

Селекция методом улучшающего отбора дрожжей вида *Kluyveromyces marxianus* и выбор лучшего продуцента эндополигалактуроназы

Шаламитский М.Ю.[✉], Танащук Т.Н., Иванова Е.В., Загоруйко В.А.

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Россия, Республика Крым, 298600, г. Ялта, ул. Кирова, 31

[✉]mshalamitskiy@yahoo.com

Аннотация. Расширение посадок сортов винограда с комплексной устойчивостью требует решения задачи по снижению содержания в виноградном сусле пектиновых веществ. Одним из путей решения данной задачи является применение ферментных препаратов пектолитического действия, получаемых из плесневых грибов *Aspergillus* spp. и *Trichoderma* spp. При недостаточной очистке побочные ферменты могут оказывать негативное влияние на виноматериалы и вызывать появление посторонних тонов в аромате и/или склонность к образованию помутнений. Альтернативой для получения пектиназы из плесневых грибов могут служить дрожжи-продуценты вида *Kluyveromyces marxianus*, которые не выделяют побочные ферменты. В работе представлены результаты селекции методом улучшающего отбора штамма *K. marxianus* по способности к продуцированию эндополигалактуроназы на виноградном сусле. Показано, что в зависимости от условий культивирования значительно изменяется активность продуцируемого фермента. Независимо от штамма при культивировании на виноградном сусле активность получаемого фермента снижалась на 4,0-28,5 % по сравнению с синтетической средой YPD. Выбран штамм *K. marxianus* III-358, который выделял наибольшее количество фермента при культивировании на виноградном сусле и подвергнут улучшающей селекции. В результате селекционной работы отобрано 10 изолятов с активностью фермента от 1495,6 до 1521,5 ед, что превышало активность исходного штамма на 19-21 %. Снижение активности эндополигалактуроназ отобранных изолятов на субстратах с pH 3,0 и 3,5 (по сравнению с pH 5,0) составило 72,4-75,8 % и 58,6-62,0 % соответственно. По результатам проведенных исследований отобран изолят дрожжей *K. marxianus* III-358-60, который признан перспективным и депонирован в коллекцию микроорганизмов виноделия «Магарач» под номером III-407.

Ключевые слова: дрожжи; селекция; эндополигалактуроназа; *Kluyveromyces marxianus*; ферменты.

Для цитирования: Шаламитский М.Ю., Танащук Т.Н., Иванова Е.В., Загоруйко В.А. Селекция методом улучшающего отбора дрожжей вида *Kluyveromyces marxianus* и выбор лучшего продуцента эндополигалактуроназы // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023;25(3):284-290. DOI 10.34919/IM.2023.25.3.010.

ORIGINAL RESEARCH

Selection of yeast species *Kluyveromyces marxianus* and choice of endopolygalacturonase top producer using the method of improving selection

Shalamitskiy M.Yu.[✉], Tanashchuk T.N., Ivanova E.V., Zagorouiko V.A.

All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, 31 Kirova str., 298600 Yalta, Republic of Crimea, Russia

[✉]mshalamitskiy@yahoo.com

Abstract. Expanding the planting of grape varieties with complex resistance requires the problem of reducing the content of pectin substances in grape must to be solved. One of the ways to solve this problem is the use of pectolytic enzyme preparations obtained from mold fungi *Aspergillus* spp. and *Trichoderma* spp. If purification is insufficient, by-product enzymes can have a negative effect on base wines and cause the appearance of off-tones in the aroma and/or a tendency to form cloudiness. An alternative for obtaining pectinases from mold fungi can be yeast-producers of the species *Kluyveromyces marxianus*, with no side enzymes secreting. This paper presents the selection results by the method of improving selection of *K. marxianus* strain for the ability to produce endopolygalacturonase in grape must. It was shown that depending on the cultivation conditions, the activity of produced enzyme changes significantly. Regardless of the strain, when cultivated on grape must, the activity of the resulting enzyme was decreasing by 4.0-28.5 % compared to the synthetic YPD medium. The strain *K. marxianus* III-358 was elected, as secreted the largest amount of enzyme when cultivated on grape must, and was subjected to improving selection. As a result of selection work, 10 isolates with enzymatic activity from 1495.6 to 1521.5 units were chosen, which exceeded the activity of original strain by 19-21 %. The decrease in the activity of endopolygalacturonases of selected isolates on substrates with pH 3.0 and 3.5 (compared to pH 5.0) was 72.4-75.8 % and 58.6-62.0 %, respectively. Based on the research results, the yeast isolate *K. marxianus* III-358-60 was selected, which was recognized as promising and was deposited in the Collection Microorganisms of Winemaking "Magarach" with the number III-407.

Key words: yeasts; selection; endopolygalacturonase; *Kluyveromyces marxianus*; enzymes.

For citation: Shalamitskiy M.Yu., Tanashchuk T.N., Ivanova E.V., Zagorouiko V.A. Selection of yeast species *Kluyveromyces marxianus* and choice of endopolygalacturonase top producer using the method of improving selection. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2023;25(3):284-290. DOI 10.34919/IM.2023.25.3.010 (in Russian).

Введение

В настоящее время происходит увеличение посадки новых сортов винограда с устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам окружающей

среды. В ягодах данных сортов содержится большое количество биополимеров, одним из которых являются пектиновые вещества, содержание которых может достигать 1,0 и более % по сравнению с другими сортами, в которых накапливается от 0,5 до 2,0 г/дм³ [1, 2]. Одна из причин их высокого накопления может

быть связана с их физиологической функцией обеспечения механической прочности и пластичности растений для образования барьера от внешней среды и контроля движения воды и жидкостей через быстро растущие части растения [3].

Различные ученые указывают на то, что высокие концентрации компонентов пектинового комплекса препятствуют осветлению сусла и обработке вино-материалов [4]. Обладая коллоидными свойствами, пектиновые вещества затрудняют осветление и фильтрацию виноградного сусла, а также в процессе их деметилирования в виноматериалах увеличивается содержание метилового спирта [5]. Для разрушения пектинового комплекса в виноделии традиционно используют пектолитические ферменты, в результате действия которых происходит гидролиз пектина, и он теряет свои коллоидные свойства, при этом снижается вязкость сусла и ускоряется его осветление [6]. Одним из основных ферментов, разрушающих пектин, является эндополигалактуроназа (К.Ф. 3.2.1.15), которая проводит гидролиз 1,4- α -гликозидной связи.

Однако представленные на рынке ферментные препараты пектолитического действия, которые обычно получают путем культивирования плесневых грибов *Aspergillus* spp. и *Trichoderma* spp. помимо пектиназ содержат ряд побочных ферментов, например, протеиназы и эстеразы [7, 8]. Различными авторами было показано влияние протеиназ на стабильность виноматериалов и возможность образования помутнений в готовых виноматериалах [9, 10]. Негативное влияние эстераз, в первую очередь, обусловлено активностью циннамолэстераз (ферулол и р-кумарол эстеразы), активность которых направлена на высвобождение гидроксидинамоловой кислоты из ее эфиров [11], что может приводить к возникновению посторонних тонов в аромате вин [12–14]. Также действие данных ферментов может приводить к увеличению содержания р-кумаровой и ферруловой кислот в виноматериалах [15]. Помимо плесневых дрожжей известно более 30 различных родов микроорганизмов, способных к синтезу пектиназ, среди которых последнее десятилетие активно изучаются следующие роды: *Erwinia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* и *Rhizopus* [16].

Для виноделия наибольший интерес представляют традиционно используемые дрожжи родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*, изучение способности которых к синтезу внеклеточной эндополигалактуроназы проводилось отечественными и зарубежными учеными [17]. Большинство штаммов дрожжей рода *Saccharomyces*, применяемые в виноделии, не обладают способностью к синтезу данного фермента, хотя эта особенность встречается у отдельных штаммов [18–20]. Исследование пектиназной активности дрожжей, принадлежащих к роду *Kluyveromyces*, показало их высокую способность к синтезу внеклеточной эндополигалактуроназы и отсутствие других побочных ферментов [21–26]. Это позволяет отнести данные дрожжи к наиболее перспективным продуцентам при применении их в виноделии.

При производстве ферментных препаратов важным фактором является выбор продуцента и условий культивирования, которые в значительной степени влияют на количество синтезируемого фермента. Отечественными учеными была выделена и охарактеризована эндополигалактуроназа двух штаммов дрожжей *Kluyveromyces marxianus*: ВКМ-У-480 [27] и штамма 54 с оптимумом температуры 45 °С и величины рН – 5,2. Нгуен Л.А. была разработана технология получения эндополигалактуроназы на молочной сыворотке с использованием штамма дрожжей *K. marxianus* ВКМ-У-848. В продолжение исследований Покровский А.В. предложил использование виноградного сусла в качестве питательной среды и применение полученного препарата для стабилизации крепленых вин. Дальнейшее развитие исследований позволило выявить влияние различных добавок в питательную среду для повышения количества синтезируемого фермента. Таким образом, исследование способности дрожжей к синтезу эндополигалактуроназы и селекция новых высокопроизводительных штаммов представляет особый интерес.

Цель работы – поиск и селекция штамма-продуцента эндополигалактуроназы и оптимизация условий его культивирования для получения максимального выхода фермента и применения его в виноделии.

Материалы и методы исследования

Штаммы дрожжей вида *Kluyveromyces marxianus* III-74, III-76, III-358, III-359, III-360, III-361, III-362, III-363 взяты из коллекции микроорганизмов виноделия «Магарач» (КМВ «Магарач»), активность эндополигалактуроназы у данных штаммов была определена ранее [28]. Для определения активности фермента дрожжи культивировали при (30±1) °С в течение 5 суток на виноградном сусле (массовая концентрация сахаров – 200 г/л, рН – 3,4) и на синтетической среде YPD (г/л: глюкоза – 20, пептон – 20, дрожжевой экстракт – 10, величина рН – 5,0), затем производили измерение активности эндополигалактуроназы вискозиметрическим методом по ГОСТ 55298-2012. Для дальнейших исследований и селекционной работы отбирали штаммы с максимальной ферментативной активностью при росте на виноградном сусле.

Селекцию дрожжей проводили следующим методом: исходный штамм петлей рассеивали на чашки Петри с агаризованным виноградным суслом (массовая концентрация сахаров 200 г/л, рН 3,4) и культивировали при (30±1)°С в течение 3-5 сут. до появления на поверхности среды сформированных отдельных колоний. Двести однородных по морфологии колоний отбирали в пробирки с пастеризованным виноградным суслом и культивировали при температуре (30±0,5)°С до 5 сут. Отбирали пробирки с активным ростом изолятов и определяли в среде культивирования активность эндополигалактуроназы при величине рН 5,0. Для изолятов с наиболее высоким уровнем активности фермента (по сравнению с активностью исходного штамма) определяли активность эндополигалактуроназы с использованием ацетатных буфе-

ров при величине рН 3,5 и 3,0.

Видовую принадлежность изолятов дрожжей рода *Kluyveromyces* подтверждали методом ПЦР-ПДРФ [29]. Амплификацию участка ДНК ITS1-ITS4 осуществляли с помощью праймеров ITS 1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G – 3') и ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3'). ПЦР проводили в 25 мкл буфера, содержащего 2,5 mM MgCl₂, 10 мкМ dNTP смеси, 100 пМ каждого праймера, 0,5 единицы Taq-полимеразы («Синтол», Россия) и 1 мкл ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 95 °С в течение 5 мин., затем 35 циклов в следующем режиме: денатурация при 94°С – 60 с, отжиг праймеров при 55,5°С – 2 мин., синтез ДНК при 72 °С – 2 мин.; конечная достройка при 72°С – 10 мин. Продукты амплификации подвергали рестрикции с помощью рестриктаз *Asp*LE I, *Hae* III и *Hinf*I по инструкции фирмы-производителя. Продукты рестрикции подвергали электрофорезу в агарозном геле с массовой концентрацией агарозы 1 г/100 мл при 60–65 В в 1,0×ТАЕ буфере (45 mM Трис, 1мМ ЭДТА, 45 mM ледяная уксусная кислота, рН 7,6) в течение 2–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и визуализировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе УВТ-1 (Биоком). В качестве маркера молекулярных весов использовали 100b DNA Ladder (Fermentas, Литва). По набору рестрикционных фрагментов относили штамм к соответствующему виду.

Данные экспериментов обрабатывали согласно общепринятым методам математической статистики. Вычисление парных корреляций между показателями и определение критерия Тьюки осуществляли с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics (v 17.0).

Результаты и их обсуждение

Анализ эндополигалактуроназной активности отобранных штаммов дрожжей на виноградном сусле и среде YPD представлен на рис. 1. Все штаммы при

культивировании на виноградном сусле (рН 3,4) снизили свою активность по сравнению со средой YPD (рН 5,0) на 4,0–28,5 %. Это может быть связано с тем, что все отобранные штаммы первоначально были выделены из экологических природных ниш, не относящихся к виноделию. В то же время, дрожжи рода *Kluyveromyces* могут присутствовать на винограде, что определяется их способностью развиваться в широком диапазоне значений рН среды культивирования – от 3,0 до 8,0. При этом максимум активности фермент проявляет при значениях рН, близких к 5,0 [17].

Минимальным расхождением по количеству накапливаемого фермента при культивировании на среде YPD и виноградном сусле характеризовался штамм дрожжей *K. marxianus* № III-358. Кроме того, он отличался максимальной активностью фермента (1253,7 ед.) при культивировании на виноградном сусле с рН 3,4. Это позволило выбрать данный штамм для дальнейшей селекционной работы.

С отобранным штаммом была проведена селекционная работа, в результате которой было отобрано 10 изолятов с активностью фермента от 1495,6 до 1521,5 ед., что превышало активность исходного штамма на 19–21 %. Для данных изолятов было проведено генетическое исследование их видовой принадлежности, в результате которого все они были отнесены к виду *K. marxianus* (рис. 2).

Изучение активности фермента на субстратах со значениями рН 3,0 и 3,5 по сравнению с 5,0 показало, что для всех 10 штаммов наблюдается снижение активности эндополигалактуроназы при снижении значения рН субстрата. Так, при величине рН 3,5 снижение активности по сравнению с оптимальными условиями (значение рН 5,0) составило 58,6–62,0 %, а при значении рН 3,0 – от 72,4 до 75,8 % в зависимости от штамма (табл. 1) Такое снижение активности может быть объяснено тем, что оптимальная активная кислотность среды для работы фермента находится в диапазоне 4,8–5,0 [30], а виноградное сусло имеет

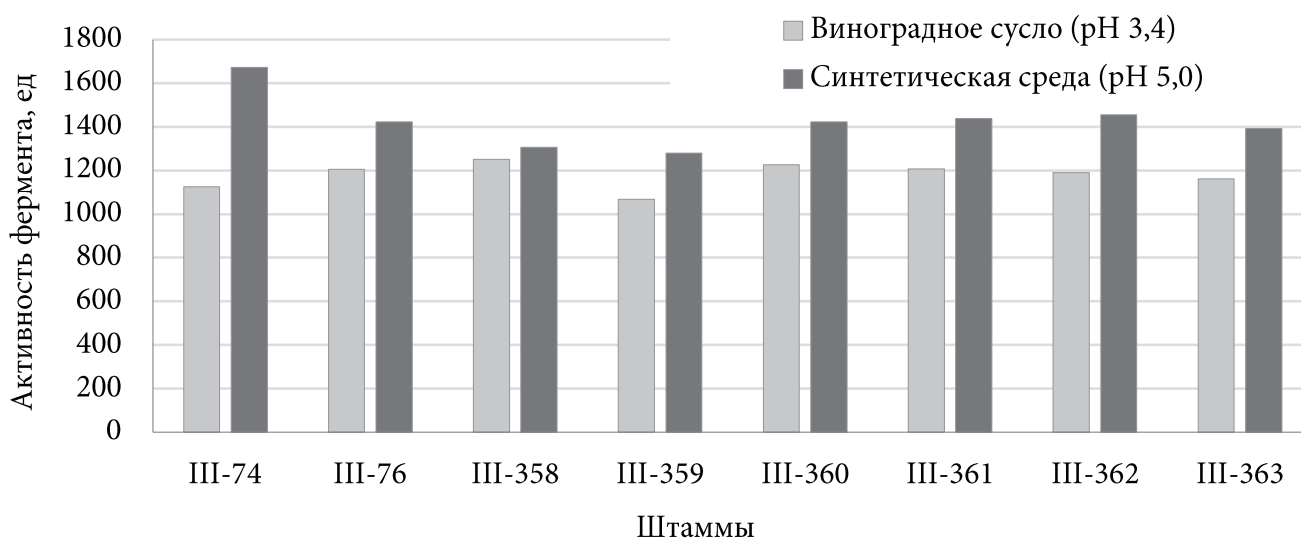


Рис. 1. Эндополигалактуроназная активность штаммов рода *Kluyveromyces* в зависимости от условий культивирования

Fig. 1. Endopolygalacturonase activity of strains of yeast genus *Kluyveromyces* depending on cultivation conditions

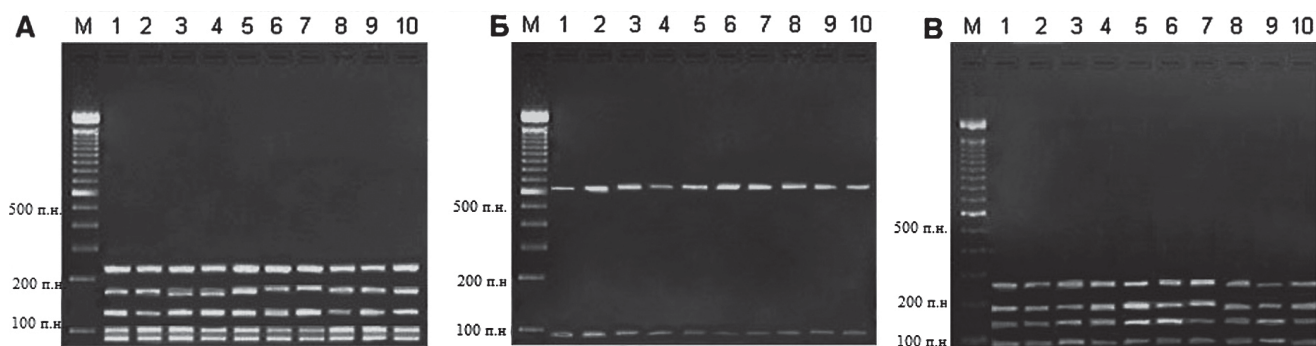


Рис. 2. Электрофорез в агарозном геле продуктов рестрикции фрагмента ITS1-ITS4 рестриктазами *AspLE I* (А), *Hae III* (Б) и *Hinf I* (В). М – маркер молекулярной массы 1000 п.н.; изоляты 1 – III-358-15, 2 – III-358-17, 3 – III-358-24, 4 – III-358-35, 5 – III-358-51, 6 – III-358-60, 7 – III-358-75, 8 – III-358-77, 9 – III-358-78, 10 – III-358-90

Fig. 2. Electrophoresis in agarose gel of restriction products of ITS1-ITS4 fragment with the restriction enzymes *AspLE I* (A), *Hae III* (B) and *Hinf I* (C). М – molecular weight marker 1000 bp; isolates 1 – III-358-15, 2 – III-358-17, 3 – III-358-24, 4 – III-358-35, 5 – III-358-51, 6 – III-358-60, 7 – III-358-75, 8 – III-358-77, 9 – III-358-78, 10 – III-358-90

Таблица 1. Активность эндополигалактуроназы в зависимости от величины рН субстрата

Table 1. Endopolygalacturonase activity depending on the pH value of substrate

Изолят	Ферментативная активность (ед) и ее снижение (%) при рН субстрата				
	рН 3,0	Δ1, %	рН 3,5	Δ2, %	рН 5,0 (контроль)
III-358-15	368,4	75,8	586,7	61,4	1520,9
III-358-17	380,5	74,8	595,4	60,6	1510,5
III-358-24	371,9	75,2	581,0	61,2	1498,8
III-358-35	414,9	72,4	597,7	60,2	1502,3
III-358-51	402,1	73,3	623,2	58,6	1505,6
III-358-60	413,3	72,9	629,8	58,7	1523,8
III-358-75	377,6	74,8	573,3	61,8	1500,4
III-358-77	401,5	73,3	593,1	60,6	1506,4
III-358-78	408,6	72,9	572,5	62,0	1508,5
III-358-90	410,8	72,7	611,2	59,4	1504,9

более низкие значения рН 3,0–3,5.

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

По результатам проведенных исследований штамм № III-358-60 депонирован в КМВ «Магарач» под номером III-407. Фенотипические и биохимические свойства нового селекционного штамма – продуцента эндополигалактуроназы представлены в табл. 2.

Таблица 2. Паспортные данные селекционного штамма № III-407

Table 2. Passport data of the selection strain No. III-407

Параметр	Описание
Наименование культуры	III-407
Вид	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Происхождение	селекционный
Способ получения	улучшающая селекция на виноградном сусле штамма III-358 (КМВ «Магарач»)
Место получения	лаборатория микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН»
Морфологические свойства: форма и размер клеток	клетки эллипсоидальные, размеры 2–6 мкм в ширину и 5–11 мкм в длину, встречаются скопления по 2–3 клетки, при спорообразовании образует аски с 1–4 спорами, форма спор: сферическая и эллипсоидальная
Технологические свойства	синтезирует внеклеточную эндополигалактуроназу
Область применения	получение внеклеточной эндополигалактуроназы для применения на стадии обработки виноградного сусла из сортов винограда с высоким содержанием пектина, снижения вязкости и обеспечения лучшего выхода сусла
Условия поддержания	хранение при температуре (8±2) °С на виноградном сусле; периодичность пересевов – 1 раз в 9 мес.; хранение при минус 86 °С на среде YPD с 30 % глицерина
Авторы	Шаламитский М.Ю., Танашук Т.Н., Иванова Е.В. – лаборатория микробиологии ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН», г. Ялта

Выводы

Проведенная работа по отбору и селекции штамма-продуцента эндополигалактуроназы позволила получить перспективный штамм, представляющий интерес для виноделия. Дальнейшие исследования будут направлены на оптимизацию режимов культивирования и условий применения получаемого фермента для обработки виноградного сусла.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания № FEUU-2019-0008.

Financing source

The study was conducted under public assignment No. FEUU-2019-0008.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы

1. Бареева Н.Н., Донченко Л.В. Оценка сортов винограда нового поколения как сырья для комплексной переработки // Научный журнал КубГАУ. 2006;18:23-30.
2. Мелконян М.В., Студенникова Н.Л., Рачинская А.И., Рошка Н.А. Содержание биополимеров в зрелых ягодах винограда в условиях южного берега Крыма // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2000;3:13-15.
3. Leclere L., Van Cutsem P., Michiels C. Anti-cancer activities of pH-or heat-modified pectin. *Front Pharmacol.* 2013;4:128. DOI 10.3389/fphar.2013.00128.
4. Нилов В.И., Скурихин И.М. Химия виноделия. М.: Пищевая промышленность. 1967:1-442.
5. Arcanjo N.M.O., Oliveira M.E.S., Araujo I.B.S., Silva F.L.H., Madruga M.S. Red wine produced from the Isabella and Ives cultivar (*Vitis labrusca*): profile of volatiles and aroma descriptors. *Food Science and Technology.* 2018;38(4):271-279. DOI 10.1590/1678-457x.04717.
6. Sakai T. Degradation of pectins. *Microbial Degradation of Natural Products.* Eds. Winklemann G. New York: VHC Publishers. 1992:57-81.
7. Fia G., Canuti V., Rosi I. Evaluation of potential side activities of commercial enzyme preparations used in winemaking. *International Journal of Food Science & Technology.* 2014;49(8):1902-1911. DOI 10.1111/ijfs.12508.
8. Guérin L., Sutter D.H., Demois A., Chereau M., Trandafir G. Determination of activity profiles of the main commercial enzyme preparations used in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 2009;60(3):322-331. DOI 10.5344/ajev.2009.60.3.322.
9. Bakalinsky A.T., Boulton R.B. The study of an immobilized acid protease for the treatment of wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture.* 1985;36:23-29. DOI 10.5344/ajev.1985.36.1.23.
10. Waters E.J., Wallace W., Williams P.J. Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 1992;40:1514-1519. DOI:10.1021/jf00021a008.
11. Topakas E., Vafiadi C., Christakopoulos P. Microbial production, characterization and application of feruloyl esterases. *Process Biochemistry.* 2007;42:497-509. DOI 10.1016/j.procbio.2007.01.007.
12. Dugelay I., Günata Z., Sapis J.C., Baumes R., Bayonove C. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1993;41:2092-2096. DOI 10.1021/jf00035a051.
13. Gerbaux V., Vincent B., Bertrand A. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *American Journal of Enology and Viticulture.* 2002;53:131-137. DOI 10.5344/ajev.2002.53.2.131.
14. Kheir J., Salameh D., Strehaiano P., Brandam C., Lteif R. Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measure of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. *European Food Research and Technology.* 2013;237:655-671. DOI 10.1007/s00217-013-2036-4.
15. Barbe C., Dubourdiou D. Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 1998;78:471-478. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(199812)78:4<471::AID-JSFA141>3.0.CO;2-0.
16. Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T., Viniegra-González G. Hydrolytic depolymerising pectinases. *Food Technology and Biotechnology.* 2005;44(2):221-227.
17. Wimborne M.P., Rickard P.A.D. Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* cultured in controlled environments. *Biotechnology and Bioengineering.* 1978;20(2):231-242. DOI 10.1002/bit.260200206.
18. McKay A.M. Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1990;11:41-44. DOI 10.1111/j.1472-765X.1990.tb00132.x.
19. Blanco P., Sieiro C., Diaz A., Villa T.G. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 1994;40:974-977. DOI 10.1139/m94-155.
20. Gainvors A., Fre'zier V., Lemaesquier H., Lequart C., Aigle M., Belarbi A. Detection of polygalacturonase, pectinlyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast.* 1994;10:1311-1319. DOI 10.1002/yea.320101008.
21. Espinoza P., Barzana E., Garcia-Garibay M., Gomez-Ruiz L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase orinulinase. *Biotechnol. Lett.* 1992;14:1053-1058.
22. Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2008;79:339-354. DOI 10.1007/s00253-008-1458-6.
23. Perez-Brito D., Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Larqué-Saavedra A., Lappe-Oliveras P. Molecular characterization of *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from *Agave fourcroydes* (Lem.) in Yucatan, Mexico. *Molecular Biotechnology.* 2007;37:181-186. DOI 10.1007/s12033-007-0036-y.
24. Martínez-Corona R., Gonzalez-Hernandez J.C., Radames-Trejo V., Cortes-Penagos C., Chavez-Parga M.C., Zamudio-Jaramillo M.A. Effect of initial substrate concentration and agitation on xylitol production by fermentation of hydrolyzed tamarind seed media with *Kluyveromyces marxianus*. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica.* 2015;14:393-403.
25. Alimardani-Theuil P., Gainvors-Claisse A., Duchiron F. Yeasts: An attractive source of pectinases – from gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry.* 2011;46:1525-1537.
26. Gomez-Ruiz L., Garcia-Garibay M., Barzana E. Utilization of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. *Journal of Food Science.*

- 1988;53:1236-1240.
27. Егоров Н.С., Датунашвили Е.Н., Ландау Н.С. Свойства полигалактуроназы дрожжей *Fabospora macedomensis* ВКМУ-480. Биологические науки. 1983;8:35-39.
28. Шаламитский М.Ю. Исследование эндо-полигалактуроназной активности разных видов дрожжей // Инновации в науке. 2014;37:35-41.
29. Pham T., Wimalasena T., Vox W.G., Koivuranta K., Storgårds E., Smart K.A., Gibson B.R. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'wild' yeast contaminants. Journal Institute of Brewing. 2011;117(4):556-568. DOI 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00504.x.
30. Sieiro C., Sestelo A.B.F., Villa T.G. Cloning, characterization, and functional analysis of the EPG1-2 gene: a new allele coding for an endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009;57(19):8921-8926. DOI 10.1021/jf900352q.
- ### References
- Bareyeva N.N., Donchenko L.V. Assessment of new generation grape varieties as raw materials for complex processing. Scientific Journal of KubSAU. 2006;18:23-30 (in Russian).
 - Melkonjan M.V., Studennikova N.L., Rachinskaja A.I., Roshka N.A. Content of biopolymers in mature grape berries at conditions of the South coast of Crimea. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2000;3:13-15 (in Russian).
 - Leclere L., Van Cutsem P., Michiels C. Anti-cancer activities of pH-or heat-modified pectin. Front Pharmacol. 2013;4:128. DOI 10.3389/fphar.2013.00128.
 - Nilov V.I., Skurikhin I.M. Chemistry of winemaking. M.: Food industry. 1967:1-442 (in Russian).
 - Arcanjo N.M.O., Oliveira M.E.S., Araujo I.B.S., Silva F.L.H., Madruga M.S. Red wine produced from the Isabella and Ives cultivar (*Vitis labrusca*): profile of volatiles and aroma descriptors. Food Science and Technology. 2018;38(4):271-279. DOI 10.1590/1678-457x.04717.
 - Sakai T. Degradation of pectins. Microbial Degradation of Natural Products. Eds. Winklemann G. New York: VHC Publishers. 1992:57-81.
 - Fia G., Canuti V., Rosi I. Evaluation of potential side activities of commercial enzyme preparations used in winemaking. International Journal of Food Science & Technology. 2014;49(8):1902-1911. DOI 10.1111/ijfs.12508.
 - Guérin L., Sutter D.H., Demois A., Chereau M., Trandafir G. Determination of activity profiles of the main commercial enzyme preparations used in winemaking. Am. J. Enol. Vitic. 2009;60(3):322-331. DOI 10.5344/ajev.2009.60.3.322.
 - Bakalinsky A.T., Boulton R.B. The study of an immobilized acid protease for the treatment of wine proteins. American Journal of Enology and Viticulture. 1985;36:23-29. DOI 10.5344/ajev.1985.36.1.23.
 - Waters E.J., Wallace W., Williams P.J. Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidase. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 1992;40:1514-1519. DOI:10.1021/jf00021a008.
 - Topakas E., Vafiadi C., Christakopoulos P. Microbial production, characterization and application of feruloyl esterases. Process Biochemistry. 2007;42:497-509. DOI 10.1016/j.procbio.2007.01.007.
 - Dugelay I., Günata Z., Sapis J.C., Baumes R., Bayonove C. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1993;41:2092-2096. DOI 10.1021/jf00035a051.
 - Gerbaux V., Vincent B., Bertrand A. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. American Journal of Enology and Viticulture. 2002;53:131-137. DOI 10.5344/ajev.2002.53.2.131.
 - Kheir J., Salameh D., Strehaiano P., Brandam C., Lteif R. Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measure of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. European Food Research and Technology. 2013;237:655-671. DOI 10.1007/s00217-013-2036-4.
 - Barbe C., Dubourdiou D. Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1998;78:471-478. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(199812)78:4<471::AID-JSFA141>3.0.CO;2-0.
 - Favela-Torres E., Volke-Sepúlveda T., Viniestra-González G. Hydrolytic depolymerising pectinases. Food Technology and Biotechnology. 2005;44(2):221-227.
 - Wimborne M.P., Rickard P.A.D. Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* cultured in controlled environments. Biotechnology and Bioengineering. 1978;20(2):231-242. DOI 10.1002/bit.260200206.
 - McKay A.M. Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. Lett. Appl. Microbiol. 1990;11:41-44. DOI 10.1111/j.1472-765X.1990.tb00132.x.
 - Blanco P., Sieiro C., Diaz A., Villa T.G. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol. 1994;40:974-977. DOI 10.1139/m94-155.
 - Gainvors A., Fre'zier V., Lemaesquier H., Lequart C., Aigle M., Belarbi A. Detection of polygalacturonase, pectinlyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. Yeast. 1994;10:1311-1319. DOI 10.1002/yea.320101008.
 - Espinoza P., Barzana E., Garcia-Garibay M., Gomez-Ruiz L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously with pectinase orinulinase. Biotechnol. Lett. 1992;14:1053-1058.
 - Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology. 2008;79:339-354. DOI 10.1007/s00253-008-1458-6.
 - Perez-Brito D., Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Larqué-Saavedra A., Lappe-Oliveras P. Molecular characterization of *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from Agave fourcroydes (Lem.) in Yucatan, Mexico. Molecular Biotechnology. 2007;37:181-186. DOI 10.1007/s12033-007-0036-y.
 - Martínez-Corona R., Gonzalez-Hernandez J.C., Radames-Trejo V., Cortes-Penagos C., Chavez-Parga M.C., Zamudio-Jaramillo M.A. Effect of initial substrate concentration and agitation on xylitol production by fermentation of hydrolyzed tamarind seed media with *Kluyveromyces marxianus*. Revista Mexicana de Ingenieria Quimica. 2015;14:393-403.
 - Alimardani-Theuil P., Gainvors-Claisse A., Duchiron F. Yeasts: An attractive source of pectinases - from gene expression to potential applications: A review. Process Biochemistry. 2011;46:1525-1537.
 - Gomez-Ruiz L., Garcia-Garibay M., Barzana E. Utilization of endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. Journal of Food Science. 1988;53:1236-1240.
 - Egorov N.S., Datunashvili E.N., Landau N.S. Properties

- of polygalacturonase of the yeast *Fabospora macedomensis* BKMY-480. Biological Sciences. 1983;8:35-39 (in Russian).
28. Shalamitskiy M. Yu. Studying endo-polygalacturonase activity of various yeast species. Innovation in Science. 2014;37:35-41 (in Russian).
29. Pham T., Wimalasena T., Box W.G., Koivuranta K., Storgårds E., Smart K.A., Gibson B.R. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'wild' yeast contaminants. Journal Institute of Brewing. 2011;117(4):556-568. DOI 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00504.x.
30. Sieiro C., Sestelo A.B.F., Villa T.G. Cloning, characterization, and functional analysis of the EPG1-2 gene: a new allele coding for an endopolygalacturonase in *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009;57(19):8921-8926. DOI 10.1021/jf900352q.

Информация об авторах

Максим Юрьевич Шаламитский, канд. техн. наук, науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: mshalamitskiy@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-5888-6228>;

Татьяна Николаевна Танащук, канд. техн. наук, вед. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: magarach_microbiol.lab@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7847-1246>;

Иванова Елена Владимировна, канд. техн. наук, вед. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-mail: lenochka_ivanova_58@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5989-6604>;

Виктор Афанасьевич Загоруйко, д-р техн. наук, член-корр. НААН, гл. науч. сотр., зав. лабораторией коньяка; e-mail: vikzag51@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1350-7551>.

Information about authors

Maksim Yu. Shalamitskiy, Cand. Tech. Sci., Staff Scientist, Laboratory of Microbiology; e-mail: mshalamitskiy@yahoo.com; <https://orcid.org/0000-0001-5888-6228>;

Tatiana N. Tanashchuk, Cand. Tech. Sci., Leading Staff Scientist, Laboratory of Microbiology; e-mail: magarach_microbiol.lab@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7847-1246>;

Elena V. Ivanova, Cand. Tech. Sci., Leading Staff Scientist, Laboratory of Microbiology; e-mail: lenochka_ivanova_58@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5989-6604>;

Viktor A. Zagorouiko, Dr. Techn. Sci., Corresponding Member of the National Academy of Agrarian Sciences (NAAS), Chief Staff Scientist, Head of the Laboratory of Cognac and Brandy; e-mail: vikzag51@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1350-7551>.

Статья поступила 14.08.2023, одобрена после рецензии 21.08.2023, принята к публикации 21.08.2023.