

Скрининг природных изолятов дрожжей для производства терруарных вин Крыма

Шаламитский М.Ю.[✉], Луткова Н.Ю., Семенова К.А., Иванова Е.В., Загоруйко В.И.

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Ялта, Россия

[✉]mshalamitskiy@yahoo.com

Аннотация. Республика Крым является одним из основных винодельческих районов Российской Федерации. Однако энологические характеристики местных дрожжей изучены слабо. Цель проводимого исследования заключалась в изучении биоразнообразия дрожжевой микрофлоры в ампелоценозах Крыма, технологических свойств дрожжей и их селекция для терруарного виноделия. В данной работе представлены исследования по отбору перспективных для виноделия природных штаммов дрожжей. Были оценены энологические свойства, включая стрессоустойчивость, способность к синтезу сероводорода, фенотип киллера у 98 местных изолятов *Saccharomyces cerevisiae* из четырех природно-климатических зон Республики Крым. Свойства изучаемых штаммов значительно различались. Среди изученных штаммов было обнаружено только 4 штамма фенотипа киллер. Высокая и средняя способность к синтезу сероводорода была обнаружена у 47 штаммов, способность к синтезу летучих кислот – у 67. Способность выдерживать концентрацию спирта 14 % об. была обнаружена у 52 штаммов дрожжей. По результатам оценки физиолого-биохимических свойств из 98 штаммов дрожжей для дальнейшей работы было отобрано два штамма, перспективных для виноделия.

Ключевые слова: дрожжи; технологические свойства; термостойкость; сульфитостойкость; спиртовыносливость.

Для цитирования: Шаламитский М.Ю., Луткова Н.Ю., Семенова К.А., Иванова Е.В., Загоруйко В.И. Скрининг природных изолятов дрожжей для производства терруарных вин Крыма // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2025;27(4):365-369. EDN TQVCOG.

О Р И Г И Н А Л Ь Н О Е И С С Л Е Д О В А Н И Е

Screening of native yeast isolates for the production of Crimean terroir wines

Shalamitskiy M.Yu.[✉], Lutkova N.Yu., Semenova K.A., Ivanova E.V., Zagoruiko V.I.

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

[✉]mshalamitskiy@yahoo.com

Abstract. The Republic of Crimea is one of the main winemaking regions of the Russian Federation. However, the oenological characteristics of local yeasts have been poorly studied. The aim of the conducted research was to study the biodiversity of yeast microflora in Crimean ampelocenoses, investigate the yeast technological properties, and select strains for terroir winemaking. This paper presents the research on selecting promising native yeast strains for winemaking. The oenological properties, including stress tolerance, ability to hydrogen sulfide synthesis, and killer phenotype of 98 local *Saccharomyces cerevisiae* isolates from four natural and climatic zones of the Republic of Crimea were evaluated. The properties of the studied strains varied significantly. Among the studied strains, only four exhibited a killer phenotype. High and moderate hydrogen sulfide synthesis ability was detected in 47 strains, while volatile acid synthesis ability was found in 67 strains. The ability to exhibit tolerance to an alcohol in the concentration of 14% vol. was observed in 52 yeast strains. Based on the assessment of physiological and biochemical properties, two promising for winemaking yeast strains were selected from 98 strains for further work.

Key words: yeast; technological properties; thermotolerance; sulfite tolerance; alcohol tolerance.

For citation: Shalamitskiy M.Yu., Lutkova N.Yu., Semenova K.A., Ivanova E.V., Zagoruiko V.I. Screening of native yeast isolates for the production of Crimean terroir wines. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2025;27(4):365-369. EDN TQVCOG (in Russian).

Введение

В настоящее время рыночные тенденции в области виноделия направлены на производство свежих вин с высокой интенсивностью аромата и низким содержанием этилового спирта [1]. Однако глобальное потепление значительно влияет на виноградное растение, и виноград содержит больше сахара, меньше органических кислот, а также происходят изменения в синтезе ароматических веществ [2]. Поэтому виноделам приходится разрабатывать новые стратегии, которые смягчают

потенциальную высокую крепость или другие факторы, влияющие на качество вина.

Целью проводимых исследований является изучение биоразнообразия дрожжевой микрофлоры в ампелоценозах Крыма, изучение их технологических свойств и селекция дрожжей для терруарного виноделия.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются основным видом, используемым в винодельческой промышленности. Сахаромицеты хорошо адаптированы к виноградному суслу, которое значительно отличается по содержанию азота, количеству растворенного кислорода, микро- и макроэлементов, а также витаминов и других компонентов [3–5].

Кроме того, они обеспечивают активное и контролируемое брожение благодаря их способности быстро захватывать доступное пространство и эффективно сбраживать виноградное сусло [1, 6].

Кроме того, каждый штамм дрожжей, даже в пределах одного вида может иметь специфические потребности в питании, как в количестве различных нутриентов, так и в их соотношении [7–8], что может быть обосновано способностью штаммов дрожжей-сахаромицетов быстро адаптироваться к новым условиям благодаря различным генетическим механизмам [9]. Данные различия в потребности питательных веществ могут в значительной мере влиять на ароматический профиль получаемого вина [10–11]. Современные исследования подтверждают способность дрожжей-сахаромицетов синтезировать различные сложные эфиры, высшие спирты и другие компоненты аромата, из которых формируются вкусоароматические профили вин из ароматических и разветвленных аминокислот [12].

Таким образом, использование местных дрожжей для производства вина является целесообразным выбором для гарантированного получения высококачественной и легко узнаваемой винодельческой продукции конкретного терруара винодельческого региона. Выбор подходящих местных дрожжей может обеспечить сохранение эннологических характеристик. Скрининг специфических штаммов дрожжей с заданными свойствами имеет важное значение для адаптации винодельческих практик к условиям изменения климата. В связи с этим в изучение морфолого-физиологических и технологических свойств местных изолятов дрожжей и создание на их базе рабочей коллекции стартовых культур для брожения региональных вин является актуальным.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования являлись 752 изолята дрожжей, выделенных в 2022–2024 гг. из спонтанно бродящего сусла, приготовленного из винограда, выращиваемого в 4 природно-климатических зонах Республики Крым (Южный берег Крыма, Западный предгорно-приморский район, Западный приморско-степной район, Центральный степной район). При проведении исследований были использованы подходы и методы, общепринятые в микробиологии виноделия [13]. Видовую принадлежность изолятов дрожжей определяли с генетическими методами с помощью мультипраймерной ПЦР [14]. При отборе штаммов применяли многоступенчатый скрининг по физиолого-биохимическим и технологическим показателям. Первоначальный отбор изолятов дрожжей осуществляли на основе морфологической картины трехсуточной культуры дрожжей. Дальнейшую

оценку дрожжей проводили по их ростовой реакции на изменение отдельных абиотических факторов и по способности к образованию сероводорода применяли модифицированные экспресс-методы.

Оценку кислотовыносливости, спиртовыносливости, сульфитостойкости, холодо- и термостойкости проводили по ростовой реакции клеток дрожжей на низкие значения pH среды, низкие и высокие температуры. Дрожжи культивировались 2 суток на среде YPD (г/л, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20), затем репликатором переносились на чашки Петри с плотной питательной средой YPD (г/л, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20, агар – 20, желатин – 5). При оценке холодостойкости чашки инкубировали при температуре 10 ± 1 °C, термостойкости – 37 ± 1 °C; при оценке кислотовыносливости – при температуре 26 ± 1 °C, pH среды корректировали до 2,6 соляной кислотой. При оценке спиртовыносливости в среду вносили этиловый спирт до концентрации 10, 12 и 14 % об. При оценке сульфитостойкости в среду вносили диоксид серы в количестве 200 мг/л. Осмотр чашек Петри проводили ежедневно в течение 5 суток. Визуально отмечали ростовую реакцию изолятов на заданные условия культивирования (наличие роста, отсутствие роста).

Способность штаммов образовывать сероводород изучали на плотной питательной среде BIGGY Agar [15]. Посевы культивировали при температуре 30 ± 1 °C в течение 24 ч. Наличие сероводорода оценивали визуально по шкале цвета: белый – сероводород не образует; светло-коричневый – образует сероводород в незначительных количествах; темно-коричневый – образует сероводород в среднем количестве; черный – высокое образование сероводорода.

Способность штаммов образовывать уксусную кислоту оценивали по результатам их роста – образованию прозрачного ореола, окружающего место посева. Штаммы культивировали в течение 72 ч при температуре 30 ± 1 °C на плотной среде с карбонатом кальция после чего оценивали способность штамма синтезировать уксусную кислоту.

Киллерную активность штаммов оценивали по наличию зоны ингибирования роста чувствительного штамма *S. cerevisiae* Кахури 7 (I-280) [16]. Киллер-контролем служил штамм *S. cerevisiae* Раса 47-К (I-527). Односуточные культуры клеток исследуемых штаммов высевали на чашку Петри с газоном чувствительного штамма и инкубировали при 28 °C. По истечению 48 ч оценивали рост штаммов и наличие зон лизиса.

Результаты и их обсуждение

Первоначально 752 отвитых колоний дрожжей были подвергнуты скринингу с целью отбора

штаммов для дальнейших испытаний. На основании морфологической картины было отобрано 98 изолятов дрожжей по следующим характеристикам: клетки округлой, яйцевидной и овальной формы; размер клеток в диапазоне 4–9 мкм; при спорообразовании образуют аски с 1–4 гладкими круглыми спорами.

В результате проведенного исследования видовой принадлежности отобранных изолятов дрожжей все дрожжи были отнесены к виду *S. cerevisiae*.

Подходящая стратегия отбора всегда зависит от характеристик, которыми должен обладать штамм для виноделия, и количества штаммов, подлежащих скринингу [17].

В нашем исследовании энологические обобщенные характеристики 98 местных штаммов *S. cerevisiae* представлены в таблице. Среди исследованных штаммов киллер-положительных обнаружено 4 штамма, что требует дальнейшего поиска штаммов с данной способностью, так как это дает дрожжам в виноделии значительное преимущество над чувствительными штаммами [18] и даже над бактериями [19].

Присутствие сероводорода в вине в количестве, превышающим порог чувствительности, приводит к появлению нежелательных оттенков во вкусе и аромате, оценка способности исследуемых штаммов дрожжей к синтезу данного вещества является необходимой. Так, из 98 исследованных штаммов высокая и средняя способность к синтезу сероводорода была обнаружена у 47 штаммов, остальные его не синтезировали или образовывали в незначительных количествах. Оценка штаммов по способности к синтезу уксусной

кислоты показала, что 67 штаммов обладали данной особенностью.

Исследование дрожжей по способности развиваться в присутствии диоксида серы показывают, что дрожжи могут расти в присутствии 300 мг/л диоксида серы [21–22]. Оценка исследуемых дрожжей показала, что в присутствии 200 мг/л диоксида серы отсутствовал рост у 2 штаммов. Слабую устойчивость, рост на 5-е сутки, наблюдали у 6 штаммов, остальные штаммы начинали развитие к концу вторых суток культивирования.

Исследование устойчивости к этиловому спирту показало, что все штаммы способны развиваться в присутствии 10 % об, однако при повышении концентрации до 12 % об, отсутствие роста было отмечено у 29 штаммов. Дальнейшее повышение концентрации спирта до 14 % об. остановило развитие у 46 штаммов. Учитывая, что способность развиваться в присутствии этилового спирта является важной характеристикой дрожжей, позволяющей им сбрасывать большее количество сахаров виноградного сусла без риска остановки брожения [20, 22], исследуемые штаммы требуют дополнительной селекционной работы, направленной на усиление спиртоустойчивости. Что касается устойчивости к pH, то из всех исследованных штаммов дрожжей только 5 не развивались при pH 2,6.

Низкие температуры являются одним из важнейших стрессовых факторов, влияющих на развитие дрожжей. Производство вина при более низких температурах способствует получению свежих вин с более фруктовым ароматом, мягким вкусом и выверенным балансом [23–25]. Это происходит в основном за счет изменения метаболизма дрожжей, что с одной стороны приводит к снижению синтеза негативно влияющих на вкус и аромат таких веществ, как уксусная кислота, а с другой – приводит к повышению содержания этилового спирта [26–27]. Исследование способности дрожжей развиваться при температуре 10 °C показало, что 41 штамм не показал роста при данной температуре.

Исследование способности роста дрожжей при высоких температурах показало, что среди изученных штаммов только 9 из них были не способны развиваться при температуре 37 °C.

Выводы

Стратегия, использованная в данном исследовании, подходит для быстрого отбора перспективных штаммов *S. cerevisiae* и может снизить трудозатраты и повысить эффективность работы. В результате проведенного исследования технологических свойств 98 природных штаммов дрожжей-сахаромицетов несколько штаммов дрожжей показали превосходные характеристики и потен-

Таблица. Сводная характеристика технологических показателей исследуемых дрожжей

Table. Summary characteristics of technological parameters of the studied yeasts

Технологическая характеристика	Количество штаммов
Киллер фактор положительный	4
отрицательный	94
Синтез сероводорода средний и сильный	47
слабый/отсутствует	51
Синтез летучих кислот присутствует	67
отсутствует	31
Устойчивость к pH 2,6 устойчивый	93
неустойчивый	5
Спиртовыносливость 10% об.	98
12% об.	69
14% об.	52
Холодостойкость, рост при 10 °C положительный	57
отрицательный	41
Термостойкость, рост при 10 °C положительный	89
отрицательный	9

циал для использования в процессе виноделия. Эти штаммы *S. cerevisiae* будут испытаны в качестве стартовых культур в условиях микровиноделия. Кроме того, в настоящее время проводится дальнейшая селекционная работа и изучение ферментационных характеристик, что поможет в дальнейшем отборе лучших местных штаммов для применения в качестве стартовых культур.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZM-2024-0001.

Financing source

The work was conducted under public assignment No. FZNM-0024-0001.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы / References

1. Querol A., Pérez-Torrado R., Alonso-Del-Real J., Minebois R., Stribny J., Oliveira B.M., Barrio E. New trends in the uses of yeasts in oenology. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2018;85:177-210. DOI 10.1016/bs.afnr.2018.03.002.
2. Drappier J., Thibon C., Rabot A., Geny-Denis L. Relationship between wine composition and temperature: impact on Bordeaux wine typicity in the context of global warming. *Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59:14-30. DOI 10.1080/10408398.2017.1355776.
3. Crépin L., Nidelet T., Sanchez I., Dequin S., Camarasa C. Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78:8102-8111. DOI 10.1128/AEM.02294-12.
4. Varela C., Torrea D., Schmidt S.A., Ancin-Azpilicueta C., Henschke P.A. Effect of oxygen and lipid supplementation on the volatile composition of chemically defined medium and Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*. 2012;135:2863-2871. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.06.127.
5. Schmidt S.A., Dillon S., Kolouchova R., Henschke P.A., Chambers P.J. Impacts of variations in elemental nutrient concentration of Chardonnay musts on *Saccharomyces cerevisiae* fermentation kinetics and wine composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;91:365-375. DOI 10.1007/s00253-011-3197-3.
6. Rodríguez M.E., Origone A.C., Flores M.G., Lopes C.A. *Saccharomyces* in traditional and industrial fermentations from Patagonia. *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*. Springer. 2016:1-360. DOI 10.1007/978-3-319-42801-7.
7. Fairbairn S., McKinnon A., Musarurwa H.T., Ferreira A.C., Bauer F.F. The impact of single amino acids on growth and volatile aroma production by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:1-12. DOI 10.3389/fmicb.2017.02554.
8. Su Y., Origone A.C., Rodríguez M.E., Querol A., Guillamon J.M., Lopes C.A. Fermentative behaviour and competition capacity of cryotolerant *Saccharomyces species* in different nitrogen conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2019;291:111-120. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.020.
9. Hohmann S., Mager W.H. *Yeast stress responses*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 2003:1-398.
10. Rollero S., Bloem A., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Divol B. Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences. *FEMS Yeast Res*. 2018;18:1-11. DOI 10.1093/femsyr/foy055.
11. Seguinot P., Bloem A., Brial P., Meudec E., Ortiz-Julien A., Camarasa C. Analyzing the impact of the nature of the nitrogen source on the formation of volatile compounds to unravel the aroma metabolism of two non-*Saccharomyces* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2020;316:1-12. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108441.
12. Cordente A.G., Schmidt S., Beltran G., Torija M.J., Curtin C.D. Harnessing yeast metabolism of aromatic amino acids for fermented beverage bioflavouring and bioproduction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103:4325-4336 DOI 10.1007/s00253-019-09840-w.
13. Бурьян Н.И. *Практическая микробиология виноделия*. Симферополь: Таврида. 2003:1-560.
14. Buryan N.I. *Practical microbiology of winemaking*. Simferopol: Tavrida. 2003:1-560 (in Russian).
15. Muir A., Harrison E., Wheals A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Res*. 2011;11:552-563. DOI 10.1111/j.1567-1364.2011.00745.x.
16. Jiranek V., Langridge P., Henschke P.A. Validation of bismuth-containing indicator media for predicting H₂S-production potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under enological conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1995;46:269-273. DOI 10.5344/ajev.1995.46.2.269.
17. Petering J.E., Symons M.R., Langridge P., Henschke P.A. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces wine* yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;57:3232-3236. DOI 10.1128/AEM.57.11.3232-3236.1991.
18. Schuller D., Casal M. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;68:292-304. DOI 10.1007/s00253-005-1994-2.
19. El Dana F., Hayar S., Alexandre H. Killer yeast in winemaking: A comprehensive review. *Food Bioscience*. 2025;73:107631. DOI 10.1016/j.fbio.2025.107631.
20. Viljoen B.C. Yeast ecological interactions. *Yeast'Yeast, Yeast'Bacteria, Yeast'Fungi interactions and yeasts as biocontrol agents*. Yeasts in Food and Beverages. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 2006:1-453.
21. Feng L., Jia H., Wang J.M., Qin Y., Liu Y.L., Song Y.Y. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking in northwest China. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2019;70:115-126. DOI 10.5344/ajev.2018.18035.
22. Liu J., Li R., Li Y., Sun Y. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains with good oenological and aroma characteristics for winemaking in Ningxia China. *Food Chemistry: X*. 2024;23:101693. DOI 10.1016/j.fochx.2024.101693.
23. Suranska H., Vranova D., Omelkova J. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016;47:181-190. DOI 10.1016/j.bjm.2015.11.010.
24. Mora M., Dupas de Matos A., Vazquez-Araújo L., Puente V., Hernando J., Chaya C. Exploring young consumers attitudes

- and emotions to sensory and physicochemical properties of different red wines. *Food Research International*. 2021;143:110303. DOI 10.1016/j.foodres.2021.110303.
24. Gamero A., Tronchoni J., Querol A., Belloch C. Production of aroma compounds by cryotolerant *Saccharomyces species* and hybrids at low and moderate fermentation temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;114:1405-1414. DOI 10.1111/jam.12126.
25. Molina A.M., Swiegers J.H., Varela C., Pretorius I.S., Agosin E. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;77:675-687. DOI 10.1007/s00253-007-1194-3.
26. Beltran G., Novo M., Leberre V., Sokol S., Labourdette D., Guillamon J.M., Mas A., François J., Rozes N. Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Research*. 2006;6:1167-1183. DOI 10.1111/j.1567-1364.2006.00106.x.
27. Tronchoni J., Rozes N., Querol A., Guillamon J.M. Lipid composition of wine strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;155:191-198. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.0.

Информация об авторах

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

Наталия Юрьевна Луткова, мл. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-мэйл: magarach_microbiol.lab@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8126-7596>;

Карина Александровна Семенова, аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории микробиологии; e-мэйл: karina.semenova.2013@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0271-1290>;

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

Валентина Ивановна Загоруйко, вед. инженер лаборатории микробиологии; e-мэйл: valya.yalta64@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-7450-292X>.

Information about the authors

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

Natalia Yu. Lutkova, Junior Staff Scientist, Laboratory of Microbiology; e-mail: magarach_microbiol.lab@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8126-7596>;

Karina A. Semenova, Postgraduate, Junior Staff Scientist, Laboratory of Microbiology; e-mail: karina.semenova.2013@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0271-1290>;

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>;

Valentina I. Zagoruiko, Leading Engineer, Laboratory of Microbiology; e-mail: valya.yalta64@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0002-7450-292X>.

Статья поступила в редакцию 15.10.2025, одобрена после рецензии 30.10.2025, принята к публикации 20.11.2025.