

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОГО МЕТОДА ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ГРИБОВ РОДА *BRETTANOMYCES* ИЗ ВИН.

Порча вина может быть вызвана разными родами и типами диких дрожжей. Одним из самых вредоносных микроорганизмов являются дрожжи рода *Brettanomyces* / *Dekkera*. Своевременное обнаружение и количественная оценка этих грибов необходимы для предотвращения порчи вина. Обнаружение дрожжей в сырых виноматериалах проводилось классическими микробиологическими методами. Потенциал микробиологического мониторинга вина был изучен с целью оптимизации процесса анализа. В результате исследований вин, произведенных в Отделе микровинификации Департамента Энологии ФПТ ТУМ, были оценены преимущества и недостатки «золотого стандарта» микробиологии, культурного метода для выделения дрожжей рода *Brettanomyces* / *Dekkera*.
Ключевые слова: *Brettanomyces*, вино, культивирование, питательные среды.

Введение

Винодельческая отрасль традиционно считается основной и в определенном смысле стратегической отраслью Республики Молдова. Она является важным источником прямых и косвенных доходов для значительной части населения страны. В условиях сложной экономической ситуации в стране, винные заводы прилагают значительные усилия для переориентации и диверсификации своего экспорта. В этом контексте основной задачей является производство вин, конкурентоспособных на зарубежных рынках. Вина подвержены химической и микробиологической порче, и дрожжи рода *Brettanomyces* или их телеоморф *Dekkera* часто являются причинами этих проблем, особенно в красных винах, образуя этилфенолы и другие соединения с неприятным запахом, который обычно называют фенольным, лекарственным или животным (запах скотного двора, конского пота, кожи). В связи с этим высокую актуальность приобретает использование современных, быстрых и эффективных методов анализа для тестирования качества вин. Наше исследование было направлено на определение присутствия этих дрожжей в красных винах с помощью классического микробиологического метода, «золотого стандарта» микробиологии – бакпосева. Изоляты *Brettanomyces*/ *Dekkera* определяли количественно путем посева образцов сухого красного вина в селективные питательные среды.

I. Микробиологическая характеристика дрожжей рода *Brettanomyces*

1.1. Систематика и номенклатура

В настоящее время систематика включает в себя пять видов дрожжей в пределах рода *Brettanomyces*: *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. naardenensis* и *B. nanus*. Для них характерно бесполое размножение - форма анаморфа. Для первых двух видов существуют также телеоморфы - штаммы, размножающиеся половым путем: *Dekkera bruxellensis* и *Dekkera anomalus* [1].

1.2. Морфобиологическая характеристика.

Дрожжи рода *Brettanomyces* представляют собой грамположительные эллиптические, цилиндрические, продолговатые клетки, часто стрелозаостренные с одного конца. Некоторые штаммы имеют удлиненные клетки, чаще соединенные по две и более. Спор не образуют. В благоприятных условиях, особенно в жидких питательных средах, большинство штаммов демонстрируют тенденцию к формированию псевдомицелия [2]. Наблюдаются вакуоли и грануляция. Почкование двустороннее и множественное.

1.3. Культуральные свойства.

Дрожжи рода *Brettanomyces* являются факультативными анаэробами. Размножаются очень медленно, первые признаки роста на питательной среде появляются не раньше 5-х суток [1]. В жидких питательных средах образуют осадок в виде хлопьев, могут формировать более или менее густые поверхностные пленки. На поверхности вина

большинство штаммов образует тонкую, гладкую, серовато-белую пленку [2]. На плотных питательных средах вырастают беловатые куполообразные колонии, часто похожие на капли сметаны (рис.1). Обычно они влажные и блестящие; края лопастные, слабовыраженные. Это классическое описание, но в зависимости от питательной среды и от возраста колонии они могут выглядеть иначе. [5].



Рисунок 1 - Колонии *Brettanomyces* в виде капель сметаны.

Плохо сбраживают сахара. Многие виды устойчивы к высоким концентрациям спирта. Способны разжижать желатин. В факторах роста не нуждаются, так как все виды *Brettanomyces* - прототрофы, они способны размножаться при полном отсутствии витаминов. Эти дрожжи можно неопределенно долго пересевать в неорганической среде, лишенной витаминов. Но в таких условиях скорость размножения дрожжей очень низкая и введение в питательную среду отдельных факторов роста оказывает на них положительное влияние. Оптимальная температура, для дрожжей *Brettanomyces* 25 - 32 °С. Они термофилы, при температуре ниже 12°С их рост в вине прекращается. В целом, рост клеток возможен в диапазоне 10 - 37 °С. [4]. Установлено, что в среде с повышенным уровнем растворенного кислорода дрожжи *Brettanomyces* могут использовать как глюкозу, так и этанол в качестве субстрата, синтезируя при этом уксусную кислоту [3]. Слабо аэробные условия способствуют наибольшему накоплению биомассы.

II. Материалы и методы.

В качестве исследуемого материала были взяты красные сухие вина, произведенные в Отделе микровинификации Департамента Энологии ТУМ из двух сортов винограда: Фетяска Нягрэ и Рара Нягрэ.

Методы выявления и идентификации дрожжей рода *Brettanomyces* можно разделить на микробиологические и молекулярные. Микробиологические методы включают бактериоскопию и культивирование на селективных и дифференциально-диагностических средах с последующим изучением морфологических данных и физиолого-биохимических характеристик.

2.1. Бактериоскопический метод: Для предварительной оценки состояния исследуемого материала перед посевом оценивают его морфологию. Для обнаружения дрожжевых клеток используют нативные и окрашенные препараты. Нативные препараты изучают в раздавленной капле с помощью фазово-контрастной микроскопии (рис. 2 а). Для этого на обезжиренное предметное стекло наносят каплю исследуемой жидкости и, при необходимости, добавляют каплю красителя. Накрывают каплю покровным стеклом так, чтобы между стеклами не было пузырьков воздуха, и жидкость не выступала за края покровного стекла. Изучают морфологические особенности микроорганизмов: форму и размеры клеток, характер размножения, наличие вакуолей и липидных включений. Другой способ - иммерсионная световая микроскопия. Для этого мазок окрашивают по Граму: на обезжиренное предметное стекло наносится капля исследуемой жидкости (суспензия культуры с питательной среды, супернатант и т.д.) После высыхания на открытом воздухе мазок фиксируется в пламени горелки и окрашивается в 4 этапа согласно инструкции. В результате в поле зрения будут хорошо видны грамположительные (фиолетового цвета) круглые или овальные клетки, удлинённые и разветвленные цепи псевдомицелия (рис.2 б). [5]

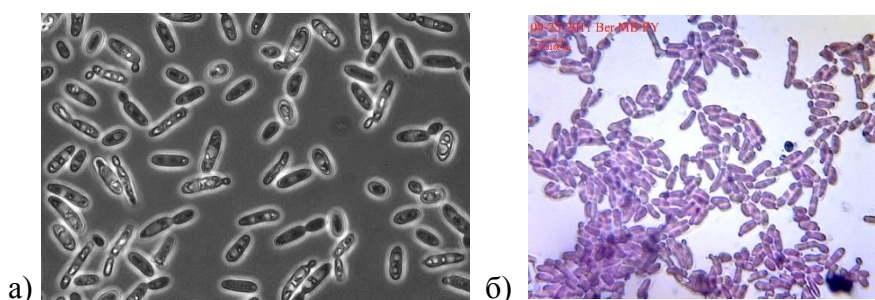


Рисунок 2 – Клетки дрожжей рода *Brettanomyces*.

а) фазово-контрастная микроскопия. б) окраска мазка по Граму.

2.2. Культуральный метод: Для выделения дрожжей рода *Brettanomyces* использовали следующие питательные среды: *Saburo 4% глюкозный агар*, *Malt Extract Agar Base* (Основа солодового агара), и *FastOrange™ Yeast Agar* (Агар для определения дрожжей). Посевы осуществлялись на поверхности питательных сред в чашках Петри. По 1,0 мл анализируемого образца, наносили на агар, распределяли равномерно стеклянным шпателем, подсушивали и инкубировали при оптимальной температуре 7 суток. После инкубации дрожжей проводили фенотипическую оценку и количественное определение колоний, которое осуществляли прямым подсчетом, затем их микроскопировали (рис.3).

III. Результаты и дискуссии

1. На *Sabouraud 4% Glucose Agar* культивировали дрожжи из двух типов вина: Фетяска Нягрэ и Рара Нягрэ. Из первого образца выросло 3×10 колоний дрожжей *Brettanomyces*. Колонии белого цвета, неправильной формы с округлой поверхностью и окантовкой. Во втором образце было обнаружено около 4×10 колоний дрожжей *Brettanomyces* с фенотипом, сходным с дрожжами из первого образца: белые, неправильной формы, с глянцевой поверхностью и округлыми краями (рис 3 а,б,в,г).

2. На *Malt Extract Agar Base* из вин Фетяска Нягрэ и Рара Нягрэ также выросли колонии дрожжей *Brettanomyces*. В первом образце выделено 3×10 колоний, во втором - 2×10 колоний. Фенотипические характеристики выделенных дрожжей были идентичными: белые колонии неправильной формы, блестящая поверхность и округлый край (рис.4 а,б,в,г)

3. На среде *Fast Orange™ Yeast Agar* из вина Фетяска Нягрэ было обнаружено 3×10 колоний, а из вина Рара Нягрэ выросло - 5×10 колоний. Фенотипические характеристики дрожжей так же соответствовали роду *Brettanomyces / Dekkera* (рис.5 а,б,в,г).

Основываясь на полученных результатах, удалось обнаружить, что агар *Sabouraud 4% Glucose Agar* является наиболее подходящей и удобной средой для культивирования и микробиологического обнаружения диких дрожжей *Brettanomyces / Dekkera*. В то же время следует отметить, что обнаружение диких дрожжей *Brettanomyces / Dekkera* микробиологическими методами - это процесс, требующий времени, он длится 10 - 14 дней.

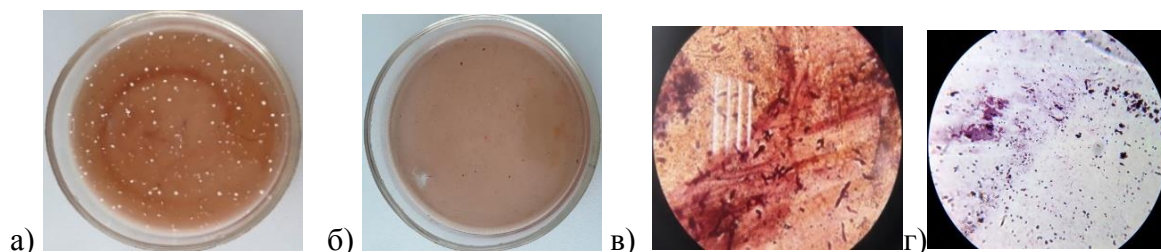


Рисунок 3 - Колонии *Brettanomyces* на среде *Sabouraud 4% Glucose Agar*.

а) из вина Фетяска Нягрэ. б) из вина Рара Нягрэ.

бактериоскопия мазков из колоний *Brettanomyces*, окраска по Граму.

Образцы: в) Фетяска Нягрэ, г) Рара Нягрэ.

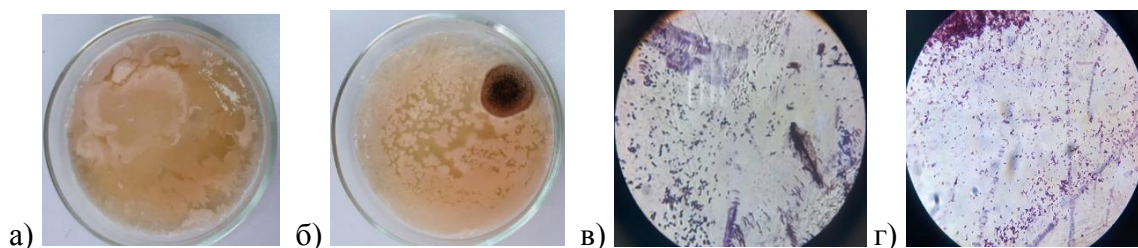


Рисунок 4 - Колонии *Brettanomyces*, выросшие на *Malt Extract Agar Base*

а) из вина Фетяска Нягрэ. б) из вина Рарэ Нягрэ.

бактериоскопия мазков из колоний *Brettanomyces*, окраска по Граму.

Образцы: в) Фетяска Нягрэ, г) Рарэ Нягрэ.

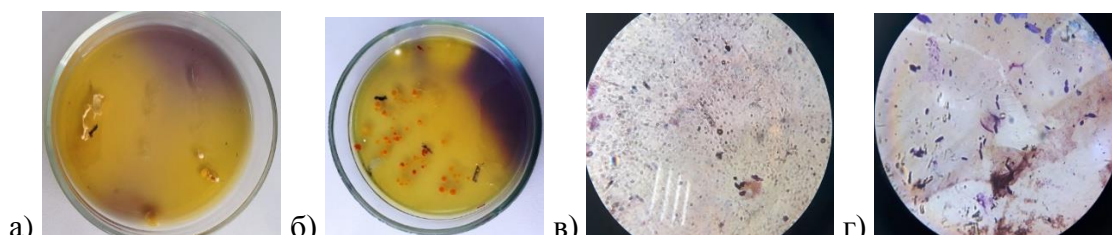


Рисунок 5 - Колонии *Brettanomyces*, выросшие на *Fast Orange™ Yeast Agar*

а) из вина Фетяска Нягрэ. б) из вина Рарэ Нягрэ.

бактериоскопия мазков из колоний *Brettanomyces*, окраска по Граму.

Образцы: в) Фетяска Нягрэ, г) Рарэ Нягрэ.

Выводы.

1. Дикие дрожжи *Brettanomyces* / *Dekkera* являются очень удачным модельным объектом для изучения методов обнаружения микроорганизмов в вине.

2. Дрожжи рода *Brettanomyces* / *Dekkera* хорошо растут на питательных средах, но Сабуро 4% глюкозный агар является наиболее подходящей средой для выращивания и микробиологического обнаружения диких дрожжей *Brettanomyces* / *Dekkera*.

3. Обнаружение *Brettanomyces* / *Dekkera* методом бакпосева вместе с преимуществами, связанными с доступностью и наглядностью этих методов, также имеет и недостатки: большая продолжительность испытаний (от 7 дней до 3 недель), что не позволяет обеспечить своевременную и эффективную реактивность в случае необходимости.

ЛИТЕРАТУРА

1. BARNETT, J.A., PAYNE, R.W., YARROW, D. *In Yeast: characterization and identification*. 2nd edition. Cambridge University Press (ed.). Cambridge, New York, Port Chester, Sydney. 1990
2. CIANNI, M., MACARELLI, F., FATICHENTI, F. *Growth and fermentation behavior of Brettanomyces/Dekkera in winemaking*. J Sc of Food and Agricul, 75 (4), pp. 489-495. 2003
3. PIKA *Weihenstephan™ FastOrange™ Yeast Agar – агар для определения дрожжей* <http://studydoc.ru/doc/2289670/agar-dlya-opredeleniya-drozhzhej>
4. Rodriguez, N., Goncalves, G., Pereira-Da-Silva, S., 2001. Development and use of a new medium to detect yeast of the genera *Dekkera*/*Brettanomyces*. J Appl Microbiol, 90, pp. 588-590.
5. The *Brettanomyces* Project. MYPG Media Agar <http://brettanomycesproject.com/gallery/mypg-media-agar/>