксическим агентам [8, 33, 36].

ПОТЕРЯ И ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНОВ

Транспортеры воды – аквапорины Aqy критически важны для выживания в условиях стресса «замораживания и оттаивания», предотвращая за счет экспорта воды внутриклеточное повреждение кристаллами льда [37]. С другой стороны, потеря функций Aqy благоприятна при использовании субстратов с высоким содержанием сахара для преодоления осмотического стресса. Лабораторные и промышленные штаммы, как и некоторые природные штаммы, несут нефункциональные аллели *AQY2* либо *AQY1* [38, 39]. Мутационная инактивация этих паралогов происходила многократно [40].

ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ.

Методы сравнительной геномики позволили выявить неожиданно-значительный вклад ГПГ в геномный ландшафт винных дрожжей. В геноме коммерческого штамма EC118 были обнаружены три хромосомных сегмента – А, В и С, приобретенных в результате независимых событий ГПГ от филогенетически удаленных дрожжевых штаммов [7]. Донором участка В оказались дрожжи *Zygosaccharomyces bailii* – частый контаминант сброженного винного сула [7, 41]. Многокопийные инсерции вариантов участка В были выявлены в различных винных штаммах [8, 41]. Происхождение участка С связано с относительно недавним событием ГПГ от дрожжей *Torulaspora microellipsoides* [42].

В составе всех трех сегментов аннотировано в общей сложности 39 генов с функциями, потенциально важными для виноделия, в частности, для катаболизма азота и углерода [7]. Некоторых гены локуса С были более подробно охарактеризованы. Так, ген *FSY1* кодирует высокоафинный H⁺ симпортер фруктозы, присутствие которого может быть важно на поздних стадиях ферментации, когда содержание фруктозы высоко [43]. Ген ксилитол-дегидрогеназы *XDH1* необходим для утилизации ксилитозы [44].

Тандемно-дублицированные гены *FOT1-2* кодируют олигопептидные транспортеры [45], и адаптивное значение этих генов было доказано экспериментально. Штаммы с повышенной экспрессией Fot-белков обеспечивали транспорт большего набора олигопептидов, особенно глутамат-богатых, что в условиях винообразования приводило к повышению скорости роста, эффективности брожения и жизне-

способности [42]. Более того, Fot-опосредованный транспорт пептидов существенно влиял на центральные пути метаболизма углерода и азота, синтез аминокислот и пептидов, ответ на оксидативный стресс, редокс-метаболизм, что, в свою очередь, приводило к снижению продукции уксусной кислоты, повышению содержания эфиров, позитивно влияя на органолептические свойства вина.

Способность к использованию различных ди- и трипептидов существенно варьирует у различных штаммов, и присутствие *FOT*-генов вносит важный вклад в эту фенотипическую вариабельность.

Важную роль в повышении эффективности азотного катаболизма могут играть и другие гены, входящие вместе с *FOT*-генами в состав этих новых локусов, перенесенных путем ГПГ. В их числе гены, кодирующие аспарагиназу, оксипролиназу, транспортеры аммиака, транскрипционные факторы генов ферментов утилизации лизина и пролина [7, 46].

ИНТРОГРЕССИЯ

В винных штаммах *S. cerevisiae* идентифицировано несколько участков интрогрессии (т.е. ГПГ в пределах рода) от штаммов *S. paradoxus*, *S. uvarum*, *S. eubayanus*. Протяженный участок генома *S. paradoxus*, переданный в коммерческие винные штаммы, охватывает район гена инвертазы *SUC2* и гена глюкан альфа 1,4 глюкозидазы, важной для технологии получения белых вин [47]. В составе перенесенного локуса также обнаружен ген *AWA1*, специфичный для сакэ штаммов и придающий гидрофобность клеточной поверхности.

Одно из недавних исследований посвящено экспериментальной проверке эволюционных преимуществ межвидовой гибридизации. Был получен экспериментальный гибрид *S. cerevisiae* x *S. uvarum* и подвергнут экспериментальному отбору в условиях голодания по азоту. В результате был отобран штамм с модифицированным химерным геном *MEP2*, кодирующим высокоаффинную аммоний-пермеазу [48]. Эта перестройка произошла в результате интрогрессии небольшого участка генома *S. uvarum* в хромосому XIV *S. cerevisiae* [48].

МЕЖВИДОВЫЕ ГИБРИДЫ

Межвидовые гибриды сахаромицетов широко используются как в пивоварении, так и виноделии. Наиболее известный пример – лагерные дрожжи *S. pastorianus* (*S. cerevisiae* X *S. eubayanus* [54]). Некоторые коммерческие винные штаммы также являются гибридами и полиплоидами – VIN7 (*S. cerevisiae* X *S. kudriavzevii*; [57], S6U (*S. cerevisiae* X *S. uvarum* [53, 54]), EP2 (*S. cerevisiae* X *S. kudriavzevii* [55]), и NT50 (*S. cerevisiae* X *S. kudriavzevii* [51, 55]).

В условиях винного брожения гибриды могут обладать определенными преимуществами, в том числе благодаря повышенной устойчивостью к различным видам стресса [56]. Например, *S. kudriavzevii* и *S. bayanus* лучше приспособлены к росту при пониженной температуре, а *S. cerevisiae* более устойчивы к этанолу. Природные гибриды этих штаммов лучше приспособлены к росту в условиях температурного и этанольного стресса, приобретая конкурентные преимущества каждого из родителей [57]. Подобные гибриды могут оказаться весьма ценными для технологий получения белого вина, когда используется пониженная температура ферментации для предотвращения потери ароматических соединений.

Генетические особенности гибридов могут и напрямую влиять на вкусовые характеристики вина. Описаны гибриды *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, отличающиеся повышенной продукцией эфиров и высших спиртов при сбраживании суслу из определенных сортов винограда [58, 59]. В условиях винного брожения такие гибриды образуют больше тиол 4-меркапто-4-метилпентан диона – ароматического соединения с сильным фруктовым ароматом [60]. Частая встречаемость таких гибридов может отражать их адаптивное преимущество, хотя нельзя исключить, что сами по себе стрессовые условия стимулируют процессы гибридизации [61].

Генетическая нестабильность гибридов приводит к значительной изменчивости их хромосомных наборов, другим хромосомным перестройкам и модификациям [52, 56, 62].

Молекулярный анализ 24 природных гибридов *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* выявил значительные вариации в их плоидности (от 2n до 4n) и содержании генетического материала *S. kudriavzevii* [63].

В уже не раз цитированной работе геномы 212 секвенированных винных штаммов были проанализированы на предмет присутствия генетического материала от других штаммов клады *Saccharomyces sensu stricto* [15].

В целом вклад последовательностей штаммов, отличных от *S. cerevisiae* оказался весьма незначительным. Однако у 17 штаммов были выявлены протяженные участки (более 10% отдельной хромосомы), перенесенные от геномов *S. paradoxus*, *S. uvarum*, *S. eubayanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevi*. При этом 12 из этих 17 штаммов содержали практически полный второй геном. Пять гибридов были получены в лабораторных условиях в результате редких событий скрещивания между винными штаммами и другими несакхаромицетными штаммами с целью создания новых коммерческих линий [64, 65]. Другие штаммы отличались высоковариабельной степенью полиплоидии. Например,

штамм NT50 содержал тетраплоидный геном *S. cerevisiae* и одну копию хромосомы 13 *S. kudriavzevii*. Штаммы S6U и WLP862 содержали значительную долю генетического материала от трех различных видов.

IV. МИКРОБНАЯ ЭКОЛОГИЯ ВИНА

До широкого введения стартовых культур сахаромисетов в основе виноделия лежало спонтанное брожение под действием микроорганизмов, присутствующих на поверхности ягод винограда, сборочного и винодельческого оборудования и т.д. Детальное представление о микробном сообществе вина стало доступно только недавно благодаря внедрению современных методов метагеномного анализа. Было установлено, что винное сусло и вино представляют собой сложную экосистему, представленную в основном дрожжами, бактериями и нитчатými грибами [66]. Межмикробные взаимодействия начинаются с поверхности ягод винограда в винодельнях и продолжаются в процессе спиртового брожения, осуществляемого дрожжами, и ЯМБ, осуществляемого молочнокислыми бактериями

Согласно литературным данным 93 различных вида дрожжей были обнаружены на поверхности 49 сортов винограда выращенного в 22 странах [67].

По крайней мере 15 видов дрожжей имеют отношение к процессу образования вина. Наиболее обильно (до 50% микрофлоры) на поверхности ягод винограда представлены *Kloeckera* и *Hanseniaspora* [68]. Другие дрожжи, обитающие на поверхности винограда, такие как *C. stellata*, *C. pulcherrima*, *B. intermedius*, *B. lambicus*, *B. custeri*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces spp.*, *Metschnikowia spp.*, *P. membranaefaciens*, *H. anomalaе* [66], также участвуют в процессе винообразования.

Бактериальное сообщество ягод винограда насчитывает более 50 видов, относящихся в основном к фирмикутам и протеобактериям. Фирмикуты представлены грамм-положительными семействами *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, относящимися к технологической группе молочно-кислых бактерий *Bacillaceae* и *Enterococcaceae* [69].

Соотношение дрожжевой и бактериальной микрофлоры, сахаромисетных и несхаромисетных дрожжей зависит от биотических и абиотических факторов и важно для тех химических и сенсорных изменений которые происходят в процессе брожения и влияют на качество получаемого вина. Присутствие нитчатых грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*, патогенов винограда (мучнистая роса, серая гниль) нежелательно, поскольку они могут производить микотоксины и соединения с неприятным запахом и вкусом [70].

В начале ферментации микрофлора винного суслу представлена в основном природными видами, присутствующими в составе мезги и обладающими низкой устойчивостью к этанолу – *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Candida* и небольшим количеством штаммов *S. cerevisiae* [71].

По окончании брожения состав микрофлоры вина резко меняется – чувствительные к этанолу виды дрожжей, бактерий и грибов почти полностью вытесняются *S. cerevisiae*. Ключевую роль в этом играют такие адаптивные преимущества сахаромикетов, как высокая скорость брожения, спиртоустойчивость, способность к анаэробному росту и т.д. Одна из наиболее примечательных характеристик *S. cerevisiae*, важных как с точки зрения понимания их экологии и эволюции, так и для практического виноделия заключается в их способности к спиртовому брожению в аэробных условиях (эффект Крабтри).

Для «Крабтри-позитивных» видов дрожжей способность к эффективному катаболизму ранее накопленного этанола лежит в основе адаптивной стратегии «произведи-накопи-потребь» (ПНП) [72]. Придерживаясь ПНП стратегии дрожжи сначала быстро сбраживают сахара с выделением этанола, подавляя рост других видов. Затем, после вытеснения конкурентов из данной экологической ниши, накопленный этанол используется спиртоустойчивыми дрожжами в качестве источника углерода [73].

Предполагают, что биохимические механизмы, лежащие в основе эффекта Крабтри, возникли в эволюционной истории сахаромикетов около 125–150 млн в результате предковой полногеномной дупликации [74], их становление шло параллельно эволюции покрытосеменных растений и появления их сочных, богатых легко сбраживаемыми сахарами плодов (125 млн лет назад). Дупликация привела к увеличению копийности генов транспорта и катаболизма глюкозы, позволила повысить эффективность анаэробного энергетического обмена, разделить с помощью двух изоформ алкогольдегидрогеназ функции производства и потребления этанола [75]. Другой важный для возникновения ПНП-стратегии полногеномный генетический эффект состоял, видимо, в глобальном изменении механизмов регуляции транскрипции генов респираторного метаболизма за счет утраты цис-регуляторных элементов [74].

Некоторые штаммы дрожжей обладают способностью к секреции белковых токсинов, обладающих летальным действием по отношению к чувствительным штаммам [76]. Такие штаммы-убийцы, или «киллеры», распространены как среди *S. cerevisiae*, так и дрожжей родов *Pichia*, *Kluveromyces*, *Candida* и др. Встречаются

и нейтральные штаммы, неспособные к секреции собственных токсинов, но устойчивые к токсинам других штаммов. Для виноделия феномен «киллерности» имеет двойное значение. Наличие киллер-фактора в стартовых культурах может способствовать подавлению эндогенной дрожжевой микрофлоры для обеспечения более стабильных ферментаций и предотвращения контаминации «спойлерными» видами дрожжей (например, рода *Brettanomyces*). И, с другой стороны, «киллеры» посторонних видов дрожжей могут препятствовать полноценному брожению, убивая или подавляя стартовые или эндогенные культуры. Сообщения о негативном влиянии киллерных штаммов на брожение периодически появляются, но в целом значение этого эффекта невелико. Возможные причины – относительно высокая частота «нейтральных» штаммов среди эндогенной и стартовой винодельческой микрофлоры и инактивация киллер-фактора в условиях виноделия под действием танинов, этанола, сульфита и пр. [23].

Молекулярная природа феноменов «киллерности» и «нейтральности» у дрожжей многообразна и до конца не выяснена. Можно рекомендовать несколько удачных обзоров для более подробного знакомства с результатами последних исследований в этой области [77, 78].

V. МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ ВИННОГО БРОЖЕНИЯ

Помимо методов сравнительной геномики, разнообразные постгеномные подходы, такие как транскриптомика, протеомика, метаболомика, функциональная геномика и др., являются эффективными инструментами для выявления биохимических механизмов, контролирующих важные винодельческие характеристики – продукцию этанола, содержание остаточного сахара, потребление азота, содержание летучих кислот, способность к синтезу ароматических веществ и др. Примером подхода «сверху вниз» является картирование локусов количественных признаков (QTL). Примером подхода «снизу вверх» является высокопроизводительный анализ коллекции нокаутов дрожжевых штаммов. Для винных штаммов такая коллекция пока не создана, однако некоторые параметры винного брожения можно моделировать с помощью лабораторных штаммов. Полнота и скорость винного брожения может контролироваться и эпигенетическим механизмом, модулируемым путем бактериальной химической сигнализации. Остановимся подробнее на этих подходах и полученных результатах.

ЛОКУСЫ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

Винодельческие характеристики дрожжей имеют комплексную природу и являются количественными, что убедительно показано недавно при сравнении 72 штаммов различного происхождения в условиях экспериментального виноделия [79].

Картирование QTL проводят путем скрещивания фенотипически-удаленных штаммов и поиска статистически-значимых ассоциаций между фенотипом и генетическими маркерами в потомстве этих гибридов [80]. Знание геномной последовательности позволяет в дальнейшем сузить район QTL до отдельных генов и отдельных полиморфизмов последовательностей этих генов.

Ряд дрожжевых QTL, например, уровень устойчивости к тепловому шоку, длина теломера, эффективность ДНК репарации были картированы таким методом [33, 81].

Для поиска специфичных для виноделия QTL были созданы специальные тестерные штаммы и обширный набор гибридов, что, наряду с разработкой методов высокопроизводительного скрининга, позволило выявить более 80 важных для виноделия локусов [82].

В недавней работе этот подход был использован для идентификации полиморфизма отдельных генов, определяющих важные для виноделия свойства – продукцию яблочной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты, этанола, глицерина, уровни остаточного сахара и поглощения азота [83]. Генетический анализ позволил выделить 18 QTL, некоторые из которых обладали плеiotропными эффектами. Дальнейший анализ позволил идентифицировать конкретные полиморфные сайты в генах, отвечающих за транспорт сахаров, митохондриальное дыхание и азотный метаболизм, которые являлись ключевыми в определении наблюдаемых фенотипических различий в винодельческих характеристиках.

Так, полиморфный вариант промотора гена *ALD6* обеспечивал 5-кратное повышение уровня экспрессии альдегиддегидрогеназы и продукции уксусной кислоты. Замены в консервативном участке ОРС для транскрипционного фактора *Nar4* и сцепленной ОРС белка *Mbr1* снижали экспрессию респираторных генов и повышали содержание остаточного сахара, более сложные эпистатические взаимоотношения были обнаружены между генами *FLX1* и *MDH2*, контролирующими уровень янтарной кислоты.

СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИИ ДЕЛЕЦИОННЫХ МУТАНТОВ

Другой подход к идентификации генов, важных для эффективного протекания винного брожения, описанный в недавней работе, основан на высокопроизводительном скрининге коллекции делеционных мутантов дрожжей [84]. Авторы использовали разработанную в рамках проекта по функциональной геномике коллекцию из 5100 «нокаут-мутантов» лабораторного штамма *S. cerevisiae* BY4741. Клетки выращивали в условиях микроферментации в 96 луночных планшетах на среде, имитирующей по содержанию глюкозы и азота состав винного сула. Отбирали штаммы с дефектами по скорости брожения (медленное или «застывшее» брожение), и подвергали их дополнительной проверке в условиях экспериментального виноделия. Несмотря на то, что лабораторный штамм BY4741 далек по своим характеристикам от винных штаммов, разработанная стратегия позволила выявить группу из 93 генов, образующих «ферментом», т.е. кодирующие белки важные для быстрого и полного брожения.

Анализ функций генов «ферментома» в терминах генной онтологии показал, что их продукты задействованы в ответе и адаптации к различным стрессовым условиям, регуляции автофагии, сигнальных путях отклика на источники углеводов, транспорте катионов и т.д. У девяти мутантов с полным блоком брожения оказались инактивированы гены, вовлеченные в такие разные процессы, как синтез трегалозы, гомеостаз ионов, поддержание клеточного pH и другие функции (табл. 3). Впрочем, все эти гены объединяло их доказанное ранее участие в комбинированной устойчивости к различным типам стресса – к этанольному, гиперосмотическому, тепловому и холодному шокам, к высушиванию, к сильному закислению среды и др.

Восемнадцать генов «ферментома» имели отношение к вакуолярной функции (компоненты комплекса вакуолярной H⁺-АТФазы и другие белки). Вакуоль важна для многих клеточных процессов, таких как протеолиз и рециркуляризация белков, гомеостаз кальция и фосфата, детоксикация ионов тяжелых металлов, осморегуляция, запасание аминокислот, транспорт мембранных белков. Не удивительно поэтому, что инактивация этих функций, особенно V-АТФазы как основного переносчика протонов между вакуолью и цитоплазмой, пагубно отражалась на устойчивости дрожжевых клеток к стрессовым условиям винного брожения.

Таблица 3. Ключевые гены «ферментома»

Ген	Белок	Функция	Роль при винном брожении
<i>TPS1</i> (<i>YBR126C</i>)	Трегалозо-6-фосфат синтаза	Биосинтез трегалозы – запасного дисахарида и «химического шаперона»	Защита от этанольного и оксидативного стресса, предотвращение окисления липидов, карбонилирования белков, поддержка целостности клеточных мембран, митохондрий, функционирования ферментов гликолиза.
<i>TPS2</i> (<i>YDR074W</i>)	Трегалозо-6-фосфат фосфатаза		
<i>SIN3 r</i>	Компонент комплекса Rpd3L, регулирующего транскрипцию генов теплового шока	Гистон-деацетилаза, плейотропные позитивные и негативные регуляторные эффекты	Защита от комбинированного действия различных типов стресса, регуляция экспрессии генов окислительного фосфорилирования.
<i>ZAP1</i> (<i>YGR285C</i>)	Фактор транскрипции	Индукция и репрессия цинк-регулируемых генов	Защита от этанольного и оксидативного стресса – ингибирование окисления сульфита, повышение пула NADPH, регенерация пероксиредоксина и глутатиона, синтез фосфолипидов и клеточной стенки, запасание веществ в вакуоли.
<i>SSQ1</i> (<i>YLR369W</i>)	hsp70-подобный шаперон митохондрий	Сборка Fe-S кластеров белков (аконитаза, митохондриальные белки репарации ДНК)	Предотвращение избыточного поступления железа в митохондрии, защита от оксидативного стресса.
<i>PLC1</i> (<i>YPL268W</i>)	Фосфолипаза C	Синтез инозитол 1,4,5-трифосфата (IP3) и 1,2-диацилглицерола (DAG).	Передача сигнала в GPCR системе Grg1p-Gra2p, сопряжение регуляции источниками азота и углерода, активация протеинкиназа C-зависимого MAP-киназного каскада, адаптация к условиям осмотического шока и повреждения клеточной стенки.
<i>TRK1</i> (<i>YJL129C</i>)	Высокоаффинный транспортер калия	Гомеостаз ионов	Устойчивость к высоким концентрациям глюкозы и низкому pH.
<i>PTK2</i> (<i>YJR059W</i>)	Серин-треониновая протеинкиназа	Глюкозная активация H+ATФазы	Регуляция транспорта ионов через плазматическую мембрану, поддержание гомеостаза pH в цитозоле.
<i>GPR1</i> (<i>YDL035C</i>)	Рецептор, сопряженный с G-белком	Сенсор доступности источников питания	Вместе с GPA2 (G-белок) отвечает за быструю адаптацию к высоким концентрациям глюкозы через активацию сигнального пути цАМФ-протеинкиназа А.
<i>SLM4</i> <i>YBR077C</i>	Компонент комплекса EGO-GSE мембраны вакуолей	Стимуляция микровавтофагии через активацию комплекса TORC1 в ответ на доступность лейцина и глутамина	Предотвращение ареста ферментации за счет активации TORC1 опосредованных процессов регуляции поглощения аминокислот, ранних стадий гликолиза, индукция микровавтофагии, эндоцитоза поврежденных молекул пермеазы аминокислот Gar1p для защиты плазматической мембраны.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ БРОЖЕНИЯ

Распространенная проблема виноделия, приводящая к порче вина, его окислению и загрязнению посторонней микрофлорой – медленное и «застывшее» брожение. При таком исходе дрожжи переходят в «латентное состояние», замедление брожения приводит к снижению концентрации спирта, увеличению содержания остаточного сахара, создавая благоприятные условия для роста портящих вино микроорганизмов. Основная причина «недобродов» – недостаток азота, несоблюдение температурного режима, некачественное сырье с избыточным содержанием сахара [85].

Однако недавно был обнаружен и еще один тонкий механизм, связанный с эпигенетическим контролем глюкозной репрессии у дрожжей и его модуляцией под действием системы сигнализации между бактериями и дрожжами, который может приводить к «застывшим ферментациям» [86, 87]. В основе эффекта лежит возможность преодоления глюкозной репрессии генов, отвечающих за утилизацию несбраживаемых источников углерода под действием необычного эпигенетического механизма, который авторы связывают с существованием «неамилоидной» формы дрожжевого приона, обозначенного как [GAR+] (resistant to Glucose-Associated Repression) [86]. Формирование данного приона опосредовано взаимодействием H^+ -АТФ-азы плазматической мембраны Pma1, транскрипционного регулятора Std1, белка теплового шока Hsp70. Важное следствие индукции [GAR+] – 40 кратное снижение транскрипции гена высокоаффинного транспортера глюкозы *HXT3*, что снижает эффективность спиртового брожения [86]. На адаптивное значение приона [GAR+] как механизма, позволяющего дрожжам одновременно усваивать широкий спектр углеродных субстратов, указывает его широкая распространенность у природных и винных штаммов *S. cerevisiae*, а также филогенетически удаленных представителей других дрожжевых клад [88].

Для винодельческой практики важен другой аспект формирования [GAR+], опосредующий установление симбиотических взаимоотношений между дрожжами и бактериями, населяющими данную экологическую нишу. Показано, что бактерии самых разных филогенетически-удаленных видов способны генерировать пока не идентифицированный химический сигнал, существенно повышающий частоту возникновения [GAR+] у соседствующих с ними дрожжевых клеток [87].

Конечно, [GAR+] штаммы не могут придерживаться «ПНП» стратегии, но за счет расширения своего метаболического репертуара они способны дольше выживать в условиях роста на смешанных углеродных субстратах. Для бактерий же выгода очевидна – сни-

жается концентрация губительного для них этанола и повышается концентрация легкодоступных углеводов.

Как можно учитывать данные эффекты в практике виноделия? Один из способов предотвращения микробной индукции [GAR+] – добавление сульфита, подавляющего рост бактерий [89]. Другие способы – контроль бактериального загрязнения винодельческого сырья с целью детекции штаммов, обладающих способностью к индукции [GAR+], использование штаммов с низкой частотой индукции [GAR+]. В качестве таковых можно использовать, например, трансгенные штаммы с «видовым барьером» индукции [GAR+], экспрессирующие гетерологичные Pma1 или Std1 из родственных видов дрожжей [86].

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ

Успехи в области дрожжевой геномики создали предпосылки для интенсивного использования микрочипов и техники RNAseq для анализа геной экспрессии у дрожжей.

В одном из первых исследований были обнаружены существенные изменения экспрессии более 2000 генов по мере адаптации клеток штамма EC118 к меняющимся в процессе виноделия физиологическим и биохимическим условиям. Гены многих метаболических и сигнальных путей, связанных с винным брожением, в том числе гены ферментов катаболизма азота, подвергались четкой согласованной регуляции [90, 91].

В условиях низкотемпературного брожения, важного для повышения качества вина, наблюдается индукция генов холодового шока, клеточного цикла и клеточной пролиферации. Эти и другие транскрипционные изменения коррелировали с повышенной жизнеспособностью клеток, улучшенной устойчивостью к этанолу, повышенной продукцией жирных кислот и эфиров [92].

Существенные межштаммовые различия в экспрессии примерно 30% генов, отвечающих за формирование аромата вина, были обнаружены в трех штаммах дрожжей в условиях брожения при нормальной (28°C) и пониженной (12°C) температурах. Среди этих генов выделялись гены белков метаболизма и транспорта аминокислот, ацил и ацетилтрансфераз, декарбоксилаз, альдегиддегидрогеназ и алкогольдегидрогеназ [93]. Подобные исследования, в частности по анализу геной экспрессии у винных штаммов дрожжей в зависимости от доступности источников азота [94, 95], ясно показывают, что вариации в геной экспрессии тесно связаны с фенотипическим разнообразием винных штаммов.

Наиболее значительные изменения в транскриптоме винных дрожжей наблюдаются на стадии перехода культур в стационарную фазу роста [96]. Так, 223 гена, резко индуцируемые на различных стадиях ферментации, были выделены в специфическую группу генов «ответа на стресс брожения» (Fermentation stress response, FSR) [91], причем более 60% этих генов являются новыми, их функции не были ранее описаны.

Таким образом, углубленное представление о глобальной динамике геной экспрессии у винных дрожжей представляется принципиально важным для установления функций новых генов дрожжей, совершенствования технологий винного брожения, выявления геномишеней для получения улучшенных штаммов с использованием современных постгеномных подходов.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ

Дрожжи-сахаромицеты легко подвергаются различным генетическим манипуляциям и многие приемы генетической инженерии лабораторных штаммов дрожжей могут быть использованы для модификации генома винных штаммов с целью улучшения их винодельческих характеристик.

К таким характеристикам относятся, в частности, высокая эффективность брожения, устойчивость к сульфиту, устойчивость к этанолу, высокая осмотолерантность, устойчивость к высушиванию, высокий уровень образования глицерина, низкий уровень образования этилкарбамата и т.д. [23].

Примеры успешного применения генно-инженерных подходов для создания улучшенных винных штаммов весьма многочисленны.

Так, за счет конститутивной оверэкспрессии генов *GPD1* (глицерин-3-фосфат дегидрогеназа) и *FPS1* (глицериновый канал) удалось в 2–4 раза повысить уровень продукции внеклеточного глицерина винными штаммами [97]. Повышение соотношения глицерина к этанолу важно для производства низкоалкогольных вин и улучшения «тела» вина [98].

Скорость сбраживания винограда сорта Паломино винными штаммами удается существенно повысить за счет экспрессии гена *FSY1*, кодирующего транспортер фруктозы, что приводит к снижению содержания остаточного сахара в сусле [99].

Трансгенный штамм винных дрожжей VIN13 способствующий улучшению аромата белого вина Савиньон [100] был получен путем конститутивной экспрессии гена *E. coli*, кодирующего углерод-сульфурилазу.

Два трансгенных штамма дрожжей разрешены к использованию в США, Канаде и Молдавии. Штамм ML01 способен осуществлять ЯМБ, которое обычно проходит под действием молочнокислых бактерий *Oenococcus oeni*. Эти бактерии достаточно прихотливы и поэтому эффективность ЯМБ достаточно вариабельна, что влияет на качество вина. Штамм ML01 содержит два чужеродных гена *mae1*, кодирующий транспортер малата из *Schizosaccharomyces pombe* и ген *mleA O.oeni*, кодирующий фермент ЯМБ [101].

Штамм 522 был создан для снижения риска образования потенциального канцерогена – этилкарбамата в процессе брожения. Данный штамм содержит ген фермента катаболизма карбамата *DURI,2* под контролем конститутивного промотора гена *PGK1* [102], не содержит чужеродной ДНК постороннего происхождения (только гены дрожжей), и, следовательно, не подпадает под ограничения, связанные с проблемами регистрации ГМ штаммов (является «цисгенным»).

Несмотря на очевидные преимущества ГМ штаммов дрожжей в виноделии, они не получили большого распространения и плохо принимаются международным сообществом [110]. Во многом это объясняется особенностями существующего законодательства в области использования ГМО в пище в разных странах.

VI. БИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ ХЕРЕСНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Херес – это вино, полученное под пленкой хересных дрожжей, культивируемых на поверхности сухих виноматериалов, подспиртованных до 16,5 % об. в неполных емкостях или глубинным способом [105]. Такое вино благодаря длительной биологической выдержке приобретает неповторимые особенности букета и вкуса.

Технологии биологической выдержки хересных вин (БВХВ) традиционны для ряда стран Европы (Венгрии, Франции, Испании и Италии) и используются для получения таких всемирно-известных марок как Юрское желтое (Франция), Верначча ди Ористано (Сардиния, Италия), Самородный сухой токай (Венгрия), различные типы Хереса (Испания) [106].

Способы БВХВ отличаются в разных странах. На Сардинии после окончания брожения вино переливают в бочки из дуба и каштана заполненные на 9/10 объема, где и происходит биологическая выдержка под действием хересных дрожжей с последующим этапом окисления. Во Франции (Юра), сначала в отдельных емкостях прово-

дят винное брожение, после окончания которого биологическая выдержка происходит с использованием стартовых культур дрожжей.

В Испании используется другая технология, основанная на сочетании систем «собретабла» и «солера». Собретабла – первая фаза, состоит в сбраживании сусла в 500–600 л дубовых бочках с получением молодого вина, которое закрепляют добавлением спирта до 15–16%. На второй фазе используются дубовые бочки, расположенные в несколько ярусов и содержащие вино на различных стадиях выдержки под пленкой хересных дрожжей. Нижний ярус, «солера», содержит самое старое вино. Поверх «солеры» располагаются ярусы 1-ой, 2-ой и 3-ей криадеры, содержащие все более молодое вино. Вино на продажу отбирают из «солеры» и равный отобранному объем (1/3 общего объема) заменяют вином из верхнего яруса и так далее, пока не дойдет очередь до молодого вина на верхнем ярусе [106].

Таким образом, происходит перемешивание вина и его органолептические свойства всегда постоянны в пределах определенного яруса. Коллекционные хересные вина – одни из самых ценных, стоимость одной бутылки может исчисляться десятками тысяч долларов.

В России, а затем в СССР, работы по микробиологии хересных вин были начаты в 1909 г. А.М.Фроловым-Багреевым и продолжены Н.Ф.Саенко в Магарачской энохимической лаборатории. Была проведена селекция хересных дрожжей по признакам спиртоустойчивости и интенсивности альдегидообразования и отобраны штаммы, которые быстро образуют пленку на вине с 16,5% об. спирта. В опытах Н.Ф.Саенко были установлены также оптимальные концентрации этилового спирта, сульфита, железа, остаточный сахар, значения температуры и pH, важные для проведения хересного брожения и формирования устойчивой пленки. За счет комбинации селекционированных рас дрожжей и оптимальных методов виноделия в НИИВиВ «Магарач» (г. Ялта) была разработана ускоренная технология БВХВ. В дальнейшем в различных винодельческих районах бывшего СССР (Армения, Узбекистан, Дагестан) были выделены местные расы хересных дрожжей с высокой спиртоустойчивостью и биохимической активностью, которые были использованы для производства местных хересоподобных вин.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ВЫДЕРЖКИ

Винное брожение и БВХВ – два принципиально различных процесса, протекают в различном биохимическом окружении и с использованием штаммов с различными биохимическими и физиологическими характеристиками.

Прежде всего, различается расположение клеток винных и хересных дрожжей в сосуде с виноматериалом. При винном брожении дрожжи располагаются равномерно по всему объему, в виде суспензии, в то время как при БВХВ дрожжевые клетки образуют многоклеточные агрегаты и поднимаются на поверхность вина с образованием биопленки (веллум, флор). При этом биопленка может установиться как немедленно после окончания брожения, так и на последующих стадиях.

Для роста дрожжи нуждаются в источниках углерода и азота, микроэлементах и витаминах, которыми богато винное сусло – высокие концентрации глюкозы и фруктозы (от 150 до 260 г/л), достаточные концентрации азотистых веществ (50 до 400 мг /л).

При БВХВ же глюкоза и фруктоза почти полностью отсутствуют и заменяются этанолом и побочными продуктами – глицерин, органические кислоты, высшие спирты и их ацетаты. Концентрации этанола достигает 16%, глицерина – 6–10 г/л.

Истощение глюкозы и фруктозы и присутствие кислорода заставляют хересные дрожжи переключать метаболизм с бродильного на окислительный (диауксический рост) и использовать несбраживаемые источники углерода [107].

Достаточное содержание источников азота важно не только для поддержания роста и метаболизма дрожжей, но и как фактора, определяющего полноту и скорость брожения [108]. При БВХВ основным источником азота становится пролин [124].

Аэробный рост на доступных источниках углерода и азота приводит к существенным изменениям в общем составе вина и его органолептических свойствах. Одной из основных реакций процесса БВХВ является окисление этанола в ацетальдегид, происходящий под действием алкогольдегидрогеназы.

Для проявления характерного хересного тона содержание ацетальдегида должно быть на уровне 200–350 мг/дм³. В процессе БВХВ его количество может достигать 1000 мг/дм³, а количество ацеталей, в частности диэтилацеталя, может достигать 50–60 мг/дм³. Влияние ацетальдегида в основном проявляется в появлении фруктовых оттенков в аромате виноматериала.

В процессе выдержки и старения хересных вин значительно снижается содержание глицерина (от 9–7 до 3–2 г/дм³), летучих кислот (особенно уксусной), яблочной кислоты и аминокислот. В то же время под хересной пленкой образуются некоторые органические кислоты (щавелевая, фумаровая, гликолевая, глутаровая и др.), которых не было в исходном виноматериале.

В процессе окислительного метаболизма хересных дрожжей синтезируются основные ароматобразующие вещества: алифатические ацетали (1,1-диэтоксигетан); циклические ацетали (диоксаны и диоксоланы), которые образуются из глицерина и ацетальдегида; кетоны (диацетил и ацетоин), придающие аромату хереса молочно-сырные оттенки [111].

Особое внимание в исследованиях уделяется кетону фуранового ряда – сотолону, который ответственен за проявление ореховой гаммы в аромате и вкусе вина. Данные исследований [112] показывают, что сотолон образуется в результате альдольной конденсации между ацетальдегидом и α -кетомасляной кислотой в результате деградации треонина. По мнению авторов, такой процесс может проходить только под действием хересных дрожжей. Специфическими компонентами для хереса, полученного пленочным способом, также являются лактоны.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ХЕРЕСНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Дрожжи, используемые для БВХВ пленочным методом, должны быть спиртовыносливыми и способными к быстрому размножению и образованию пленки на поверхности вина, содержащего до 16,5 % об. спирта, в условиях низкого рН и высокого содержания сульфитов, активно окислять этанол в альдегиды и ацетали. В отличие от других пленчатых дрожжей (не сахаромикетов), эти дрожжи не способны портить вина путем глубокого окисления спиртов, вплоть до воды и углекислого газа. Высокое содержание спирта в вине обеспечивает чистоту брожения, подавляет развитие уксуснокислых бактерий и посторонних видов дрожжей.

Жесткие условия БВХВ являются важным фактором искусственного отбора хересных дрожжей, сформировав их различные группы.

Пленчатые дрожжи, выделенные из флоры на поверхности хересных вин, долгое время считались специфическими расами *S. cerevisiae* в силу их уникальной физиологии, однако до последнего времени у нас не было представления о степени их родства между собой.

Первая попытка классификации хересных дрожжей на основе их способности к сбраживанию различных сахаров (галактозы, декстрозы, лактозы, мальтозы, мелибиозы, раффинозы, сахарозы) привела к выделению 4 рас: *Saccharomyces cerevisiae* var. *beticus*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *cheresiensis*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *montuliensis* и *Saccharomyces cerevisiae* var. *rouxii* [113]. Эти штаммы

также были обнаружены среди юрских пленчатых дрожжей [114]. Более поздние исследования показали, что, несмотря на высокую степень полиморфизма мтДНК, для всех испанских хересных дрожжей характерна 24 пн делеция в участке ВТС1, предполагая их тесное филогенетическое родство [115]. Для французских дрожжей характерна другая аллель ВТС1 [114].

Следствием мутагенного действия высоких концентраций этанола и ацетальдегида, как полагают, может быть вариабельность структуры мтДНК хересных дрожжей и значительная анеуплоидия некоторых групп штаммов [116, 117].

Генотипирование хересных дрожжей из различных географических регионов с помощью микросателлитных маркеров показало, что, как ни странно, большинство их представителей из Испании, Италии, Франции и Венгрии принадлежат к одной генетической группе [118], разбивающейся легко на субкластеры специфичные для штаммов из каждой страны. Некоторые штаммы из Юрской группы отличаются по размеру кодирующей последовательности гена *FLO11* и наличию 111 пн делеции в промоторе. Юрские штаммы с такой делецией образуют более плотную пленку, пленка же у штаммов с более протяженной ОРС *FLO11* и промотором «дикого типа» более тонкая [118]. Любопытно, что некоторые венгерские штаммы гетерозиготны по этой делеции. Данные филогении, таким образом, свидетельствуя об общем происхождении хересных штаммов и их миграции в пределах Европы, иллюстрируют их эволюционный успех, связанный с адаптацией к определенной экологической нише и опосредованный наличием определенных генетических особенностей (полиморфизм *FLO11* и т.п.).

МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ ПЛЕНКИ И ФИЗИОЛОГИЯ ХЕРЕСНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Способность хересных дрожжей к флокации и образованию пленки – ключевая характеристика, тесная связанная со степенью гидрофобности их клеточной поверхности и, в свою очередь, с составом маннопротеинов клеточной стенки и модификацией липидного состава [134]. Методами классического генетического анализа было установлено, что ключевая роль в образовании пленки принадлежит гену *FLO11* [121], что было подтверждено в многочисленных последующих исследованиях [122–124]. Ген *FLO11* кодирует один из поверхностных адгезинов дрожжей и представляет собой GPI-закоренный белок с протяженным центральным участком, обогащенным остатками серина и треонина. Делеция гена *FLO11* блокирует фор-

мирование пленки, однако само по себе наличие данного гена не гарантирует способность дрожжей к хересованию. Сравнительный анализ последовательностей *FLO11* у различных штаммов выявил существенную генетическую изменчивость как регуляторных, так и кодирующих последовательностей [118, 124, 125].

В промоторе гена *FLO11* одного из хересных штаммов была обнаружена делеция размером 111 пн, отсутствующая у лабораторного штамма [124], а также другие делеции и перестройки. В дальнейшем было показано, что эта делеция инактивирует длинную некодирующую РНК ICR1, кодируемую (–) цепью промотора *FLO11*, стимулируя тем самым синтез белка Flo11 [126]. Размеры кодирующих последовательностей Flo11 также изменчивы (от 3 до 6 тпн) и определяются в основном числом повторов в центральном домене. Исходно было показано, что хересные штаммы кодируют более протяженные варианты Flo11 с более высокой степенью гидрофобности. Однако затем было показано, что центральный домен Flo11 крайне нестабилен в неселективных условиях и что важную роль в способности дрожжей к флотации играют и другие повторы, а также непосредственно уровень экспрессии гена *FLO11* [127].

Механизмы регуляции экспрессии гена *FLO11* исключительно сложны. Промотор *FLO11* – один из самых протяженных в геноме дрожжей, содержит цис-регуляторные элементы для 4 известных позитивных регуляторов и 9 негативных [128]. Основная часть этих регуляторных элементов являются мишенями для MAPK зависимого киназного пути, цАМФ зависимого каскада и Gcn4p-зависимого пути [129]. В регуляции экспрессии *FLO11* также задействованы рН зависимые пути и комплексы ремоделирования хроматина [130]. Представленная на рис. 3 схема, конечно, не позволяет понять, как, собственно, взаимодействуют эти многочисленные факторы (подробное изложение выходит далеко за рамки настоящего обзора), но дает общее представление о хитросплетении разных путей и механизмов среди более чем полусотни генов, связанных с регуляцией экспрессии *FLO11*.

Другой важный и малоизученный аспект БВХВ – степень гликозилирования белка *FLO11*. Показано, что мутант, дефектный по гликозилированию *FLO11*, утрачивает способность к формированию пленки [131].

Помимо *FLO11* для формирования пленки важна активность и других генов, например *HSP12* и *NRG1* [132, 133]. Показано, что делеционные мутанты по *HSP12* утрачивают способность к пленкообразованию, делеция же С-концевого домена Nrg1 наоборот,

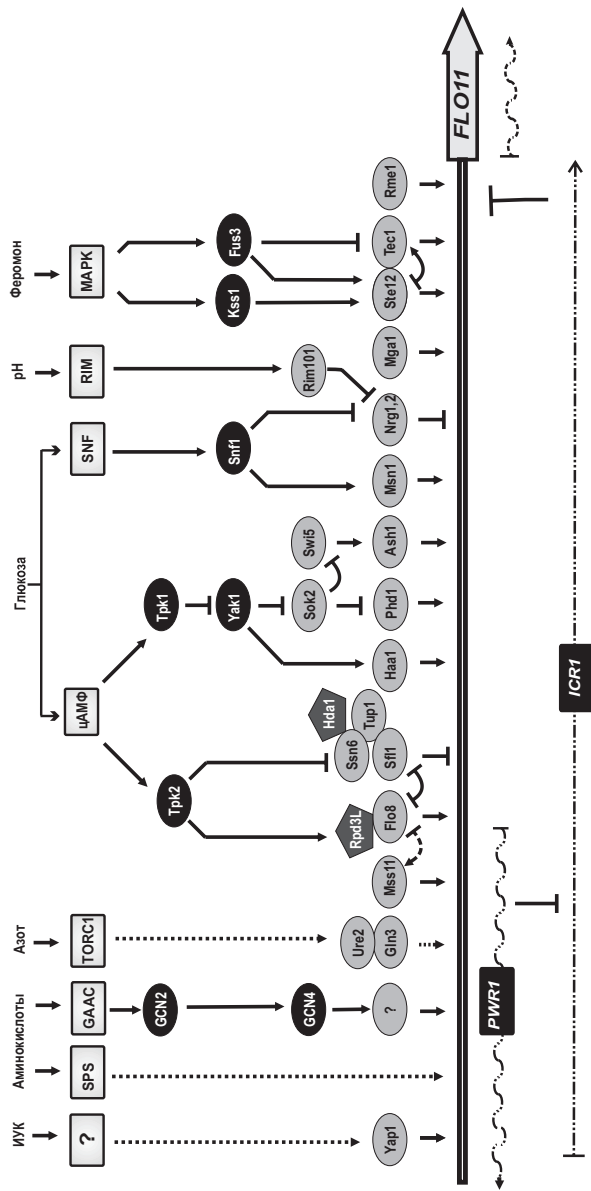


Рис. 3. Уровни регуляции промотора *FLO11* (а) Комплексный характер регуляции промотора *FLO11* под действием молекулярно-генетических и эпигенетических механизмов. Стрелками показана положительная регуляция, перекладинами – негативная. В верхней части рисунка указаны различные стимулы и соответствующие сигнальные пути, воздействующие на *FLO11* (ИУК = индол-3-уксусная кислота; ? = неизвестный путь). Светло-серые квадраты – сигнальные пути регуляции, черные овалы – входящие в регуляторные каскады. Ремоделирующие хроматин участки указаны черными пятиугольниками. Серыми овалами обозначены факторы транскрипции, регулирующие *FLO11*. Расположение различных факторов на промоторе указано схематически и не соответствует положению известных сайтов связывания. Волнистыми линиями указаны регуляторные РНК и мРНК, влияющие на экспрессию *FLO11*. Воспроизведено с модификациями по [128].

активирует этот процесс [133]. Опосредованно влияет на пленкообразование белок *Vtn2*, кодирующий один из компонентов аппарата внутриклеточного белкового сортинга [134].

Определенную роль в формировании пленки может играть и гликопротеин *Csw7/Pir2/Hsp150* клеточной стенки. Известно, что размер этого белка резко различается у хересных штаммов (87 кДа) и лабораторных штаммов (117 кДа) [135], что связано с делецией определенных повторяющихся мотивов. Другая важная физиологическая особенность хересных дрожжей, помимо способности к флотации – их устойчивость к этанольному и ацетальдегидному стрессу. Важную роль в этом процессе играют белки теплового шока – *Hsp12*, *Hsp82*, *Hsp104*, и, особенно *Hsp26* [136]. Важно отметить дифференциальную экспрессию генов альдегиддегидрогеназ (*ALD2/3*, *ALD4*, *ALD6*) у хересных и винных дрожжей [137]. Уровень активности этих ферментов у хересных дрожжей выше, обеспечивая их потребность в использовании этанола как основного источника углерода. Устойчивость к повышенным концентрациям альдегида определяется общими механизмами, опосредуемыми транскрипционными факторами *Msn2/4* and *Hsf1* [137].

В митохондриях в условиях аэробного окисления этанола существенно возрастает концентрация АФК, которые, в свою очередь, могут повреждать мтДНК [116]. Для защиты от оксидативного стресса хересные дрожжи выработали эффективную антиоксидантную систему, связанную, в том числе, с повышенной экспрессией супероксиддисмутазы *SOD1* [138]. Принудительная оверэкспрессия «антиоксидантных» генов (*HSP12*, *SOD1*, *SOD2*) в хересных дрожжах приводит к ряду положительных эффектов – ускоряет пленкообразование, повышает содержание внутриклеточного глутатиона, снижает концентрацию перекисных липидов, повышает жизнеспособность и пр., наглядно демонстрируя, тем самым, важность антиоксидантной защиты для физиологических и винодельческих характеристик [139].

ГЕНОМИКА, ПРОТЕМИКА, МЕТАБОЛОМИКА ХЕРЕСНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Первым инструментом, использованным для понимания механизмов адаптации винных и хересных дрожжей к специфическим условиям виноделия [131] стала техника гибридизации геномной ДНК исследуемых штаммов с микроматрицами, содержащими упорядоченные фрагменты клонированной геномной ДНК референсного штамма S288C. Этот прием, называемой матричной сравнительной геномной гибридизацией (МСГГ), позволяет выявлять CNV с высокой

точностью. Данные анализа размеров и числа хромосом штаммов хересных дрожжей методом пульс-электрофореза исходно предполагали, что для хересных дрожжей характерна высокая степень анеуплоидии, однако дальнейший подробный анализ показал, что эти штаммы в основном истинные диплоиды. Данные мСГГ шести хересных штаммов подтвердили это наблюдение, не обнаружив протяженных участков амплификации или делеции генов по сравнению с штаммом S288C [118]. Незначительная потеря генов была выявлена в прителомерных участках, амплификации же оказались подвержены только 3 гена – *FRE2*, *MCH2* и *YKL222C* [118]. *MCH2* кодирует транспортер монокарбоновых кислот и важен для выживания дрожжей на второй стадии спиртового брожения [141]. Роль двух других генов еще предстоит уточнить. Очевидно, что для углубленного анализа генетических особенностей хересных дрожжей требуется использование современных методов полногеномного секвенирования и постгеномного анализа (транскриптомика, протеомика и пр.).

Применение протеомных и метаболомных методов в последние годы позволило существенно расширить наши представления о метаболизме хересных дрожжей и механизмах их приспособления к внешним условиям. Так, при протеомном анализе митохондрий хересных штаммов [142] были выявлены группы дифференциально-экспрессируемых белков, вовлеченных в окислительный углеродный метаболизм, образование пленок, апоптоз, устойчивость к оксидативному и этанольному стрессам. Также наиболее представленными в условиях пленкообразования оказались белки катаболизма несбраживаемых источников углерода, глиоксилатного цикла и цикла Кребса, клеточного дыхания, инозитольного метаболизма и т.д. [143]. Например, уровень белка Ino1, участвующего в синтезе инозитола, в условиях образования биопленок был повышен в 5 раз. В этом же исследовании были идентифицированы и белки важные для синтеза клеточной стенки и межклеточной адгезии.

За счет комбинации методов протеомики и новейших метаболомных подходов было проведено количественное определение минорных летучих соединений, выделяемых в условиях пленкообразования, и идентифицированы 33 белка, напрямую вовлеченных в метаболизм этанола, глицерина и 17 ароматических соединений [144].

Важным фактором, влияющим на органолептические показатели хереса, является продукция специфических ароматических соединений. Наиболее характерным для биологически выдержанных вин является накопление ацетальдегида, а также снижение содержания летучих кислот и глицерина [145–148]. Среди 35 идентифицированных

ароматических соединений [147] наиболее существенными для букета вина оказались ацеталацетальдегид, 1,1-диэтоксиэтан, 2,3-бутандиол, изоамиловый спирт, этилацетат и изоамилацетат, бутановая кислота, 2,3-метилбутановая кислота, 4-бутиролактон. Концентрации всех этих 35 соединений демонстрировали существенные различия после биологической выдержки по сравнению с контрольным не аэрированным виноматериалом [146, 149].

Эти данные были подтверждены и дополнены в исследованиях [147], посвященных изучению периодической аэрации на содержание таких метаболитов, как ацетальдегид и его производные, высшие спирты, их эфиры с уксусной кислотой. В условиях биологической выдержки содержание этих веществ возрастало, в то же время содержание С4, С5 и С6 карбоновых кислот снижалось, близкими к нулю оказались уровни таких соединений, как 2-бутанол, различных лактонов, 3-этокси-1-пропанола и нерала.

Поскольку содержание внутриклеточных ферментов непосредственно влияет на уровни продукции секретируемых дрожжами метаболитов, и, следовательно, на сенсорные качества вина, полученные знания могут оказаться полезными для разработки будущих технологий виноделия.

ДИНАМИКА МИКРОФЛОРЫ ВИНА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ХЕРЕСА

Динамика микрофлоры при БВХВ связана со специфическими особенностями его разных стадий. По мере увеличения концентрации спирта, снижения рН и добавления сульфита исходная микрофлора, присутствующая на винограде, сменяется на ограниченное число видов дрожжей, присутствующих в составе хересной пленки. Однако и исходная микрофлора оказывает существенное влияние на конечные органолептические показатели. Влияние этой флоры неоднозначно – с одной стороны, присутствие штаммов рода *Pichia* нежелательно, поскольку они образуют этил ацетат, штаммы родов *Hanseniaspora* и *Kloeckera* образуют высокие нежелательные уровни ацетата, ацетальдегида, ацетоина. С другой стороны, эти штаммы способны синтезировать различные ферменты – протеазы, липазы, эстеразы, пектиназы, обладающие позитивным эффектом на аромат вина. Другие виды родов *Kluyveromyces*, *Torulaspota* и *Saccharomyces* оказывают существенное влияние на конечный аромат вина благодаря их способности к превращению монотерпеновых спиртов в процессе брожения [52].

Соотношение различных рас хересных дрожжей, а также молочнокислых бактерий в составе пленок на поверхности хересного сула,

производимого в Испании, Франции, Италии, Венгрии неодинаково, и в значительной степени, определяет различия в органолептических показателях вина.

Углубленное понимание влияния эффектов присутствия отдельных видов дрожжей на конечные органолептические показатели вина позволит создавать смешанные стартовые культуры дрожжей определенного состава для получения вина с заданными характеристиками букета и аромата [46].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бурный прогресс геномных исследований привел к более глубокому пониманию популяционной структуры и эволюционной истории *Saccharomyces*. Были предоставлены свидетельства адаптации винных штаммов, демонстрирующие, что винные штаммы используют самые разнообразные генетические механизмы для приспособления к условиям виноделия. Расширение набора штаммов с расшифрованными геномами, выделенных из «винных» экологических ниш и других местообитаний позволяет лучше понять эволюционную историю сахаромицетов и относительный вклад различных механизмов геномной пластичности. Доступность значительного числа геномных последовательностей должна способствовать идентификации аллельных вариантов и дивергентных участков, отвечающих за винодельческие характеристики. Например, хересные и винные дрожжи, принадлежащие к близкородственным группам с резко различными жизненными стилями, могут представлять адекватную модель для выявления дивергентных участков, объясняющих адаптацию дрожжей к этим нишам.

Новые важные сведения о природе клеточных функций, лежащих в основе ответа и адаптации дрожжей к условиям винного брожения, были получены с использованием генетических, протеомных, транскриптомных подходов.

Таким образом, использование современных геномных и постгеномных инструментов значительно углубило наши представления о природе молекулярных различий, лежащих в основе фенотипического разнообразия штаммов дрожжей, связи между молекулярно-генетическими данными и определенными производственными показателями. Следует ожидать, что эти успехи будут способствовать разработке стратегий направленного отбора и создания новых штаммов с помощью «классических» и современных методов, совершенствованию технологий виноделия.

ЛИТЕРАТУРА

1. McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C-S., Cheng, G., Zhao, Z. Wang, C. (2004) Fermented beverages of pre- and proto-historic China, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 17593–17598.
2. McGovern, P.E., Glusker, D.L., Exner, L.J., & Voigt, M.M. (1996) Neolithic resinated wine, *Nature*, **381**, 480–481.
3. Cavalieri, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., & Polsinelli, M. (2003) Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine, *Journal of Molecular Evolution*, **57**, 226–232.
4. Griffith, M.P. (2004) Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture, *Economic Botany*, **58**, 488–488.
5. Pasteur, L. (1858) Nouveaux faits concernant l'histoire de la fermentation alcoolique, *Comptes Rendus Chim.*, **47**, 1011–1013.
6. Cubillos, F.A., Vásquez, C., Faugeron, S., Ganga, A., Martínez, C. (2009) Self-fertilization is the main sexual reproduction mechanism in native wine yeast populations, *FEMS Microbiology Ecology*, **67**, 162–170.
7. Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., Dequin, S. (2009) Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 16333–16338.
8. Borneman, A.R., Desany, B.A., Riches, D., Affourtit, J.P., Forgan, A.H., Pretorius, I.S., Egholm, M., Chambers, P.J. (2011) Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Genetics*, **7**, e1001287.
9. Magwene, P.M. (2014) Revisiting mortimer's genome-renewal hypothesis: Heterozygosity, homothallicism, and the potential for adaptation in yeast, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **781**, 37–48.
10. Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., Cavalieri, D. (2012) Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 13398–13403.
11. Wang, Q.M., Liu, W.Q., Liti, G., Wang, S.A., Bai, F.Y. (2012) Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity, *Molecular Ecology*, **21**, 5404–5417.
12. Legras, J.L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., Karst, F. (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history, *Molecular ecology*, **16**, 2091–2102.
13. Schacherer, J., Shapiro, J.A., Ruderfer, D.M., Kruglyak, L. (2009) Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature*, **458**, 342–345.
14. Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O'Kelly, M.J., van Oudenaarden, A., Barton, D.B., Bailes, E., Nguyen, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts, *Nature*, **458**, 337–341.
15. Borneman, A.R., Forgan, A.H., Koulouchova, R., Fraser, J.A., Schmidt, S.A. (2016) Whole Genome Compa-

- rison Reveals High Levels of Inbreeding and Strain Redundancy Across the Spectrum of Commercial Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *G3 Genes Genomes Genetics*, **6**, 957–971.
16. Fay, J.C., Benavides, J.A. (2005) Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Genetics*, **1**, e5.
 17. Sicard, D., Legras, J.L. (2011) Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex, *Comptes Rendus – Biologies*, **334**, 229–236.
 18. Cordente, A.G., Curtin, C.D., Varela, C., Pretorius, I.S. (2012) Flavour-active wine yeasts, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **96**, 601–618.
 19. Styger, G., Prior, B., Bauer, F.F. (2011) Wine flavor and aroma, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **38**, 1145–1159.
 20. Sablayrolles, J.M. (2008) Fermented beverages: the example of wine-making, *Advances in fermentation technology*, 322–347.
 21. Sipiczki, M. (2010) Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome – a review, *Annals of Microbiology*, **61**, 85–93.
 22. Strobe, P.K., Skelly, D.A., Kozmin, S.G., Mahadevan, G., Stone, E.A., Magwene, P.M., Dietrich, F.S., McCusker, J-H. (2015) The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. *Genome research*, **25**, 762–774.
 23. Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine-making, *Yeast*, **16**, 675–729.
 24. Barrio, E., González, S.S., Arias, A., Belloch, C., Querol, A. (2006) Molecular Mechanisms Involved in the Adaptive Evolution of Industrial Yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*, pp. 153–174, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
 25. Blondin, B., Dequin, S., Querol, A., Legras, J.-L. (2009) Genome of *Saccharomyces cerevisiae* and related Yeasts, In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, pp. 361–378, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
 26. Dequin, S., Casaregola, S. (2011) The genomes of fermentative *Saccharomyces*. *Comptes Rendus Biologies*, **334**, 687–693.
 27. Louis, E.J., Fischer, G., James, S.A., Roberts, I.N., & Oliver, S.G. (2000) Chromosomal evolution in *Saccharomyces*, *Nature*, **405**, 451–454.
 28. Borneman, A.R., Forgan, A.H., Pretorius, I.S., Chambers, P.J. (2008) Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain, *FEMS Yeast Research*, **8**, 1185–1195.
 29. Goto-Yamamoto, N., Kitano, K., Shiki, K., Yoshida, Y., Suzuki, T., Iwata, T., Yamane, Y., Hara, S. (1998). SSU1-R, a sulfite resistance gene of wine yeast, is an allele of SSU1 with a different upstream sequence, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **86**, 427–433.
 30. Yuasa, N., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Iimura, Y. (2004) Distribution of the sulfite resistance gene SSU1-R and the variation in its promoter region in wine yeasts, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **98**, 394–397.
 31. Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P. (2014) QTL dissection of lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite, *PLoS One*, **9**, e86298.
 32. Pérez-Ortín, J.E., Querol, A., Puig, S., Barrio, E. (2002) Molecular

- characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains, *Genome Research*, **12**, 1533–1539.
33. Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F.A., Zia, A., Gjuvslund, A., Simpson, J.T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S.W., Louis, E.J., Liti, G., Moses, A., Blomberg, A. (2011) Trait variation in yeast is defined by population history, *PLoS Genetics*, **7**, e1002111.
34. Almeida, P., Barbosa, R., Zalar, P., Imanishi, Y., Shimizu, K., Turchetti, B., Legras, J.L., Serra, M., Dequin, S., Couloux, A., Guy, J., Bensasson, D., Gonçalves, P., and Sampaio, J.P. (2015) A population genomics insight into the Mediterranean origins of wine yeast domestication, *Molecular Ecology*, **24**, 5412–5427.
35. Liu, J., Martin-Yken, H., Bigey, F., Dequin, S., François, J.M., Capp, J.P. (2015) Natural yeast promoter variants reveal epistasis in the generation of transcriptional-mediated noise and its potential benefit in stressful conditions, *Genome Biology and Evolution*, **7**, 969–984.
36. Carreto, L., Eiriz, M. F., Gomes, A. C., Pereira, P. M., Schuller, D., Santos, M. A S. (2008) Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity, *BMC Genomics*, **9**, 524.
37. Tanghe, A., Van Dijck, P., Dumortier, F., Teunissen, A., Hohmann, S., Thevelein, J.M. (2002) Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5981–5989.
38. Bonhivers, M., Carbrey, J.M., Gould, S.J., Agre, P. (1998) Aquaporins in *Saccharomyces*: Genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains, *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 27565–27572.
39. Laizé, V., Tacnet, F., Ripoche, P., Hohmann, S. (2000) Polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* aquaporins, *Yeast*, **16**, 897–903.
40. Will, J.L., Kim, H.S., Clarke, J., Painter, J.C., Fay, J.C., & Gasch, A.P. (2010) Incipient balancing selection through adaptive loss of aquaporins in natural *Saccharomyces cerevisiae* populations, *PLoS Genetics*, **6**, e1000893.
41. Galeote, V., Bigey, F., Beyne, E., Novo, M., Legras, J.L., Casaregola, S., Dequin, S. (2011) Amplification of a *Zygosaccharomyces bailii* DNA segment in wine yeast genomes by extrachromosomal circular DNA formation, *PLoS One*, **6**, e17872.
42. Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F. X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.L., Barrio, E., Dequin, S., Galeote, V. (2015) Evolutionary advantage conferred by an eukaryote-to-eukaryote gene transfer event in wine yeasts, *Molecular Biology and Evolution*, **32**, 1695–1707.
43. Galeote, V., Novo, M., Salema-Oom, M., Brion, C., Valério, C., Gonçalves, P., Dequin, S. (2010) FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H⁺ symporter, *Microbiology*, **156**, 3754–3761.
44. Wenger, J.W., Schwartz, K., Sherlock, G. (2010) Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Genetics*, **6**, e1000942.
45. Damon, C., Vallon, L., Zimmermann, S., Haider, M.Z., Galeote, V., Dequin, S., Luis, P., Fraissinet-Tachet, L., Marmeisse, R. (2011). A novel fungal family of oligopeptide transporters identified by functional metatranscriptomics of soil eukaryotes, *The ISME Journal*, **5**, 1871–1880.
46. Ibstedt, S., Stenberg, S., Bagés, S., Gjuvslund, A.B., Salinas, F., Kourt-

- chenko, O., Samy, J.K.A., Blomberg, A., Omholt, S.W., Liti, G., Beltran, G., and Warringer, J. (2015). Concerted evolution of life stage performances signals recent selection on yeast nitrogen use, *Molecular Biology and Evolution*, **32**, 153–161.
47. Brown, S.L., Stockdale, V.J., Pettolino, F., Pocock, K.F., De Barros Lopes, M., Williams, P.J., Bacic, A., Fincher, G.B., Høj, P.B., Waters, E.J. (2007) Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**, 1363–1376.
48. Dunn, B., T. Paulish, T., Stanbery, A., Piotrowski, J., Koniges, G., Kroll, E., Louis, E.-J., Liti, G., Sherlock, G., Rosenzweig, F. (2013) Recurrent Rearrangement during Adaptive Evolution in an Interspecific Yeast Hybrid Suggests a Model for Rapid Introgression, *PLoS Genetics*, **9**, e1003366.
49. Dunn, B., Sherlock, G. (2008). Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*, *Genome Research*, **18**, 1610–1623.
50. Libkind, D., Hittinger, C.T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., Sampaio, J.P. (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 14539–14544.
51. Bradbury, J.E., Richards, K.D., Niederer, H.A., Lee, S.A., Rod Dunbar, P., Gardner, R.C. (2006). A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **89**, 27–38.
52. Borneman, A.R., Desany, B.A., Riches, D., Affourtit, J.P., Forgan, A.H., Pretorius, I.S., Egholm, M., Chambers, P.J. (2012) The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins, *FEMS yeast research*, **12**, 88–96.
53. Naumova, E.S., Naumov, G.I., Masneuf-Pomarède, I., Aigle, M., Dubourdieu, D. (2005) Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*, *Yeast (Chichester, England)*, **22**, 1099–1115.
54. Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., Durrens, P., Sherman, D.J., Marullo, P., Hittinger, C.T., Gonçalves, P., Sampaio, J.P. (2014) A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*, *Nature communications*, **5**, 4044.
55. Dunn, B., Richter, C., Kvitek, D. J., Pugh, T., Sherlock, G. (2012) Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments, *Genome Research*, **22**, 908–924.
56. Morales, L., Dujon, B. (2012) Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts, *Microbiology and molecular biology reviews*, **76**, 721–39.
57. Belloch, C., Pérez-Torrado, R., González, S.S., Pérez-Ortín, J.E., García-Martínez, J., Querol, A., Barrio, E. (2009). Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*, *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 2534–2544.
58. González, S.S., Gallo, L., Climent, M.D., Barrio, E., & Querol, A. (2007) Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*, *Inter-*

- national Journal of Food Microbiology*, **116**, 11–18.
59. Gangl, H., Batusic, M., Tschek, G., Tiefenbrunner, W., Hack, C., Lopandic, K. (2009) Exceptional fermentation characteristics of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*, *New Biotechnology*, **25**, 244–251.
60. Swiegers, J.H., Kievit, R.L., Siebert, T., Lattey, K.A., Bramley, B.R., Francis, I.L., King, E.S., Pretorius, I.S. (2009) The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine, *Food Microbiology*, **26**, 204–211.
61. Replansky, T., Koufopanou, V., Greig, D., & Bell, G. (2008) *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology, *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 494–501.
62. Querol, A., Bond, U. (2009) The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS microbiology letters*, **293**, 1–10.
63. Erny, C., Raoult, P., Alais, A., Butterlin, G., Delobel, P., Matei-Radoi, F., Casaregola, S., Legras, J.L. (2012). Ecological Success of a Group of *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces kudriavzevii* Hybrids in the Northern European Wine-Making Environment, *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 3256–3265.
64. Bellon, J.R., Eglinton, J.M., Siebert, T.E., Pollnitz, A.P., Rose, L., De Barros Lopes, M., & Chambers, P.J. (2011) Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**, 603–612.
65. Bellon, J.R., Yang, F., Day, M.P., Inglis, D.L., Chambers, P.J. (2015) Designing and creating *Saccharomyces* interspecific hybrids for improved, industry relevant, phenotypes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 8597–8609.
66. König, H., Uden, G., Fröhlich, J. (2009) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer Science & Business Media.
67. Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *International journal of food microbiology*, **153**, 243–259.
68. Fleet, G.H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, **86**, 11–22.
69. Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012) Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation, *International journal of food microbiology*, **154**, 152–161.
70. Steel, C.C., Blackman, J.W., Schmidtke, L.M. (2013) Grapevine bunch rots: impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults, *Journal of agricultural and food chemistry*, **61**, 5189–5206.
71. Fleet, G.H. (2007) Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety, *Current opinion in biotechnology*, **18**, 170–175.
72. Hagman, A., Säll, T., Compagno, C., Piškur, J. (2013) Yeast «Make-Accumulate-Consume» Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication, *PLoS One*, **8**, e68734.
73. Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piškur, J. (2014) Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, **14**, 826–832.
74. Hagman, A., Piškur, J. (2015) A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast, *PLoS One*, **10**, e0116942.
75. Thomson, J.M., Gaucher, E.A., Burgan, M.F., De Kee, D.W., Li, T., Aris, J.P., Benner, S.A. (2005) Resurrec-

- ting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast, *Nature genetics*, **37**, 630–635.
76. Schmitt, M.J., & Breinig, F. (2006) Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection, *Nature Reviews Microbiology*, **4**, 212–221.
 77. Schmitt, M.J., São-José, C., & Santos, M.A. (2009). Phages of Yeast and Bacteria. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 89–109). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
 78. Liu, G.-L., Chi, Z., Wang, G.-Y., Wang, Z.-P., Li, Y., & Chi, Z.-M. (2015) Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications, *Critical reviews in biotechnology*, **35**, 222–234.
 79. Hyma, K.E., Saerens, S.M., Verstrepen, K.J., Fay, J.C. (2011) Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research*, **11**, 540–551.
 80. Mackay, T.F.C., Stone, E.A., Ayroles, J.F. (2009) The genetics of quantitative traits: challenges and prospects, *Nature reviews. Genetics*, **10**, 565–577.
 81. Steinmetz, L.M., Sinha, H., Richards, D.R., Spiegelman, J.I., Oefner, P.J., McCusker, J.H., & Davis, R.W. (2002) Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast, *Nature*, **416**, 326–330.
 82. Cubillos, F.A., Billi, E., Zörgö, E., Parts, L., Fargier, P., Omholt, S., Blomberg, A., Warringer, J., Louis, E.J., Liti, G. (2011) Assessing the complex architecture of polygenic traits in diverged yeast populations. *Molecular Ecology*, **20**, 1401–1413.
 83. Salinas, F., Cubillos, F.A., Soto, D., Garcia, V., Bergström, A., Warringer, J., Ganga, M.A., Louis, E.J., Liti, G., Martinez, C. (2012) The Genetic Basis of Natural Variation in Oenological Traits in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One*, **7**, e49640.
 84. Walker, M.E., Nguyen, T.D., Liccioli, T., Schmid, F., Kalatzis, N., Sundstrom, J.F., Gardner J.M., Jiranek, V. (2014) Genome-wide identification of the Fermentome; genes required for successful and timely completion of wine-like fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, *BMC Genomics*, **15**, 552.
 85. Alexandre, H., Charpentier, C. (1998) Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **20**, 20–27.
 86. Brown, J.C.S., Lindquist, S. (2009) A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion, *Genes and Development*, **23**, 2320–2332.
 87. Jarosz, D.F., Brown, J.C.S., Walker, G.A., Datta, M.S., Ung, W.L., Lancaster, A.K., Rotem, A., Chang, A., Newby, G.A., Weitz, D.A., Bisson, L.F., Lindquist, S. (2014) Cross-kingdom chemical communication drives a heritable, mutually beneficial prion-based transformation of metabolism, *Cell*, **158**, 1083–1093.
 88. Jarosz, D.F., Lancaster, A.K., Brown, J.C.S., Lindquist, S. (2014) An evolutionarily conserved prion-like element converts wild fungi from metabolic specialists to generalists, *Cell*, **158**, 1072–1082.
 89. Walker, G.A., Hjelmeland, A., Bokulich, N.A., Mills, D.A., Ebeler, S.E., Bisson, L.F. (2016) Impact of the [GAR+] Prion on Fermentation and Bacterial Community Composition with *Saccharomyces cerevisiae* UCD932, *American Journal of Enology and Viticulture*, **67**, 296–307.
 90. Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation, *Yeast (Chichester, England)*, **20**, 1369–1385.

91. Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Molecular biology of the cell*, **11**, 4241–4257.
92. Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillaumon, J.-M., Mas, A., François, J., Rozes, N. (2006) Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature wine-making fermentations, *FEMS yeast research*, **6**, 1167–1183.
93. Gamero, A., Belloch, C., Ibáñez, C., & Querol, A. (2014) Molecular analysis of the genes involved in aroma synthesis in the species *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and *S. bayanus var. uvarum* in winemaking conditions, *PloS One*, **9**, e97626.
94. Backhus, L.E., DeRisi, J., Bisson, L.F. (2001) Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions, *FEMS yeast research*, **1**, 111–25.
95. Barbosa, C., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J.E., Mendes-Ferreira, A. (2015) Comparative transcriptomic analysis reveals similarities and dissimilarities in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains response to nitrogen availability, *PloS One*, **10**, e0122709.
96. Marks, V.D., Ho Sui, S.J., Erasmus, D., Van Der Merwe, G.K., Brumm, J., Wasserman, W.W., Bryan, J., Van Vuuren, H.J.J. (2008) Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response, *FEMS Yeast Research*, **8**, 35–52.
97. Kutyna, D.R., Varela, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Stanley, G.A. (2010) Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine, *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 293–302.
98. Remize, F., Cambon, B., Barnavon, L., Dequin, S. (2003) Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd1p and is only partially controlled by the HOG pathway, *Yeast (Chichester, England)*, **20**, 1243–1253.
99. Rodrigues de Sousa, H., Spencer-Martins, I., Gonçalves, P. (2004). Differential regulation by glucose and fructose of a gene encoding a specific fructose/H⁺ symporter in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts, *Yeast (Chichester, England)*, **21**, 519–530.
100. Swiegers, J.H., Capone, D.L., Pardon, K.H., Elsey, G. M., Sefton, M.A., Francis, I.L., Pretorius, I.S. (2007) Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma, *Yeast (Chichester, England)*, **24**, 561–574.
101. Husnik, J.I., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z., van Vuuren, H.J.J. (2006) Metabolic engineering of malolactic wine yeast, *Metabolic engineering*, **8**, 315–323.
102. Coulon, J., Husnik, J. I., Inglis, D. L., van der Merwe, G. K., Lonvaud, A., Erasmus, D. J., & van Vuuren, H. J. J. (2006) Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to Minimize the Production of Ethyl Carbamate in Wine, *American Journal Enology Viticulture*, **57**, 113–124.
103. Borneman, A.R., Schmidt, S.A., Pretorius, I.S. (2013) At the cutting-edge of grape and wine Biotechnology, *Trends Genetics*, **29(4)**, 263–271.
104. Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., & Gonzalez, R. (2007) Transgenic wine yeast technology comes of age: Is it time for transgenic wine? *Biotechnology Letters*, **29(2)**, 191–200.
105. Г.Г.Валуйко, Косюра В.Т. (Ред). (2000) Справочник по виноде-

- лию (2-ое издание). Симферополь: Таврида, 624 с.
106. Stevenson, T. (2011) The Sotheby's wine encyclopedia. 5th edition, Dorling Kindersley, London, New York.
 107. Zara, S., Gross, M.K., Zara, G., Budroni, M., & Bakalinsky, A.T. (2010) Ethanol-independent biofilm formation by a flor wine yeast strain of *saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 4089–4091.
 108. Mauricio, J.C., Ortega, J.M., Salmon, J.M. (1995) Sugar uptake by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation at different initial ammoniacal nitrogen concentrations, *Acta Horticulturae*, **388**, 197–202.
 109. Botella, M.A., Perez-Rodriguez, L., Domecq, B., & Valpuesta, V. (1990) Amino Acid Content of Fino and Oloroso Sherry Wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, **41**, 12–15.
 110. Mauricio, J.C., Ortega, J.M. (1997) Nitrogen compounds in wine during its biological aging by two flor film yeasts: An approach to accelerated biological aging of dry sherry-type wines, *Biotechnology and Bioengineering*, **53**, 159–167.
 111. Bakker, J., Clarke, R.J. (2011). Wine Flavour Chemistry, Second Edition. Wiley-Blackwell.
 112. Thuy, P.T., Elisabeth, G., Pascal, S., Claudine, C. (1995) Optimal Conditions for the Formation of Sotolon from .alpha.-Ketobutyric Acid in the French «Vin Jaune», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2616–2619.
 113. Martínez, P., Pérez Rodríguez, L., Benítez, T. (1997) Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino sherry wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, **48**, 160–168.
 114. Charpentier, C., Colin, A., Alais, A., & Legras, J.L. (2009) French Jura flor yeasts: Genotype and technological diversity, *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, **95**, 263–273.
 115. Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M.J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., & Querol, A. (2001) Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines, *Applied and environmental microbiology*, **67**, 2056–61.
 116. Castrejón, F., Codón, A.C., Cubero, B., Benítez, T., Castrejón, F., Codon, A.C., & Benitez, T. (2002) Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor Yeasts, *Systematic and Applied Microbiology*, **25**, 462–467.
 117. Infante, J.J., Dombek, K.M., Reborinos, L., Cantoral, J.M., Young, E.T. (2003) Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast, *Genetics*, **165**, 1745–1759.
 118. Legras, J.-L., Erny, C., & Charpentier, C. (2014) Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome, *PLoS one*, **9**, e108089.
 119. Martínez, P., Pérez Rodríguez, L., & Benítez, T. (1997) Velum formation by flor yeasts isolated from sherry wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, **48**, 55–62.
 120. Alexandre, H., Blanchet, S., Charpentier, C. (2000) Identification of a 49-kDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in velum yeast which may be implicated in velum formation, *FEMS Microbiology Letters*, **185**, 147–150.
 121. Reynolds, T. B., Fink, G. R. (2001) Bakers' yeast, a model for fungal

- biofilm formation, *Science (New York, N.Y.)*, **291**, 878–881.
122. Zara, S., Bakalinsky, A.T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M.A., Budroni, M. (2005) *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 2934–2939.
 123. Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Iimura, Y. (2006) *FLO11* Is the Primary Factor in Flor Formation Caused by Cell Surface Hydrophobicity in Wild-Type Flor Yeast, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **70**, 660–666.
 124. Fidalgo, M., Barrales, R.R., Ibeas, J.I., & Jimenez, J. (2006) Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11228–11233.
 125. Fidalgo, M., Barrales, R.R., & Jimenez, J. (2008) Coding repeat instability in the *FLO11* gene of *Saccharomyces* yeasts, *Yeast*, **25**, 879–889.
 126. Bumgarner, S.L., Dowell, R.D., Grisafi, P., Gifford, D.K., Fink, G.R. (2009) Toggle involving cis-interfering noncoding RNAs controls variegated gene expression in yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 18321–18326.
 127. Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Maccaddu, S., Budroni, M. (2009) *FLO11* gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology*, **155**, 3838–3846.
 128. Brückner, S., Mösch, H.-U. (2012) Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS microbiology reviews*, **36**, 25–58.
 129. Barrales, R.R., Jimenez, J., Ibeas, J.I. (2008) Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **178**, 145–156.
 130. Barrales, R.R., Korber, P., Jimenez, J., Ibeas, J.I. (2012) Chromatin modulation at the *FLO11* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* by HDAC and Swi/Snf complexes, *Genetics*, **191**, 791–803.
 131. Meem, M.H., Cullen, P.J. (2012) The impact of protein glycosylation on Flo11-dependent adherence in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research*, **12**, 809–818.
 132. Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., & Iimura, Y. (2004) *FLO11* is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of Nrg1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, **237**, 425–430.
 133. Zara, S., Antonio Farris, G., Budroni, M., Bakalinsky, A.T. (2002) HSP12 is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*, *Yeast*, **19**, 269–276.
 134. Espinazo-Romeu, M., Cantoral, J.M., Matallana, E., Aranda, A. (2008) Btn2p is involved in ethanol tolerance and biofilm formation in flor yeast. In *FEMS Yeast Research*, **8**, 1127–1136.
 135. Kovács, M., Stuparevic, I., Mrsa, V., & Maráz, A. (2008) Characterization of Ccw7p cell wall proteins and the encoding genes of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains: relevance for flor formation, *FEMS yeast research*, **8**, 1115–2116.
 136. Aranda, A., Querol, A., del Olmo, M.I. (2002) Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines, *Archives of Microbiology*, **177**, 304–312.

137. Aranda, A., del Olmo M.L., (2003) Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway, *Yeast (Chichester, England)*, **20**(8), 747–759.
138. Alexandre, H. (2013) Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*--their ecology, genetics and metabolism, *International journal of food microbiology*, **167**, 269–275.
139. Fierro-Risco, J., Rincón, A.M., Benítez, T., Codón, A.C. (2013) Overexpression of stress-related genes enhances cell viability and velum formation in Sherry wine yeasts, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 6867–6881.
140. Dunn, B., Levine, R.P., Sherlock, G. (2005) Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC genomics*, **6**, 53.
141. Novo, M.,A. Mangado, M. Quirós, P. Morales, Z. Salvadó, R. Gonzalez, R. (2013) Genome-Wide Study of the Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to the Early Stages of Wine Fermentation, *PLoS One*, **8**, e74086.
142. Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J., Millán, M.C., Mauricio, J.C. (2014) A proteomic and metabolomic approach for understanding the role of the flor yeast mitochondria in the velum formation, *International Journal of Food Microbiology*, **172**, 21–29.
143. Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J.C. (2015) Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions, *Food Microbiology*, **46**, 25–33.
144. Moreno-García, J., García-Martínez, T., Millán, M.C., Mauricio, J.C., Moreno, J. (2015) Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a *Saccharomyces cerevisiae* flor-velum yeast strain grown in two conditions, *Food Microbiology*, **51**, 1–9.
145. Mauricio, J. C., Valero, E., Millán, C., Ortega, J. M. (2001) Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by flor yeasts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3310–3315.
146. Begoña Cortes, M., Moreno, J.J., Zea, L., Moyano, L., & Medina, M. (1999) Response of the aroma fraction in Sherry wines subjected to accelerated biological aging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3297–3302.
147. Muñoz, D., Peinado, R.A., Medina, M., Moreno, J. (2007) Biological aging of sherry wines under periodic and controlled microaerations with *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis*: Effect on odorant series, *Food Chemistry*, **100**, 1188–1195.
148. Moreno-García, J., Raposo, R.M., Moreno, J. (2013) Biological aging status characterization of Sherry type wines using statistical and oenological criteria, *Food Research International*, **54**, 285–292.
149. Zea, L., Moyano, L., Moreno, J., Cortes, B., Medina, M. (2001) Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing, *Food Chemistry*, **75**, 79–84.