ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2415
https://elibrary.ru/ERPFNJ

Оригинальная статья
https://fptt.ru

SO_2-резистентность как критерий отбора штаммов *Saccharomyces cerevisiae* для органического виноделия

И. В. Пескова*, Т. Н. Танащук, Е. В. Остроухова, Н. Ю. Луткова, М. А. Вьюгина

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Ялта, Россия

Поступила в редакцию: 05.07.2022
Принята после рецензирования: 09.08.2022
Принята к публикации: 06.09.2022

**И. В. Пескова: bioxim2012@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-5107-518X*
Т. Н. Танащук: https://orcid.org/0000-0002-7847-1246
Е. В. Остроухова: https://orcid.org/0000-0003-0638-9187
Н. Ю. Луткова: https://orcid.org/0000-0002-8126-7596
М. А. Вьюгина: https://orcid.org/0000-0001-6146-2151

© И. В. Пескова, Т. Н. Танащук, Е. В. Остроухова, Н. Ю. Луткова, М. А. Вьюгина, 2023

Аннотация.
Диоксид серы, используемый в виноделии как консервант и антиоксидант, негативно влияет на здоровье человека. Снижение доз диоксида серы возможно путем применения дрожжей с хорошей бродильной активностью, доминирующих при инокуляции в сусло, и низкой способностью синтезировать SO_2 и SO_2-связывающие вещества. Последнее связано с механизмами детоксикации SO_2 дрожжами. Цель работы – изучение взаимосвязи устойчивости дрожжей к диоксиду серы и их способности синтезировать SO_2 и ацетальдегид в процессе роста.
Исследовали 17 штаммов дрожжей рода *Saccharomyces*. Культивирование дрожжей осуществляли на установке CGQ на виноградном сусле до достижения стационарной фазы роста. Концентрацию диоксида серы определяли титриметрическим методом, альдегидов – бисульфитным, сульфитоустойчивость дрожжей – по ростовой реакции на SO_2 по технологии CGQ.
Установлено, что штаммы различались по степени SO_2-резистентности, оцениваемой по увеличению продолжительности лаг-фазы в присутствии (100 мг/дм^3) диоксида серы: первая группа (чувствительные) – 8 ч и более, вторая – 2–6 ч, третья (устойчивые) – без изменения. Выявлено (Wilks L = 0,228, α = 0,05), что в среде без SO_2 чувствительные культуры отличались наибольшим значением минимального времени генерации в экспоненциальной фазе роста (5,3 ± 2,1 ч), устойчивые – наибольшим синтезом ацетальдегида (54,7 ± 11,1 мг/дм^3) и диоксида серы (21,0 ± 10,3 мг/дм^3), культуры второй группы – наименьшим содержанием в среде связанных форм SO_2 (10,9 ± 4,2 мг/дм^3), занимая по остальным показателям промежуточное положение.
В работе была показана возможность использования длительности адаптации дрожжей к SO_2 для первичного отбора культур в эковиноделии. По совокупности физиологических и биохимических особенностей выделили перспективные культуры: из третьей группы – для производства вин с пониженным содержанием SO_2, из второй – органических вин. Продолжение исследования направлено на расширение спектра штаммов дрожжей и уточнение диапазонов показателей для эффективного включения культур в виноделие.

Ключевые слова. Дрожжи, CGQ технология, лаг-фаза, генерация, синтез, ацетальдегид, диоксид серы, эковиноделие

Финансирование. Работа выполнена на базе Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия «Магарач» РАН (ВННИИВиВ «Магарач» РАН) в рамках Государственного задания № 0833-2019-0022.

Для цитирования: SO_2-резистентность как критерий отбора штаммов *Saccharomyces cerevisiae* для органического виноделия / И. В. Пескова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 1. С. 60–68. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2415

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2415
https://elibrary.ru/ERPFNJ

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Resistance to Sulfur Dioxide as a Criterion for Selecting *Saccharomyces cerevisiae* for Organic Winemaking

Irina V. Peskova*, Tatiana N. Tanashchuk, Elena V. Ostroukhova, Nataliya Yu. Lutkova, Mariya A. Vyugina

All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" of the RAS, Yalta, Russia

Received: 05.07.2022
Revised: 09.08.2022
Accepted: 06.09.2022

**Irina V. Peskova: bioxim2012@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-5107-518X*
Tatiana N. Tanashchuk: https://orcid.org/0000-0002-7847-1246
Elena V. Ostroukhova: https://orcid.org/0000-0003-0638-9187
Nataliya Yu. Lutkova: https://orcid.org/0000-0002-8126-7596
Mariya A. Vyugina: https://orcid.org/0000-0001-6146-2151

© I.V. Peskova, T.N. Tanashchuk, E.V. Ostroukhova, N.Yu. Lutkova, M.A. Vyugina, 2023

Abstract.
Sulfur dioxide is a popular conserving agent and antioxidant in winemaking. Unfortunately, it is bad for human health. Some yeast strains can reduce the dose of sulfur dioxide. Such yeasts should have good fermentation activity and dominate when inoculated into grape must. In addition, it should not synthesize sulfur dioxide and SO_2-binding substances. The synthesis of sulfur dioxide and carbonyl compounds by yeast is related to the mechanisms of sulfur dioxide detoxification. The research objective was to study the relationship between the resistance of yeast to sulfur dioxide and its ability to synthesize sulfur dioxide and acetaldehyde during growth.
The study featured 17 yeast strains of the genus *Saccharomyces*. The yeasts were cultivated on grape must in a CGQ device until the stationary growth phase. The concentration of free and bound forms of sulfur dioxide was determined by titration, while that of aldehydes was determined by bisulfite method. The sulfite resistance of strains was measured by the growth response of yeast cells to sulfur dioxide using CGQ technology.
Yeast strains differed in the degree of sulfur dioxide resistance. The samples were divided according to the increase in the lag phase time: by ≥ 8 h (sensitive), by 2–6 h, without changes (resistant). At Wilks L = 0.228 and α = 0.05, the sensitive cultures in a SO_2-free medium had the highest value of minimal generation time in the exponential growth phase (5.3 ± 2.1 h). The resistant samples demonstrated the highest synthesis of acetaldehyde (54.7 ± 11.1 mg/L) and sulfur dioxide (21.0 ± 10.3 mg/L). The second group cultures had the lowest content of SO_2-bound forms in the medium (10.9 ± 4.2 mg/L) and were in an interposition in terms of other indicators.
The time it takes a yeast strain to adapt to sulfur dioxide can be used as a parameter for the primary culture selection in eco-winemaking. According to the physiological and biochemical profile, the resistant strains can be recommended for the production of SO_2-low wines, while the samples from the second test group proved optimal for organic wines. Further research will expand the range of yeast strains and their indicators.

Keywords. Yeasts, CGQ technology, lag phase, generation, synthesis, acetaldehyde, sulfur dioxide, eco-winemaking

Funding. The research was performed on the premises of the All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" of the RAS ("Magarach"), public assignment No. 0833-2019-022.

For citation: Peskova IV, Tanashchuk TN, Ostroukhova EV, Lutkova NYu, Vyugina MA. Resistance to Sulfur Dioxide as a Criterion for Selecting *Saccharomyces cerevisiae* for Organic Winemaking. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(1):60–68. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2415

Введение

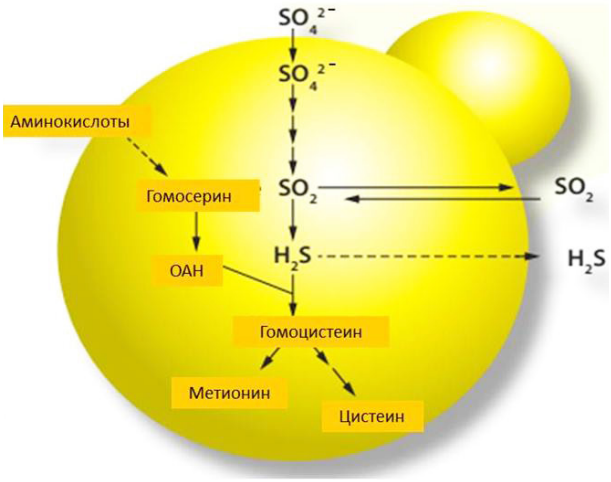
Диоксид серы (SO_2) – одна из самых распространенных, недорогих и эффективных химических добавок, используемых в виноделии. Добавление SO_2 подавляет рост многих микроорганизмов и защищает виноматериалы и вина от ферментативного и химического окисления, тем самым стабилизируя их органолептические свойства при хранении и выдержке. Высокие остаточные количества диоксида серы в вине могут привести к появлению

неприятных привкусов, а также могут быть причиной побочных реакций у человека – бронхоспазма, брадикардии, желудочно-кишечных симптомов, головных болей, кожной сыпи, артериальной гипотензии и анафилактических реакций [1–3]. В связи с этим многие производители вина ориентируются на выпуск своей продукции с пониженным содержанием диоксида серы или же совсем без него (органическое виноделие). Учеными предложен ряд альтернатив диоксиду серы физико-химического характера – температурное воздействие, микрофильтрация, высокое гидростатическое давление, ультразвук, ультрафиолет, импульсные электрические поля, лизоцим, сорбиновая кислота и др. Однако многие из них оказывают негативное влияние на органолептические характеристики вин и не разрешены в органическом виноделии [4].

Резолюцией OIV-OENO 631-2020 (RESOLUTION OIV-OENO 631-2020 Review of practices for the reduction of SO_2 doses used in winemaking) предложен ряд рекомендаций, позволяющих снизить дозу используемого при производстве вина диоксида серы: выбор сорта винограда и места его произрастания, оптимизация времени сбора и определенные технологические приемы на разных этапах производства вина. Согласно данной резолюции одним из способов снижения доз вносимого диоксида серы является использование дрожжей, характеризующихся хорошей бродильной активностью и низкой способностью синтезировать диоксид серы, сероводород и SO_2-связывающие вещества и способных доминировать при инокуляции в виноградное сусло.

Синтез сероводорода, диоксида серы и карбонильных соединений дрожжами в процессе жизнедеятельности прямым или косвенным образом связан с механизмами детоксикации SO_2 [5]. Согласно существующим теориям у винных дрожжей есть четыре основных способа выживания в присутствии диоксида серы: переход в жизнеспособное, но некультивируемое состояние, выведение SO_2 из клетки с помощью специализированных насосов для оттока сульфита, восстановление диоксида серы за счет включения в биосинтез серосодержащих аминокислот и синтез ацетальдегида [6–10].

Приоритетным для дрожжевой клетки путем инактивации диоксида серы является его выделение в среду через специализированные насосы. Независимо от способа проникновения диоксида серы в дрожжевую клетку, доминирующей формой сернистой кислоты внутри нее является бисульфит (HSO_3^-), в ходе ассимиляции которого происходит образование SO_2, выступающего в качестве промежуточного метаболита на пути синтеза серосодержащих аминокислот (рис. 1). При определенных условиях диоксид серы может синтезироваться в избытке, а затем выделяться в среду [5].



ОАН – О-ацетил-L-гомосерин сульфгидролаза

Рисунок 1. Путь усвоения сульфатов *Saccharomyces* [5]

Figure 1. *Saccharomyces* sulfate adsorption [5]

Эти механизмы генетически закреплены. Степень их участия в детоксикации диоксида серы варьируется в широком диапазоне в зависимости от штамма дрожжей. Исследования взаимосвязи синтеза ацетальдегида и устойчивости штаммов сахаромицетов к диоксиду серы, проводимые E. Casalone и др., показали, что дрожжи, устойчивые к действию диоксида серы, синтезируют большие количества ацетальдегида как в присутствии SO_2, так и в его отсутствии [10]. Это утверждение послужило основанием для проведения настоящего исследования по установлению связи между степенью устойчивости дрожжей к диоксиду серы и их способностью синтезировать диоксид серы и ацетальдегид в процессе роста. Так как сульфитоустойчивость дрожжей обусловлена генетически, то выявление такой зависимости дало бы возможность нивелировать влияние состава среды на синтез диоксида серы и ацетальдегида микроорганизмами.

Целью настоящей работы являлось изучение взаимосвязи степени устойчивости дрожжей из Центра коллективного пользования (ЦКП) Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач» к диоксиду серы и способности штаммов синтезировать диоксид серы и ацетальдегид в процессе роста.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований являлись 17 штаммов дрожжей рода *Saccharomyces* из ЦКП Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач», рекомендуемых для производства белых вин: штаммы I-527 (47 К), I-525 (Севастопольская 23), I-271 (Феодосия 1-19), I-307 (Ленинградская), I-491 (Мускат белый), I-492 (Мускат розовый), I-279 (Кокур 3), I-144 (Мускат венгерский), I-637 (Мускат-Р (4)), I-187

(Алиготе-14) и I-106 (Токай 22), красных вин: штаммы, I-652 (Одесский черный-СД-13), I-25 (Каберне 5), I-250 (Бордо-60), I-24 (Бордо 20), I-640 (Меганом красный 3) и I-440 (Магарач 17-35) [11–13].

В качестве среды культивирования использовали сусло из винограда сорта Алиготе одной партии следующего состава: массовая концентрация сахаров – 228 г/дм^3, титруемых кислот – 6,7 г/дм^3, pH 3,4. Культивирование осуществляли при температуре 25 °C и перемешивании среды со скоростью 150 об/мин на установке CGQ фирмы Aquilabiolabs. В две колбы емкостью 250 см^3 наливали по 100 см^3 пастеризованного виноградного сусла и вносили дрожжевую разводку до начальной концентрации клеток в среде 0,5×10^6 клеток/см^3. Для оценки влияния диоксида серы на рост культур, а также отбора штаммов, продуцирующих большое количество SO_2 и ацетальдегида, в одну из колб добавляли диоксид серы из расчета 100 мг/дм^3 (опыт) [14]. Измерения останавливали при достижении культурой стационарной фазы роста. На этом этапе осуществляли отбор среды культивирования для проведения исследований химического состава.

Массовую концентрацию диоксида серы, его свободной и связанной форм определяли титриметрическим методом, основанным на окислении свободной сернистой кислоты в кислой среде до серной при помощи йода; альдегидов (ацетальдегида) – методом, основанным на их способности связываться с гидросульфитом натрия в комплексное нелетучее соединение, которое разрушают щелочью с последующим титрованием освободившегося сернистого ангидрида йодом.

Сульфитоустойчивость штаммов оценивали по ростовой реакции клеток дрожжей на диоксид серы в реальном времени при помощи технологии CGQ [15].

Культивирование микроорганизмов по каждому варианту проводили в 2-х повторностях, анализ химического состава – в 23-х. Данные обрабатывали методами дисперсионного (ANOVA) и дискриминантного анализа (с использованием программы Statistica 10). Сравнение значений количественных признаков в независимых подгруппах проводили с помощью U-критерия Mann-Whitney. Информативность дискриминантных переменных оценивали по Wilks L. Верификацию статистических коэффициентов проводили для точки значимости $\alpha < 0{,}05$. В таблицах и рисунках приведены среднеарифметические значения показателей, в тексте статьи – среднеарифметические значения и стандартное отклонение единичного результата.

Результаты и их обсуждение

Дрожжи, как и все живые организмы, естественным образом реагируют на изменение условий окружающей среды путем активизации механизмов, позволяющих им адаптировать свой рост и метаболизм к неблагоприятным условиям – стрессам [16, 17]. Эти механизмы активируются сразу после получения клеткой информации об изменении условий существования. Диоксид серы является стрессовым фактором для сахаромицетов, влияющим на их рост, спорообразование и скорость восстановление клеток после стресса.

Длительность лаг-фазы исследуемых штаммов дрожжей в контрольных колбах (0 мг/дм^3 SO_2) варьировалась от 6 до 15 ч. Внесение в среду культивирования 100 мг/дм^3 диоксида серы показало, что исследуемые штаммы дрожжей различались по продолжительности адаптации к SO_2 (рис. 2). Внесение в среду культивирования диоксида серы в случае штаммов I-25, I-106, I-271, I-525, I-527 и I-637 приводило к увеличению длительности лаг-фазы более чем на 8 ч, штаммов I-24, I-250, I-279, I-440, I-652 и I-491 – на 2–6 ч. Это свидетельствует о высокой чувствительности этих культур дрожжей к SO_2. Наиболее устойчивыми к действию диоксида

Рисунок 2. Изменение длительности лаг-фазы и времени генерации в присутствии SO_2 относительно контрольных вариантов

Figure 2. Effect of sulfur dioxide on lag phase time and generation time

серы оказались штаммы I-144, I-307, I-492, I-640 и I-187 – присутствие SO_2 в среде культивирования не повлияло на длительность их лаг-фазы.

Установлено, что задержка роста при культивировании в среде с SO_2 не влияла на ростовую активность штаммов. Значимой разницы между контролем (без SO_2) и опытом (100 мг/дм^3 SO_2) по продолжительности экспоненциальной фазы роста, временем достижения максимальной удельной скорости роста и накоплению клеточной биомассы штаммом выявлено не было. Наличие SO_2 в среде культивирования приводило к снижению скорости роста клеток для штаммов I-144, I-307, I-640, I-187, I-24, I-250, I-279, I-440, I-652, I-25, I-106, I-271, I-525 и I-637. Время удвоения числа клеток (время генерации) увеличилось на 0,6–2,8 ч в зависимости от штамма. Для культур I-527, I-491 и I-492 отмечено повышение скорости роста при наличии в среде SO_2. Аналогичные результаты были получены S. C. Morgan и др. для коммерческого штамма *BRL97*, который демонстрировал повышение скорости роста в присутствии диоксида серы, достигая гораздо более высокой общей численности дрожжей [14]. Это связано с тем, что каждый штамм может использовать различные механизмы устойчивости к сульфиту, что позволяет дрожжам быстрее инактивировать стрессовый фактор. Некоторые авторы предполагают возможность индукции устойчивости дрожжей к диоксиду серы [6, 18].

Одним из требований, предъявляемых к органическому вину, является отсутствие диоксида серы. Согласно литературным данным некоторые штаммы дрожжей способны синтезировать до 100 и более мг/дм^3 SO_2 [19]. Несмотря на то что синтез диоксида серы дрожжами зависит от ряда факторов, а именно от содержания в среде культивирования азотсодержащих соединений (аммония, аминокислот и особенно серосодержащих аминокислот), главным фактором остается штамм дрожжей [19].

Концентрация диоксида серы в контрольных вариантах по окончании экспоненциальной фазы роста варьировалась от 4,7 до 32,9 мг/дм^3. Наибольшие значения показателя были отмечены для штамма I-187, наименьшие – для штаммов I-271 и I-307 (рис. 3). Не менее 20 мг/дм^3 общего диоксида серы синтезировали в процессе роста штаммы I-640, I-492, I-144, I-440 и I-279. В случае остальных культур дрожжей содержание образующегося диоксида серы составило 10–20 мг/дм^3. Преобладающей формой диоксида серы (независимо от штамма дрожжей) являлась связанная, доля которой составляла от 61 до 94 %.

Согласно литературным данным присутствие свободной формы диоксида серы в среде культивирования может свидетельствовать о более высокой конститутивной экспрессии генов *FZF1* или *SSU1/SSU1-R*, которые кодируют и регулируют насос оттока сульфита *SSU1p* [14]. Более высокая экспрессия этих генов может привести к тому, что больше свободного SO_2 будет выводиться за пределы дрожжевой клетки. Это является благоприятным фактором (при условии низкой способности культуры к продуцированию SO_2-реагирующих карбонильных соединений) для производства вин с пониженным содержанием диоксида серы, т. к. экспортируемая свободная форма SO_2 действует как противомикробное средство. В ходе проведенных исследований наибольшее количество свободной формы сернистой кислоты обнаружено в среде культивирования штамма I-187 – 7,1–12,8 мг/дм^3. Поскольку снижения роста клеток данного штамма в среде с диоксидом серы не наблюдалось, сохранение концентрации свободной формы SO_2 связано с высокой активностью насоса оттока SO_2 из клетки [14].

Основным карбонильным соединением, взаимодействующим с бисульфитом, является ацетальдегид, связывающий 40–50 % общего количества SO_2 в вине [4, 20]. Количество образующегося ацеталь-

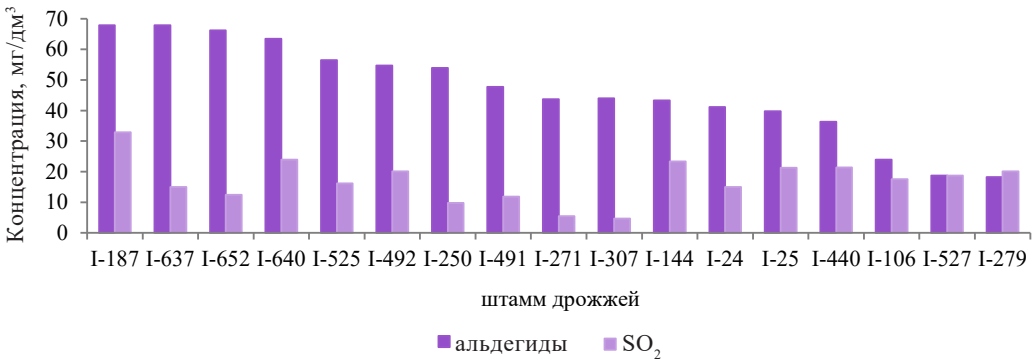


Рисунок 3. Концентрация диоксида серы и альдегидов в контрольном варианте по окончании экспоненциальной стадии роста разных штаммов дрожжей

Figure 3. Concentration of sulfur dioxide and aldehydes in the control after exponential stage, different yeast strains

дегида определяется генетическими особенностями штамма [21]. Среди исследуемых культур дрожжей наибольшей альдегидобразующей способностью отличались штаммы I-187, I-637, I-652, I-640, I-525, I-492 и I-250, где содержание альдегидов по окончании экспоненциальной фазы роста составляло от 53,9 до 67,9 мг/дм^3 (рис. 3). Штаммы I-106, I-527 и I-279 в процессе роста выделяли в среду небольшие количества альдегидов – от 18,2 до 23,9 мг/дм^3. В случае остальных штаммов концентрация ацетальдегида в среде варьировалась в диапазоне от 36,3 до 47,7 мг/дм^3.

Некоторыми авторами отмечалось увеличение синтеза ацетальдегида дрожжами в присутствии диоксида серы. Согласно результатам их исследований на каждый мг добавленного SO_2 образуется от 217 до 530 мкг ацетальдегида [22]. Полученные в ходе настоящего исследования результаты показали справедливость данного утверждения только в отношении штаммов I-106, I-24, I-25, I-279, I-491, I-492 и I-527, при культивировании которых увеличение концентрации альдегидов в среде с диоксидом серы составляло от 12,3 до 23,3 мг/дм^3 (рис. 4). В случае остальных штаммов увеличение количества диоксида серы не повлияло на концентрацию образуемого в ходе экспоненциальной фазы ацетальдегида. Это может быть связано с ролью ацетальдегида в жизнедеятельности дрожжевой клетки, который, помимо участия в нейтрализации негативного влияния диоксида серы, играет важную роль в поддержании общего окислительно-восстановительного баланса, обеспечении спиртоустойчивости клеток и т. д. [4].

Для достижения поставленной в работе задачи, а именно выявления наличия или отсутствия взаимосвязи между степенью устойчивости дрожжей к диоксиду серы, с одной стороны, и их способностью синтезировать диоксид серы и ацетальдегид в процессе роста, с другой стороны, экспериментальные данные были обработаны с использованием дискриминантного анализа. В качестве дискриминантной переменной выбрали изменение длительности лаг-фазы в присутствии диоксида серы в сравнении с контролем. По этому параметру исследуемые культуры были разделены на 3 условные группы. Первая группа объединяла наиболее чувствительные к действию SO_2 штаммы, длительность лаг-фазы которых увеличивалась на 8 и более часов (рис. 2). Ко второй группе отнесли штаммы, у которых лаг-фаза удлинилась на 2–6 ч и которые занимали промежуточное положение по степени устойчивости к SO_2. Третья группа включала культуры, длительность лаг-фазы которых не изменялась в присутствии диоксида серы, что характеризует их как наиболее устойчивые к действию SO_2. Учитывая актуальность селекции дрожжей для органического виноделия, статистический анализ был акцентирован на показателях роста и метаболизма дрожжей при культивировании на сусле без диоксида серы. В результате статистической обработки выявлены показатели, совокупность которых отличает выделенные группы штаммов, – длительность лаг-фазы, минимальное время генерации культуры в экспоненциальной фазе роста, концентрация ацетальдегида, свободная и связанная формы диоксида серы в среде культивирования в отсутствии SO_2 (Wilks L = 0,228, α = 0,05). Диапазоны варьирования и средние значения этих показателей для выделенных групп штаммов представлены в

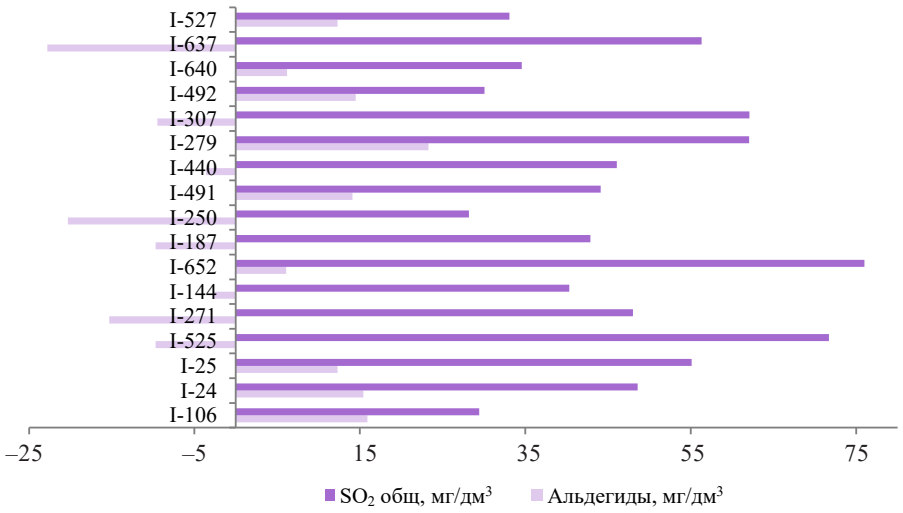


Рисунок 4. Изменение концентрации ацетальдегида и диоксида серы в присутствии диоксида серы относительно контрольных вариантов

Figure 4. Effect of sulfur dioxide on the concentration of acetaldehyde and sulfur dioxide in the presence of sulfur dioxide

Таблица 1. Диапазоны варьирования и средние значения показателей роста и метаболизма штаммов, объединенных в группы по SO_2-резистентности, при культивировании в сусле без диоксида серы

Table 1. Variation ranges and average values of growth and metabolism: strains grouped by SO_2-resistance during cultivation in wine must without O_2

Показатели	Группа штаммов		
	Первая	Вторая	Третья
Массовая концентрация альдегидов в среде культивирования, мг/дм^3	18,7–67,9 (41,8)	18,2–66,2 (43,9)	43,3–67,9 (54,7)
Массовая концентрация $SO_{2своб}$ в среде культивирования, мг/дм^3	0,7–3,2 (2,4)	1,3–5,1 (3,0)	1,9–7,1 (3,9)
Массовая концентрация $SO_{2связ}$ в среде культивирования, мг/дм^3	4,7–18,1 (13,3)	6,6–18,1 (10,9)	2,8–25,8 (17,1)
Минимальное время генерации в экспоненциальной фазе роста, ч	3,19–7,97 (5,3)	2,8–4,0 (3,4)	2,5–4,9 (3,4)
Длительность лаг-фазы, ч	8–13 (10,2)	7–14 (10,8)	6–15 (10,6)

Примечание: в скобках приведены средние значения показателей роста и метаболизма штаммов.

Note: in parentheses are the average values of growth and metabolism.

таблице 1. В условиях опыта наибольшее количество ацетальдегида (54,7 ± 11,1 мг/дм^3) и диоксида серы (21,0 ± 10,3 мг/дм^3) синтезировалось культурами, наиболее устойчивыми к диоксиду серы (третья группа). Средние значения показателей в первой и второй группах значимо не различались и составляли 41,8–43,9 и 15,7–15,1 мг/дм^3 соответственно. В случае штаммов первой группы концентрация связанной формы диоксида серы в среде культивирования была на 22 %, а второй группы на 36 % ниже таковой в среде культур третьей группы. Различия в количестве связанной формы диоксида серы в среде культивирования разных групп дрожжей связано не только с разным уровнем синтеза ацетальдегида исследуемыми штаммами, но и кетокислот [23]. Несмотря на то что значимых отличий групп штаммов по длительности лаг-фазы в отсутствии диоксида серы не выявлено, минимальное время генерации в экспоненциальной фазе роста штаммов второй и третьей групп было в среднем в 1,6 раза ниже, чем культур, объединенных в первую группу, у которых этот параметр составлял 5,3 ± 2,1 ч.

SO_2-резистентность штаммов *Saccharomyces cerevisiae* взаимосвязана с параметрами роста и метаболизма дрожжей, значимыми для виноделия с пониженной или нулевой SO_2-нагрузкой, а предложенная градация устойчивости культур к диоксиду серы по изменению длительности лаг-фазы может стать критерием для первичного отбора штаммов.

Учитывая, что основными требованиями к культуре дрожжей для производства органических вин (в которых не допускается присутствие диоксида серы) является их доминирование при инокуляции в сусло, а также низкая альдегид- и SO_2-образующая способность, наиболее перспективными штаммами являются I-24, I-250, I-279, I-440, I-652 и I-491 (вторая группа).

Способность наиболее устойчивых к диоксиду серы культур (третья группа) к доминированию при инокуляции в сусло, в том числе содержащее SO_2, и выделению в среду свободной формы диоксида серы делает их перспективными для производства вин с пониженным содержанием диоксида серы. Это относится к штаммам I-144, I-307, I-187 и I-640, которые, наряду с невысокой альдегидобразующей способностью в присутствии диоксида серы (рис. 4), выделяют в среду от 6 до 13 мг/дм^3 свободной формы SO_2.

Выводы

В ходе исследования установлена вариативность промышленно ценных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* из ЦКП Коллекции микроорганизмов виноделия «Магарач» по степени SO_2-резистентности, оцениваемой по увеличению продолжительности лаг-фазы роста в присутствии диоксида серы. По этому показателю культуры дрожжей объединены в три условные группы: первая – 8 ч и более (чувствительные), вторая – 2–6 ч, третья – без изменения (устойчивые). Установлено, что выделенные группы отличаются по минимальному времени генерации в экспоненциальной фазе роста (наибольшая – у культур первой группы), продуцированию в среду культивировании ацетальдегида и свободной форме диоксида серы. Длительность адаптации *S. cerevisiae* к диоксиду серы предложена в качестве критерия первичного отбора штаммов для вин с экостатусом. По совокупности физиологических и биохимических особенностей определено, что перспективными для производства органических вин являются штаммы дрожжей второй группы: I-24, I-250, I-279, I-440, I-652 и I-491, вин с пониженным содержанием диоксида серы – культуры третьей группы: I-144, I-307, I-187 и I-640.

Представленные результаты являются первым этапом исследований, направленных на разработку рекомендаций по подбору штаммов дрожжей для производства органических вин и вин с пониженным содержанием диоксида серы. Работа будет

продолжена в направлении расширения спектра культур дрожжей, уточнения диапазонов значений критериальных показателей и взаимосвязанных с ними параметров, отражающих физиологические и биохимические особенности штамма, а также включения отобранных культур в технологический цикл производства вин.

Критерии авторства

Е. В. Остроухова – руководитель проекта. И. В. Пескова – проводила анализ и обработку экспериментальных данных. Т. Н. Танащук – осуществляла проведение микробиологических исследований и обработку полученных результатов. Н. Ю. Луткова и М. А. Вьюгина – исполнители проводимых исследований.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории микробиологии ФГБУН «ВННИИВиВ «Магарач» за предоставление культур дрожжей из Коллекции микроорганизмов института «Магарач», а также всем коллегам, участвующим в подготовке публикации.

Contribution

E.V. Ostroukhova supervised the project. I.V. Peskova analyzed and processed experimental data. T.N. Tanashchuk performed the microbiological research and processed the results. N.Yu. Lutkova and M.A. Vyugina were responsible for the experiments.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the staff of the Laboratory of Microbiology of the All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" of the RAS for providing yeast cultures from their Collection of Winemaking Microorganisms, as well as to all colleagues involved in the publication preparation.

References/Список литературы

1. Guerrero RF, Cantos-Villar E. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. Trends in Food Science and Technology. 2015;42(1):27–43. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004

2. Romano P, Ciani M, Fleet GH. Yeasts in the production of wine. New York: Springer; 2019. 515 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4

3. Costanigro M, Appleby C, Menke SD. The wine headache: Consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. Food Quality and Preference. 2014;31:81–89. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.08.002

4. Zara G, Nardi T. Yeast metabolism and its exploitation in emerging winemaking trends: From sulfite tolerance to sulfite reduction. Fermentation. 2021;7(2). https://doi.org/10.3390/fermentation7020057

5. Walker ME, Zhang J, Sumby KM, Lee A, Houlès A, Li S, *et al.* Sulfate transport mutants affect hydrogen sulfide and sulfite production during alcoholic fermentation. Yeast. 2021;38(6):367–381. https://doi.org/10.1002/yea.3553

6. Divol B, du Toit M, Duckitt E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology. 2012;95:601–613. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4186-x

7. Garcıa-Rıos E, Nuevalos M, Barrio E, Puig S, Guil- lamon JM. A new chromosomal rearrangement improves the adaptation of wine yeasts to sulfite. Environmental Microbiology. 2019;21(5):1771–1781. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14586

8. Valero E, Tronchoni J, Morales P, Gonzalez R. Autophagy is required for sulfur dioxide tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Biotechnology. 2019;13(2):599–604. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13495

9. Zimmer A, Durand C, Loira N, Durrens P, Sherman DJ, Marullo P. QTL dissection of lag phase in wine fermentation reveals a new translocation responsible for *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to sulfite. PLoS ONE. 2014;9(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086298

10. Casalone E, Colella CM, Daly S, Gallori E, Moriani L, Polsinelli M. Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics. 1992;22(6):435–440. https://doi.org/10.1007/BF00326407

11. Magarach Common Use Center: Collection of Winemaking Microorganisms [Internet]. [cited 2022 Jun 10]. Available from: http://magarach-institut.ru/kollekcija-mikroorganizmov-vinodelija-magarach [ЦКП Коллекция микроорганизмов виноделия «Магарач». URL: http://magarach-institut.ru/kollekcija-mikroorganizmov-vinodelija-magarach (дата обращения: 10.06.2022).].

12. Kishkovskaya SA, Tanashchouk TN, Ivanova EV, Skorikova TK. Collection of microorganisms of winemaking of institute "Magarach" and role in microbiological supply industry. Viticulture and Winemaking. 2016;46:46–51. (In Russ.). [Коллекция микроорганизмов виноделия института «Магарач» и ее роль в микробиологическом обеспечении отрасли / С. А. Кишковская [и др.] // Виноградарство и виноделие. 2016. Т. 46. С. 46–51.].

13. Ivanova E. Study of acid-reducing ability of collection strains of wine yeast fungi-saccharomycetes. Norwegian Journal of Development of the International Science. 2021;(54–1):3–5. (In Russ.). https://doi.org/10.24412/3453-9875-2021-54-1-3-5

14. Morgan SC, Haggerty JJ, Johnston B, Jiranek V, Durall DM. Response to sulfur dioxide addition by two commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. Fermentation. 2019;5(3). https://doi.org/10.3390/fermentation5030069

15. Bruder S, Reifenrath M, Thomik T, Boles E, Herzod K. Parallelized online biomass monitoring in shake flasks enables efficient strain and carbon source dependent growth characterization of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Cell Factories. 2016;15. https://doi.org/10.1186/s12934-016-0526-3

16. Kuzmina SS, Kozubaeva LA, Egorova EYu, Kulushtayeva BM, Smolnikova FKh. Effect of berry extracts on *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Food Processing: Techniques and Technology. 2021;51(4):819–831. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2021-4-819-831

17. Makarov AS, Lutkov IP. Yeast race effect on the quality of base and young sparkling wines. Foods and Raw Materials. 2021;9(2):290–301. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-2-290-301

18. García-Ríos E, Guillamón JM. Sulfur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*: beyond *SSU1*. Microbial Cell. 2019;6(12):527–530. https://doi.org/10.15698/mic2019.12.699

19. Noble J, Sanchez I, Blondin B. Identification of new *Saccharomyces cerevisiae* variants of the *MET2* and *SKP2* genes con-trolling the sulfur assimilation pathway and the production of undesirable sulfur compounds during alcoholic fermentation. Microbial Cell Factories. 2015;14. https://doi.org/10.1186/s12934-015-0245-1

20. Li E, Mira de Orduña R. Acetaldehyde metabolism in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by SO_2 and cooling during alcoholic fermentation. OENO One. 2020;54(2):351–358. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.2.2391

21. Kishkovskaia SA, Tanashchuk TN, Avdanina DA, Eldarov MA, Ivanova EV, Shalamitskiy My, *et al.* Screening for promising yeast strains for sherry wine production using genetic and enological markers. Agricultural Biology. 2021;56(3):537–548. (In Russ.). https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.537eng

22. Li E, Mira de Orduña R. Acetaldehyde kinetics of enological yeast during alcoholic fermentation in grape must. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2017;44(2):229–236. https://doi.org/10.1007/s10295-016-1879-7

23. Peskova IV, Ostroukhova EV, Zaitseva OV, Lutkova NYu, Vyugina MA. The role of technological factors in the formation of SO_2-binding complex of base wines. Magarach. Viticulture and Vinemaking. 2021;23(1):83–90. https://doi.org/10.35547/IM.2021.96.76.014