

УДК 663.1 : 663. 252

03.00.00 Биологические науки

**ВИДОВОЕ МНОГООБРАЗИЕ
МИКРОФЛОРЫ НА ЯГОДАХ ВИНОГРАДА**

Агеева Наталья Михайловна
д-р техн. наук, профессор
главный научный сотрудник НЦ «Виноделие»
e-mail: ageyeva@inbox.ru

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук, зав. лабораторией генетики и
микробиологии

Прах Антон Владимирович
старший научный сотрудник НЦ «Виноделие»
*Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Северо-Кавказский
зональный научно-исследовательский
институт садоводства и виноградарства»,
Краснодар, Россия*

Во многих винодельческих странах на ягодах винограда идентифицировано большое разнообразие микроорганизмов. Это дрожжи различных семейств, видов и родов, бактерии, плесневые грибы. В статье представлены результаты исследования видового состава микрофлоры ягод белых и красных сортов винограда, произрастающего в различных хозяйствах Краснодарского края и Республике Абхазия. Для выявления всего спектра дрожжей проводили посеы на элективные среды. Выросшие колонии после предварительного микроскопирования выделяли в культуры и подвергали тестированию по культурально-морфологическим признакам, руководствуясь определителями и пособиями. Установлено видовое разнообразие микрофлоры на поверхности ягод винограда всех исследованных сортов, независимо от места их произрастания. Полученные данные показали, что группа дрожжей, постоянно присутствующая в комплексе эпифитных микроорганизмов винограда-*Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora* была характерна для всех сортов винограда во всех исследованных регионах. Показана гетерогенность таксонометрического состава микрофлоры. Преобладали дрожжи семейства *Saccharomycetaceae*, вид *Saccharomyces vini*. Количество дрожжей *Saccharomyces vini* уменьшается в ряду Мысхако > Кавказ > Фанагория, что в целом согласуется с климатическими условиями. Только на сорте винограда Пино нуар идентифицированы дрожжи *Brettanomyces Dekkera*. На ягодах сортов винограда Каберне и Карабурну обнаружены дрожжи *Schisosaccharomyces acidodevoratus*, вызывающие кислотопонижение. На ягодах

UDC 663.1 : 663. 252

Biology

**VARIETY OF MICROORGANISMS GROUPS
LIVING ON BERRIES OF GRAPES**

Ageeva Natalia Mikhailovna
Dr.Sci.Tech., professor, Chief Research Associate
of SC "Wine-making"
e-mail: ageyeva@inbox.ru

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci., Head of Laboratory of Genetics and
Microbiology

Prakh Anton Vladimirovich
senior Research Associate of SC "Wine-making"
*Federal State Budget Scientific
Organization "North Caucasian
Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture",
Krasnodar, Russia*

The wide variety of microorganisms has been identified in many wine-making countries on the berries of grapes. These are yeasts of different families, forms and kinds, bacterium, mold fungi. In the article, we present the results of investigating species composition of microflora of berries of white and red types of grape, which grows in different economies of the Krasnodar region and the republic of Abkhaziya. The sowings onto the elective media were conducted for the development of entire spectrum of yeast. The grown colonies after preliminary microscoping were separated into the cultures and subjected to testing according to the cultural-morphological signs, being guided by determinants and benefits. It was established the specific variety of microflora on the surface of the berries of grapes of all investigated types, without dependence on the place of their growth. Obtained data showed that the group of yeast, which constantly is present in the complex of the epiphytic microorganisms of grapes of *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Hanseniaspora* was characteristic for all types of grapes in all investigated regions. The heterogeneity of the taxonomic composition of microflora is shown. Prevalent yeasts were of family *Saccharomycetaceae*, form *Saccharomyces vini*. A quantity of yeast of *Saccharomyces vini* decreases in a number of Мысхако-Caucasus-Fanagoriya, that as a whole will be coordinated with the climatic conditions. Only the type of Pinot nuar grapes had yeasts of *Brettanomyces Dekkera*. On the berries of Cabernets and Karaburnu we have discovered yeasts of *Schisosaccharomyces acidodevoratus*, causing acid-reduction. On the berries of the grapes, which grew in joint stock company APF "Fanagoriya" we haven't revealed the presence of lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* and yeasts of the form of *Schisosaccharomyces acidodevoratus*. In

винограда, произраставшего в ОАО АПФ «Фанагория» не выявлено наличие молочнокислых бактерий *Lactobacillus brevis* и дрожжей вида *Schisosaccharomycetes acidodevoratus*. В этом же хозяйстве отмечено наименьшее количество дрожжей-вредителей видов *Pichia* и *Candida*. В микрофлоре винограда сортов винограда Каберне, Рислинг и, особенно, Карабурну, представлены молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus brevis*. *Lactobacillus plantarum*. Среди бактерий общее количество кокковой флоры составляет - 56 %, палочковидной - 44 %. Идентифицированы два вида жизнедеятельных уксуснокислых бактерий – *Acetobacter aceti* и *Acetobacter xelinum*. Особенно высокой была их концентрация на поверхности ягод винограда сорта Качич

the same farm the smallest quantity of yeasts-wreckers is noted, which we the forms of *Pichia* and *Candida*. In the microflora of Cabernets, Risling and, especially, Karaburnu grapes, we have found lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis*. *Lactobacillus plantarum*. Among the bacteria the total quantity of coccic flora composes - 56 %, the rod-shaped - 44 %. Two types of active acetous bacteria are identified – *Acetobacter aceti* and *Acetobacter xelinum*. Especially high was their surface concentration on the berries of Kachich type of grapes

Ключевые слова: МИКРОФЛОРА ВИНОГРАДА, ДРОЖЖИ, СЕМЕЙСТВО, РОД, ВИД ДРОЖЖЕЙ

Keyword: MICROFLORA OF GRAPES, YEAST, FAMILY, KIND, VARIETY OF YEAST

Введение. Значение дрожжей в винодельческом производстве определяется их участием во всех стадиях приготовления вин: это спиртовое брожение сахаров виноградного сусла, автолитические процессы при контакте виноматериалов с дрожжевой биомассой, дрожжевые помутнения и т.п. Во многих винодельческих странах на ягодах винограда обнаружено большое разнообразие дрожжей среди которых наибольший интерес для виноделия представляют виды *Sacch. vini* и *Sacch. oviformis*. Основным местом их обитания являются фруктовые и ягодные насаждения, ягоды, плоды, соки, подвалы, сбраживаемые субстраты. Анализ литературных источников [1,2] свидетельствует о том, что мельчайшие размеры клеток дрожжей позволяют им неограниченно расселяться и находить благоприятные микрзоны в любой достаточно гетерогенной среде, в среднем характеризующейся неподходящими условиями для данного вида. Вместе с тем, особенности распространения организмов зависят и от климатических условий, которые закономерно изменяются по географической широте.

В связи с этим **цель работы** – исследование состава микрофлоры в зависимости от региона произрастания винограда.

Объекты и методы исследований. В качестве объектов исследований использовали красные и белые сорта винограда, произрастающие в Темрюкском (ОАО АПФ «Фанагория»), Анапском (ЗАО «Кавказ»), Новороссийском (ЗАО «Мысхако») районах, а также в Республике Абхазия. Исследования проводили в течение пяти лет. Пробы исследуемых сортов были отобраны из пластмассовых контейнеров, в которых сырье доставлялось на завод. Ягоды винограда были сухими, внешних признаков повреждения или болезни не выявлено.

Выделение микроорганизмов проводили путем последовательного посева на элективные среды. Чтобы выделить и идентифицировать микроорганизмы, брали 1 см³ пробы и высевали ее на стерильные жидкие питательные среды быстро над пламенем горелки. По окончании посева посуду немедленно закрывали обожженной пробкой. Через 7 суток оценивали происходящие изменения исследуемых образцов на жидких питательных средах по внешнему виду и микробиологическому состоянию клеток [1].

С жидкой питательной среды микроорганизмы пересеивали на плотные питательные среды: виноградное сусло с агар – агаром и желатином. Штрих с культурой по агару наносили в виде прямой или зигзагообразной полосы для выращивания посева выдерживали в термостате при температуре 25-28°С в течение 3-6 суток. Выросшие изолированно колонии после предварительного микроскопирования выделяли в культуры и подвергали диагностическому тестированию по культурально-морфологическим признакам, согласно которым проводили идентификацию дрожжей, руководствуясь определителями и пособиями [1,3,4].

Обсуждение результатов. В таблице 1 представлены данные о видовом разнообразии микроорганизмов на ягодах винограда, отобранного в ЗАО «Мысхако», ОАО АПФ «Фанагория» и ЗАО «Кавказ». Анализ полученных материалов исследований свидетельствует о разнообразии микроорганизмов на поверхности ягод винограда всех исследованных сортов, независимо от места их произрастания. Кроме перечисленных в таблице микроорганизмов, на всех исследованных сортах винограда, особенно, Карабурну идентифицированы два вида жизнедеятельных уксуснокислых бактерий – *Acetobacter aceti* и *Acetobacter xelinum*. При этом количество бактерий на ягодах Карабурну было в 2 раза больше, чем на ягодах Пино нуар и в 3 раза больше, чем на ягодах Рислинга.

Сопоставление полученных результатов (таблица 1) показало, что на исследованных пробах винограда присутствует большое разнообразие дрожжей и бактерий как благоприятных для винограда и вина, так и вредителей винодельческого производства, способных при попадании в виноматериал и возникших благоприятных условиях вызвать нежелательные процессы. Установлено, что таксонометрический состав микрофлоры был гетерогенен, но наибольшую долю на всех сортах винограда составляют дрожжи семейства *Saccharomycetaceae*, вид *Saccharomyces vini*.

Таблица 1 - Состав микрофлоры исследуемых сортов винограда

Вариант	Семейство, класс	Род, вид	Количество, %		
			Мыс-хако	Кавказ	Фанагория
Пино нуар	Saccharomycetaceae	Saccharomyces vini	82,0	80,6	76,4
		Saccharomyces uvarum	3,8	3,4	3,0
		Saccharomyces bayanus	0,8	1,6	1,5
		Saccharomyces chodati	0,1	0,1	0,1
		Pichia Hansen	2,0	2,0	1,3
		Hansenula Sydow	0,2	нет	0,3
	Сруптососсаеae, подсемейство	Candida	0,1	0,1	0,1
	Сруптососсоидеae	Hanseniaspora apiculata	0,2	0,2	0,15
		Debaryomyces Dekkeri (Torulopsis)	0,4	0,4	0,2
		Brettanomyces Dekkera	0,8	0,4	1,2
	Phycomycetes	Mucor, Aspergillus	3,2	2,8	2,6
Рислинг	Saccharomycetaceae	Saccharomyces vini	93,8	92,0	90,4
		Saccharomyces bayanus	0,8	0,8	1,2
		Lactobacillus plantarum гомоферментативные бациллы	0,6	0,5	0,6
		Lactobacillus brevis гетероферментативные бациллы	0,6	0,6	0,6
		Hansenula Sydow	0,3	0,3	0,2
Каберне-Совиньон	Saccharomycetaceae	Saccharomyces vini	86,2	85,8	84,0
		Saccharomyces bayanus	0,6	0,6	0,8
		Lactobacillus plantarum	0,6	0,6	0,6
		Lactobacillus brevis	0,7	0,5	нет
	Кл. Ascomycetes	Aspergillus	0,4	0,3	0,1
	Schisosaccharomycetaceae	Schisosaccharomyces acidodevoratus	0,3	0,3	нет
Карабурну	Saccharomycetaceae	Saccharomyces vini	88,6	85,2	83,8
		Pichia	0,56	0,34	0,26
		Candida	0,50	0,56	0,32
		Mucor	0,1	0,1	0,1
		Lactobacillus plantarum	0,4	0,4	0,4
		Lactobacillus brevis	0,3	0,4	нет
	Кл. Ascomycetes	Aspergillus	0,4	0,3	0,2
Schisosaccharomycetaceae	Schisosaccharomyces acidodevoratus	1,4	1,2	нет	

Однако, количество этих дрожжей существенно изменялось в зависимости от сорта винограда и места его произрастания. На винограде Пино нуар обнаружены *Saccharomyces uvarum* (схожие с *Saccharomyces vini*, но отличающиеся от них по ряду физиологических и биохимических показателей), *Saccharomyces bayanus* (частично отличающиеся по физиологическим и биохимическим показателям от *Saccharomyces vini*, в частности по потреблению мезоинозита и синтезу глицерина), *Saccharomyces chodatii*. Только на сорте винограда Пино нуар идентифицированы дрожжи *Brettanomyces Dekkera*, которые по данным [6] могут вызвать нарушение товарного вида и розливостойкости виноматериалов.

Винные дрожжи в составе микрофлоры винограда сорта Пино нуар представлены также *Pichia Hansen*, *Hansenula Sydow* (окисляющие этанол и образующие уксусную кислоту, вызывающие болезни вин), *Candida* (образующие «цвель» вина), *Hanseniaspora apiculata* (приводят к повышению количества летучих кислот), *Debaryomyces Dekker*, *Torulopsis* (способствующие заброживанию), *Brettanomyces Dekkera* (производящие ацетамид, этилацетат, участвующие в формировании горечи).

В микрофлоре винограда сортов винограда Каберне, Рислинг и, особенно, Карабурну, представлены молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus brevis*. *Lactobacillus plantarum* – это гомоферментативные бациллы - возбудители яблочно-молочного брожения. *Lactobacillus brevis* – гетероферментативные бациллы, состав продуктов жизнедеятельности которых зависит от физико-химических параметров среды и может носить как положительный, так и отрицательный характер на органолептические свойства виноматериалов.

На исследованных пробах винограда Каберне и Карабурну обнаружены дрожжи *Schisosaccharomyces acidodevoratus*, отличающиеся

повышенной способностью к забраживанию и биологическому кислотопонижению за счет сбраживания яблочной кислоты.

Сравнивая влияние места произрастания винограда на количество отдельных видов микроорганизмов, можно отметить следующее. Количество дрожжей *Saccharomyces vini* уменьшается в ряду Мысхако > Кавказ > Фанагория, что в целом согласуется с климатическими условиями. В то же время на ягодах винограда, произраставшего в ОАО АПФ «Фанагория» не выявлено наличие молочнокислых бактерий *Lactobacillus brevis* и дрожжей вида *Schisosaccharomyces acidodevoratus*. В этом же хозяйстве отмечено наименьшее количество дрожжей-вредителей видов *Pichia* и *Candida*.

В таблице 2 представлены данные о видовом составе микрофлоры на ягодах винограда, произрастающего в Республике Абхазия. Для сравнения в качестве объекта исследований был выбран аборигенный сорт винограда Качич, способный накапливать до 5 г/дм³ фенольных соединений [6].

Анализ полученных данных (таблица 2) показал, что во всех образцах красных сортов винограда преобладали дрожжи семейства *Saccharomycetaceae*, род *Saccharomyces vini* – 93,8 %. В некоторых образцах (Каберне-Совиньон, Каберне фран, Качич) были идентифицированы дрожжи рода *Saccharomyces bayanus* – 0,77 %, а на ягодах сорта винограда Качич - дрожжи рода *Saccharomyces uvarum* – 1,93 %. Это спорогенные дрожжи, имеющие большое значение в бродильной промышленности. Обладая высокой активностью дыхания и брожения, хорошей способностью к размножению, они быстро становятся доминирующими в брожении вина, придают ему характерный букет, вкус, определяют состав [6,7]. На поверхности ягод идентифицированы спутники винных дрожжей (дикие дрожжи), в том числе: *Pichia Hansen* (Качич) – 2,26 %; *Pichia* (Гаме черный, Мерло) – 0,56 % - 0,63 % соответственно; *Hansenula Sydow* (Качич, Каберне фран) – 0,21 % - 0,3 %;

Candida (Качич, Гаме, Мерло) – 0,12 % - 0,50 % - 0,28 %, *Hanseniaspora apiculata* (Качич) – 0,31 %, *Debaryomyces Dekkeri* (*Torulopsis*) (Качич, Гаме, Мерло) – 0,43 % - 0,42 % - 0,28 %, *Brettanomyces Dekkera* (Качич, Гаме, Мерло) – 0,87 % - 0,68 % - 0,54% - это вредители винодельческого производства, вызывающие заболевания виноматериалов и вин, возбудители вторичного брожения и помутнения вин.

Таблица 2 – Видовой состав микрофлоры винограда, произрастающего в Республике Абхазия

Вид	Сорт винограда						
	Качич	Каберне-Фран	Каберне-Совиньон	Гаме	Мерло	Рислинг	Совиньон
<i>Saccharomyces vini</i>	88,46	93,80	86,25	88,6	86,6	92,3	91,5
<i>Saccharomyces uvarum</i>	1,93	-	-	-	-	1,12	0,66
<i>Saccharomyces bayanus</i>	0,80	0,87	0,62	-	-	0,68	1,06
<i>Saccharomyces chodati</i>	0,13	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia Hansen</i>	2,26	-	-	0,56	0,63	0,75	0,56
<i>Hansenula Sydow</i>	0,21	0,3	-	-	-	0,12	0,08
<i>Candida</i>	0,12	-	-	0,50	0,28	0,37	0,30
<i>Mucor</i>	-	-	-	-	0,13	0,12	0,12
<i>Hanseniaspora apiculata</i>	0,31	-	-	-	-	0,06	0,03
<i>Debaryomyces Dekkeri</i> (<i>Torulopsis</i>)	0,43	-	-	0,42	0,28	0,23	0,18
<i>Brettanomyces Dekkera</i>	0,87	-	-	0,68	0,54	0,14	0,17
<i>Muccor</i>	3,20	-	-	-	-	0,1	0,1
<i>Aspergillus</i>	-	-	0,43	0,42	0,42	0,1	0,1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	0,68	0,35	0,84	-	1,02	1,16
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	0,64	0,75	0,35	0,36	0,68	0,87
<i>Schisosaccharomyces acidodevoratus</i>	-	-	0,38	-	1,39	0,32	0,38

Они образуют большое количество уксусноэтилового эфира, окисляют спирты и органические кислоты до CO₂ и H₂O, влияя отрицательно на качество вина. Дрожжи указанных видов сбраживают сахара, потребляя их преимущественно путем окисления [8].

На поверхности ягод сортов Каберне фран, Каберне-Совиньон, Гаме, Мерло в незначительном количестве идентифицированы гетеро- и гомоферментативные молочнокислые бактерии *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, являющиеся возбудителями нежелательного молочного скисания вин: их развитие приводит к увеличению титруемой и летучей кислотности, разрушению винной кислоты, альдегидов, глицерина и других веществ, что приводит к образованию квашеных тонов.

Состав микрофлоры ягод белых сортов винограда более разнообразен, в сравнении с красными. Только дрожжи вида *Saccharomyces chodatii* не выявлены на ягодах Рислинга и Совиньона.

Кроме перечисленных в таблице микроорганизмов, на винограде идентифицированы два вида жизнедеятельных уксуснокислых бактерий – *Acetobacter aceti* и *Acetobacter xelinum*. Особенно высокой была их концентрация на поверхности ягод винограда сорта Качич.

Полученные результаты показали, что среди бактерий общее количество кокковой флоры составляет - 56 %, палочковидной - 44 %.

Заключение. Таким образом, идентификация состава микрофлоры показала, что во всех образцах ягод винограда, независимо от места его произрастания, присутствуют микроорганизмы как положительно влияющие на органолептические особенности виноматериала и качества вина, так и микроорганизмы, ухудшающие химический состав виноматериалов. Эти материалы должны быть учтены при разработке способов брожения и новых наименований продукции из указанных сортов винограда, так как при "мягких" режимах сульфитации возможно развитие микроорганизмов-вредителей вина. Наличие среди естественного разнообразия эпифитов виноградного растения дрожжей-сахаромицетов, в том числе видов *Saccharomyces vini*, позволит провести поиск потенциально-перспективных штаммов, представляющих интерес в качестве ресурсов пищевой биотехнологии. Полученные результаты могут

быть основой для дальнейших исследований генетического разнообразия микроорганизмов винограда или генетического полиморфизма.

Литература

1. Бурьян, Н.И. Практическая микробиология виноделия /Н.И.Бурьян // Симферополь: Таврида, 2003.– 559 С.
2. Рибери–Гайон, Ж. Теория и практика виноделия. Характеристика вин. Созревание винограда. Дрожжи и бактерии / Ж. Рибери–Гайон, Э. П. Пейно, П. Рибери–Гайон, П. Сюдро. Пер. с франц., под ред. Г. Г. Валушко // М.: Пищ. пром–сть, 1979.– 352 С.
3. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей /И.П.Бабьева, В.И.Голубев // М.: Пищевая пром–сть.- 1979. - 116с.
4. Квасников, Е. И. Дрожжи. Биология. Пути использования / Е.И.Квасников, И.Ф.Щелокова // Киев: Наукова думка, 1991. – 324 С.
5. Тюрина, Л. В. Метод определения фенотипов дрожжей рода *Saccharomyces* для контроля брожения на чистых культурах / Л.В.Тюрина, Н.И.Бурьян // Виноделие и виноградарство СССР. – 1974. – № 8. – С. 24–26
6. Загоруйко, В.А. Обнаружение и идентификация штаммов дрожжей рода *Brettanomyces* / В.А.Загоруйко, И.Ф.Ткачев, Т.К.Скорикова, И.В.Черноусова, В.Г.Гержилова и др.// Магарач. Виноградарство и виноделие, 2007.- №3.- с.20-23.
7. Гублия, Р.В. Совершенствование технологии красных столовых вин в Республике Абхазия /Автореф. дисс...канд. техн. наук. – Краснодар: 2012. -24 с.
8. Gechev T., Willekens H., van Montagu M., Inzé D., van Camp W., Toneva V., Minkov I. Different Responses of Tobacco Antioxidant Enzymes to Light and Chilling Stress // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 509-515.

References

1. Bur'yan, N.I. Prakticheskaya mikrobiologiya vinodeliya /N.I.Bur'yan // Simferopol': Tavrida, 2003.– 559 S.
2. Ribero–Gajon, ZH. Teoriya i praktika vinodeliya. Harakteristika vin. Sozrevanie vinograda. Drozhzhi i bakterii / ZH. Ribero–Gajon, EH. P. Pejno, P. Ribero–Gajon, P. Syudro. Per. s franc., pod red. G. G. Valujko // M.: Pishch. prom–st', 1979.– 352 S.
3. Bab'eva, I.P. Metody vydeleniya i identifikacii drozhzhej /I.P.Bab'eva, V.I.Golubev // M.: Pishchevaya prom–st'.- 1979. - 116s.
4. Kvasnikov, E. I. Drozhzhi. Biologiya. Puti ispol'zo–vaniya / E.I.Kvasnikov, I.F.SHCHELokova // Kiev: Naukova dumka, 1991. – 324 C.
5. Tyurina, L. V. Metod opredeleniya fenotipov drozhzhej roda *Saccharomyces* dlya kontrolya brozheniya na chistyh kul'turah / L.V.Tyurina, N.I.Bur'yan // Vinodelie i vinogradarstvo SSSR. – 1974. – № 8. – S. 24–26
6. Zagorujko, V.A. Obnaruzhenie i identifikaciya shtammov drozhzhej roda *Brettanomyces* / // V.A.Zagorujko, I.F.Tkachev, T.K.Skorikova, I.V.SChernousova, V.G.Gerzhikova i dr.// Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie, 2007.- №3.- s.20-23.
7. Gubliya, R.V. Sovershenstvovanie tekhnologii krasnyh stolovyh vin v Respublike Abhaziya /Avtoref. diss...kand. tekhn. nauk. – Krasnodar: 2012. -24 s.
8. Gechev T., Willekens H., van Montagu M., Inzé D., van Camp W., Toneva V., Minkov I. Different Responses of Tobacco Antioxidant Enzymes to Light and Chilling Stress // J. Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 509-515.