

СПОСОБНОСТЬ ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ УСВАИВАТЬ ФРУКТОЗУ

Ann DUMONT¹, Céline RAYNAL²,
Françoise RAGINEL², Anne ORTIZ-JULIEN²

¹ 1620, rue Préfontaine, Montréal, QC Canada H1W 2N8

² Lallemand S.A., 19, rue des Briquetiers, Blagnac CEDEX 31702 France

Введение

Затухающее брожение было предметом многочисленных исследований, и определено несколько факторов ответственных за эту проблему брожения. Исследование показало, что определенные условия брожения, такие как дефицит питания, высокие начальные уровни сахара, и присутствие ингибиторов, могут привести к проблемам брожения. Результаты этого исследования помогают виноделам значительно понизить риск вялого, остановившегося брожения.

Касательно энологических условий главными сахарами, способными к брожению *Saccharomyces cerevisiae*, является глюкоза и фруктоза. Обе эти гексозы вообще присутствуют в сусле в эквивалентных количествах, но пропорции могут измениться в некоторых суслах. *S. cerevisiae* предпочитает потреблять глюкозу, что объясняет, почему, когда брожение становится затухающим, остающийся сахар - главным образом фруктоза. Частота вялого брожения, показывающая остаточную фруктозу, поднимает вопрос о способности дрожжей потреблять эту гексозу. Кинетика использования сахара *S. cerevisiae* во время брожения в значительной степени ведома сахарным транспортом, и глюкоза потребляется быстрее, чем фруктоза.

В вялом брожении, после того, как большая часть глюкозы потребляется, брожение может затухнуть с существенным сохранением концентрации фруктозы. Согласно литературе, уровень остаточной глюкозы в недоброженных винах в 10 раз ниже, чем концентрация фруктозы. В соответствии с Gafner и Schütz (1996), есть возможность предсказать увядшее брожение, когда отношение глюкозы/фруктозы близко 0.1.

Во время алкогольного брожения сахар потребляется главным образом во время

постоянной фазы. Во время этой фазы доступный азот постепенно становится менее доступным, и, так как это - существенное питательное вещество, вовлеченное в транспорт сахара в ячейку через синтез белка, это частично объясняет, почему и метаболизм дрожжей и деятельность брожения (Salmon, 1996) замедляются. Уровень алкоголя также постепенно увеличивается, становясь ядовитым для дрожжей, и использование фруктозы еще более становится под угрозой.

На молекулярном уровне исследование подтвердило генное кодирование для транспортеров гексозы в дрожжах. При энологических условиях несколько генов вовлечены в транспорт сахара, который отрегулирован большой, мультигенной семьей под названием НХТ. Есть 20 генов НХТ. Hxt1 и Hxt7 - главные транспортеры. Hxt2, Hxt6 и Hxt7 - высокородственные курьеры, тогда как Hxt1 и Hxt3 - низкородственные носители. У нескольких других носителей Hxt есть промежуточная близость. У и высоко - и низкой близости носителей есть большая близость к глюкозе, чем к фруктозе, которая может затронуть норму использования этих гексоз. Концентрации гексоз в среде будут влиять на выражение индивидуальных генов НХТ (Perez и др., 2005; Guillaume и др., 2007). Было показано, что у Hxt3 есть самая высокая способность поддержать брожение (Luyten и др. 2002), и очень недавние исследования также идентифицировали этот ген, действительно ответственный за способность потреблять фруктозу среди определенных дрожжей (Guillaume и др., 2007). Также показано, что мутация на аллели гена Hxt3 была ответственна за улучшение работы винных дрожжей, используя фруктозу во время брожения и в случаях приостановленного брожения. Теперь установлено, что способность потреблять фруктозу зависит от вида дрожжей. Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить работу

брожения коммерческих штаммов при эннологических условиях, обращая особое внимание на их способность потреблять фруктозу. Метод был развит, чтобы получить “фруктофильный индекс”, который поможет определить способность специфических дрожжей потреблять фруктозу.

“Фруктофильный” характер дрожжей

В наших экспериментах мы оценили способность дрожжей использовать фруктозу, основываясь на измеримых критериях фенотипов. Различные коммерческие дрожжи были отобраны за их способность сбраживать сула с высоким содержанием сахара, и за их способность возобновлять приостановившееся брожение.

- были изучены воздействия нескольких эннологических параметров:
- начальные уровни сахара
- отношение глюкозы/фруктозы (GFR)
- начальный уровень усвояемого дрожжами азота (YAN)
- температура брожения.

Критерии, оцененные для каждой дрожжей, были:

- **активность брожения** – кинетика брожения представлена скоростью брожения в критерии времени или выработанного CO₂

- **Кинетика потребления глюкозы и фруктозы** – чтобы оценить и дифференцировать

способность дрожжей vis-a-vis их потребление фруктозы, содержание глюкозы и фруктозы было измерено постоянно по всему ходу брожения, чтобы оценить кинетику потребления сахаров. Фруктофильный индекс был основан на вычислении области между кривыми потребления глюкозы и фруктозы и для CO₂, выработанного (Рис.1) теми же самыми дрожжами, и является критериями, отобранными для оценки способности каждого вида дрожжей потреблять фруктозу и сравнения их друг с другом. Мы сосредоточились на области, расположенной в последней стадии брожения, так как это - критическая область потребления сахара. Чем меньше область, тем ближе потребление фруктозы к потреблению глюкозы. Мы выбрали этот показатель, чтобы сравнить все дрожжи и категоризировать штаммы дрожжей согласно их способности использовать фруктозу. Дрожжи, у которых кинетика потребления фруктозы подобна тем же показателям глюкозы, являются дрожжами, проявляющими фруктофильный характер, и могут лучше работать в ситуациях высокой фруктозы.

Чтобы утвердить нашу систему ранжирования, мы включили в качестве контроля в исследование очень известные дрожжи, описанные как с «очень фруктофильным характером» (Guillaume и др., 2007).

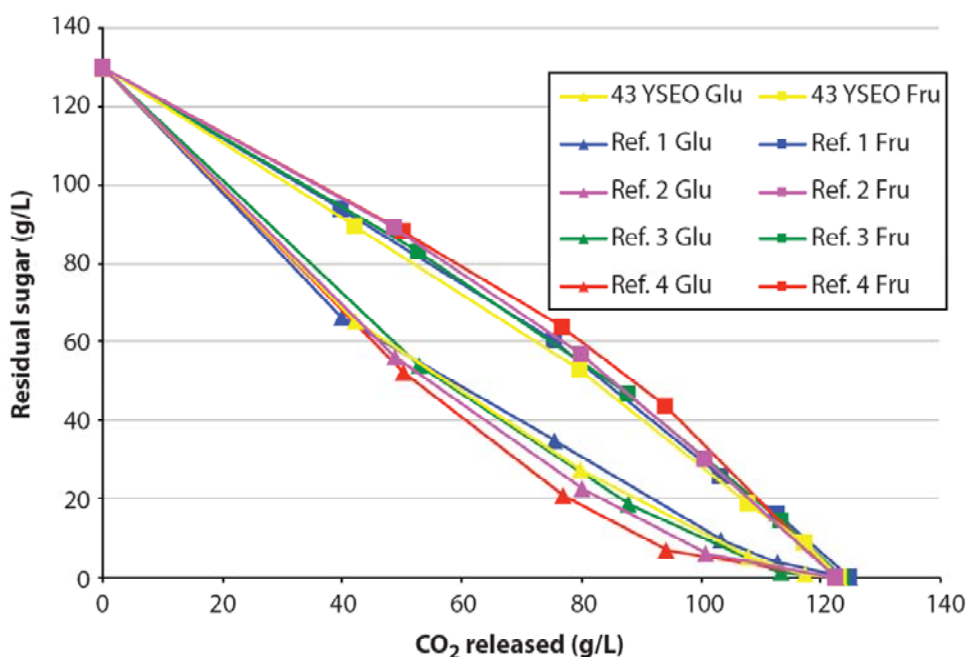


Рисунок 1. Эволюция глюкозы и фруктозы во время алкогольного брожения. Сравнение 5 штаммов *Saccharomyces cerevisiae*. Условия: глюкоза/фруктоза MS300 (130 г/л каждого сахара); 24°C

Материалы и методы

Винные дрожжи. Мы использовали несколько коммерчески доступных штаммов винных дрожжей и в некоторых случаях дрожжи отобраны за их способность возобновлять затихшее брожение, такие как *UVAFERM YSEO*[®] 43. Девятнадцать коммерчески доступных штаммов были первоначально испробованы, и в дополнение к *UVAFERM YSEO*[®] 43 было выбрано четыре, основываясь на их способностях возобновлять остановившееся брожение. Они были закодированы от *Ref1* до *Ref4*. Во время брожения в микровинификаторах 1.1 л среды были инокулированы дрожжами. Норма прививки составляла 25 г/Гл (соответствует ок. 5×10^6 клеток/мл).

Среда брожения. Чтобы сравнить различные коммерчески доступные штаммы, мы работали со стандартной средой: синтетическая среда, которая подражает составу сусла (MS300), описанная Bely и др. (1991), с некоторыми модификациями к начальному сахарному уровню (мы систематически использовали фруктозу в количестве, равном глюкозе, или в более высоком количестве для экспериментов, где GFR был <1). Точно так же мы изменили полные концентрации азота от 100 мг/л до 400 мг/л согласно эксперименту.

Брожение. Брожение было выполнено с постоянной агитацией при 18°C, 24°C или 28°C, в ферментерах объемом 1.2 л.

Оценка брожения

CO₂. Количество выработанного CO₂ было определено автоматическим измерением потери веса по каждому ферментеру с интервалом в 20 минут. Аргументированность данной методики, разработанной INRA в Montpellier Jean-Marie Sablayrolles, для оценки уровней сахара и алкоголя, была описана в многочисленных изданиях, включая El Haloui и др. (1988) и Sablayrolles и др. (1987).

Норма производства CO₂ (dCO₂/dt). Скорость производства CO₂ была вычислена

многочленным сглаживанием 11 последних значений выработанного CO₂. Частые замеры выработки CO₂ и точность взвешивания (0.01 г) позволяют нам неоднократно вычислять скорость брожения с большой точностью (Bely и др., 1990).

Потребление глюкозы и фруктозы

Образцы были взяты во время брожения. После центрифугирования сахар в надосадочной фракции дозировался с помощью ENZYTECTM D-Glucose/D-Fructose комплекты (Scil Diagnostics GmbH, Германия). Различные условия были изучены, включая различные начальные уровни сахара, но только о следующих условиях брожения сообщили:

1. Температура брожения: 24°C

Синтетическая среда с высоким YAN (MS300), общий сахар: **260 г/л, GFR = 1 (глюкоза = 130 г/л и фруктоза = 130 г/л)**

2. Температура брожения: 24°C

Синтетическая среда с высоким YAN (MS300), общий сахар: **260 г/л, GFR = 0.33 (глюкоза = 65 г/л и фруктоза = 195 г/л)**

3. Температура брожения: 24°C

Синтетическая среда с недостаточным YAN (MS70), общий сахар: **260 г/л, GFR = 0.33 (глюкоза = 65 г/л и фруктоза = 195 г/л)**

4. Температура брожения: 18°C

Синтетическая среда с высоким YAN (MS300), общий сахар: **260 г/л, GFR = 0.33 (глюкоза = 65 г/л и фруктоза = 195 г/л)**

5. Температура брожения: 28°C

Синтетическая среда с высоким YAN (MS300), общий сахар: **260 г/л, GFR = 0.33 (глюкоза = 65 г/л и фруктоза = 195 г/л)**

Учитывая число проверенных условий, в этой статье сообщили не обо всех данных по брожению и уровнях потребления сахаров.

Результаты

ВЛИЯНИЕ ОТНОШЕНИЯ ГЛЮКОЗА / ФРУКТОЗА

Единственной переменной между энологическими условиями 1 и 2 был GFR: соответствующие уровни двух гексоз были идентичны в условии 1, в то время как в

условии 2 было в три раза больше фруктозы, чем глюкозы. Оба сахара и проверены во время брожения дали возможность вычислить различие потребления обоих сахаров, чтобы показать фруктофильный индекс. Рис. 2 показывает, что по результатам испытаний пяти штаммов дрожжей, проверенных в условиях 1 и 2, и независимо от уровня GFR (равному 1 или 0.33), дрожжами, которые показали лучшую способность потреблять фруктозу, были *UVAFERM YSEO*[®] 43.

Ранжирование дрожжей в пересчете на их способности потреблять фруктозу выполнено для различных отношений глюкозы/фруктозы. Также отмечено, что, когда GFR ниже, чем 1, фруктофильный индекс также понижен. Однако мы замечаем, что некоторые дрожжи менее подвержены влиянию данного показателя, чем другие. Например, как показано, *UVAFERM YSEO*[®] 43 и Ref.4 менее затронуты уровнем сокращения фруктофильного индекса, чем другие три штамма.

Влияние содержания азота. Когда мы сравнили эннологические условия 2 и 3, где единственной переменной был начальный уровень YAN, при GFR <1, мы заметили, что *UVAFERM YSEO*[®] 43 все еще представляет

лучшую работу vis-a-vis потребления фруктозы (Рис. 3), и что способность дрожжей потреблять фруктозу почти не изменилась, независимо от того был ли YAN доступен или был дефицит азота (<150 мг/л).

Рис. 4 показывает воздействие дефицита азота на бродильную активность дрожжей. Время брожения при MS70 приблизительно в четыре раза больше, и известен эффект дефицита азота на максимальную скорость брожения, поскольку метаболизм дрожжей значительно замедляется. Это соответствует литературным источникам (Salmon, 1989, Salmon и др., 1993). Работа с суслем, бедным на азот - возможность лучше различить поведение дрожжей, и продемонстрировать изменчивость в потребности в азоте среди дрожжей. Эти результаты являются полностью последовательными с предшествующим исследованием (Julien и др., 2001). Эти результаты также показывают, что начальные уровни азота имеют очень существенное влияние на бродильную активность дрожжей, но не воздействуют на их переменную способность использовать фруктозу. В обоих условиях, *UVAFERM YSEO*[®] 43 заканчивает брожение ранее остальных, и с устойчивым ходом брожения.

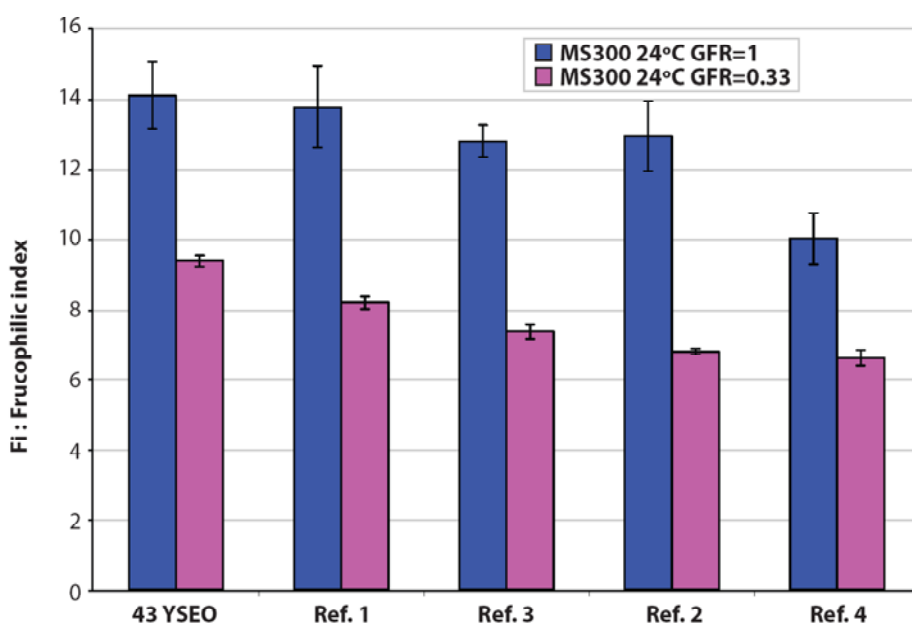


Рисунок 2. Влияние GFR на фруктофильный индекс различных коммерческих штаммов.

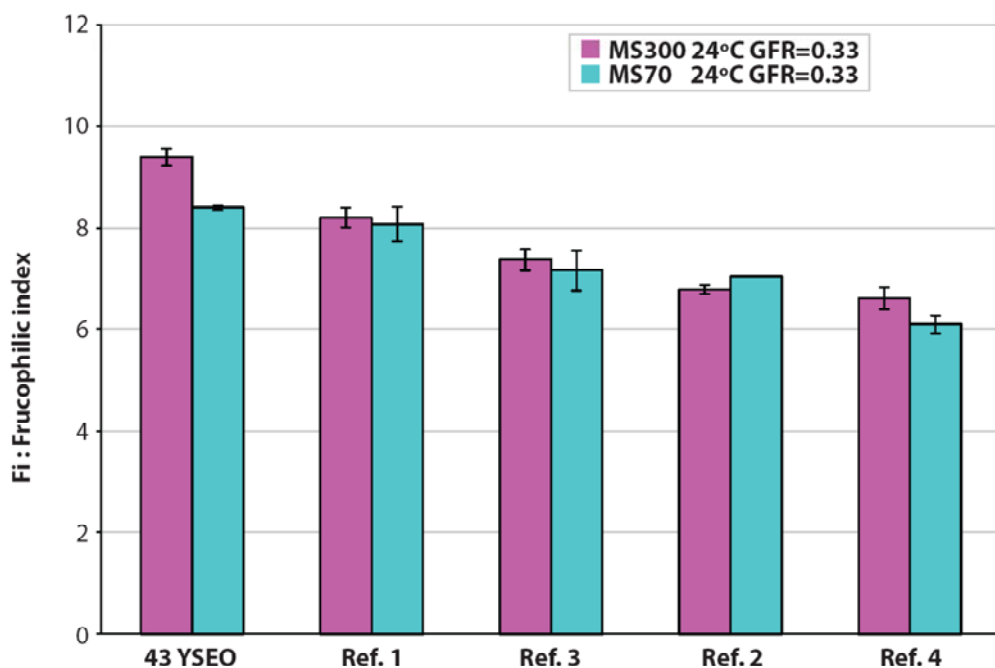


Рисунок 3. Ранжирование селекционированных дрожжей, основанное на различии потребления сахара в среде с отношением глюкоза/фруктоза = 0.33 и с различными уровнями азота (среды, с высокой и низкой концентрацией азота)

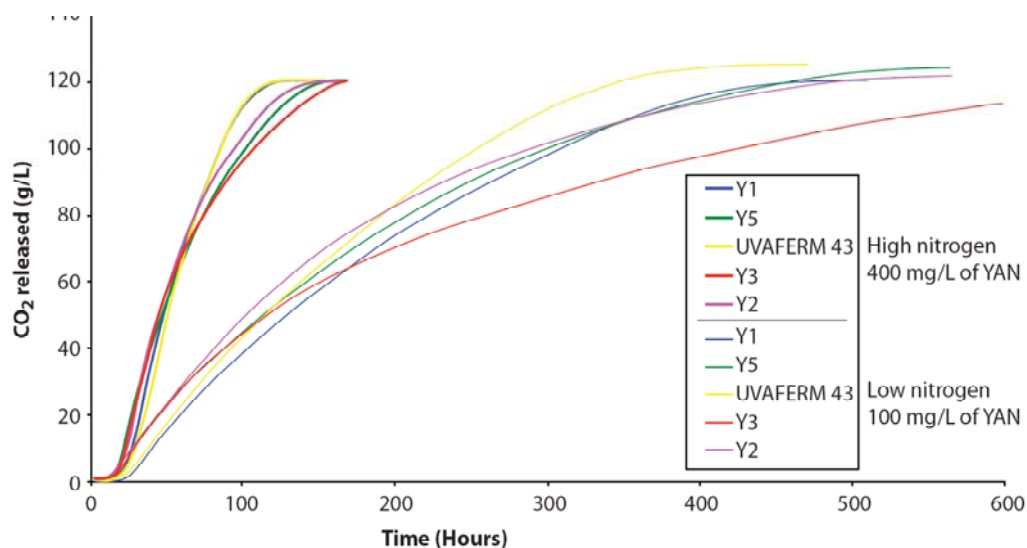


Рисунок 4. Сравнение хода брожения различными дрожжами в среде с отношением глюкоза/фруктоза = 0.33 и с различными уровнями азота (среды, с высокой и низкой концентрацией азота)

Воздействие температуры

Мы изучили воздействие температуры на способность дрожжей к усваиванию фруктозы (Рис. 5). Результаты указали, что эта способность увеличивалась с температурой вообще, за исключением некоторых дрожжей (Ref. 3). В этом случае, мы видим, что фруктофильный индекс увеличился значительно, когда брожение вели при 18°C, по сравнению с брожением при более высокой температуре, но также и по сравнению с другими дрожжами. Этот штамм дрожжей (Ref. 3) известен тем, что хорошо приспособлен к ферментированию при

низкой температуре, и это могло объяснить его поведение. За исключением этой специфической ситуации, ранжирование среди селекционированных дрожжей остается тем же самым, с лучшим фруктофильным индексом для UVAFERM YSEO® 43, независимо от температуры.

Факт, что способность дрожжей к усвоению фруктозы ниже при низкой температуре, может быть объяснен более медленным метаболизмом дрожжей, когда температура брожения уменьшается.

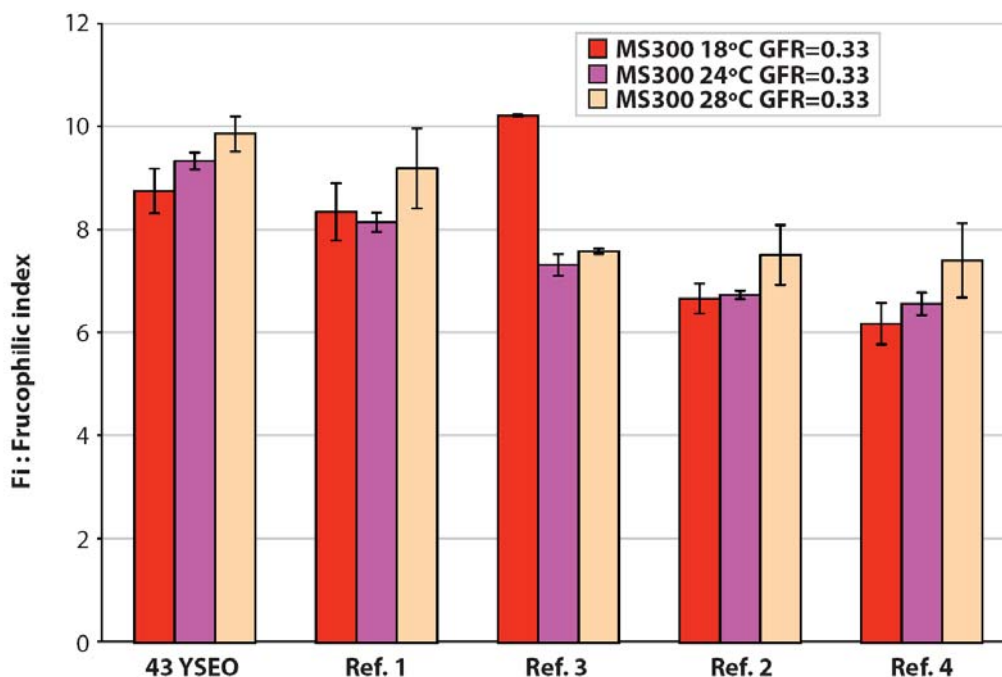


Рисунок 5.

Ранжирование селекционированных дрожжей, основанное на различии потребления сахара в среде с отношением глюкоза/фруктоза = 0.33 при различных температурах.

Заключение

UVAFERM YSEO® 43 последовательно показали наименьшую область между кривыми потребления глюкозы и фруктозы во время последней половины брожения, и поэтому имеет самый высокий «fructophilic» индекс, что означает, что у этих дрожжей есть лучшая способность усваивать фруктозу, безотносительно GFR, азота или температурных значений. Хотя этой статье сообщается только о пяти расах, это поведение, было проверено на 19 других отобранных дрожжах с теми же самыми результатами.

Культурные дрожжи отличались по их способности потреблять фруктозу, и это - индикатор работы в потенциально

проблематичном сусле, где GFR ниже, и/или состав сусла предполагает трудные условия брожения. «Фруктофильный» индекс, измеренный как различие области между потреблением глюкозы и фруктозы, может быть инструментом, используемым, чтобы оценить фруктофильческие способности винных дрожжей, и характеризовать этот фенотип и избежать остановившегося брожения.

Исследование характеристики UVAFERM YSEO® 43 продолжается с всесторонним исследованием на его способности возобновлять остановившееся брожение и выработать надежные методы для таких ситуаций.

Ссылки

Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am J Enol Vitic.* 41:319-324.
Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1991. Automatic detection of assimilable nitrogen

deficiencies during alcoholic fermentation in enological conditions. *J Ferm Bioeng.* 70:246-252.
Bely, M., J. M. Salmon, and P. Barre. 1994. Assimilable nitrogen addition and hexose transport activity during enological fermentations. *J Inst Brew.* 100:279-282.
Bisson, L. F. Glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of potassium in stuck

- fermentation. Proceedings of the 2000 *Entretiens Scientifiques Lallemand*, Krems, Austria. 27-33.
- McClellan, C. J., A. L. Does, and L. F. Bisson. 1989. Characterization of hexose uptake in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *Am J Enol Vitic.* 40:9-15.
- El Haloui, N., D. Picque, and G. Corrieu. 1988. Alcoholic fermentation in wine-making: on line measurement of density and carbon dioxide evolution. *J Food Eng.* 8:17-30.
- Gafner, J., and M. Schütz. 1996. Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experience to restart stuck fermentations. *Vitic Enol Scien.* 51:214-218.
- Guillaume, C., P. Delobel, J. M. Sablayrolles, and B. Blondin. 2007. Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 73(8):2432-2439.
- Perez, M., K. Luyten, R. Michel, C. Riou, and B. Blondin. 2005. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Res.* 5:351-361.
- Sablayrolles, J. M., P. Barre, and P. Grenier. 1987. Design of laboratory automatic system for studying alcoholic fermentations in anisothermal oenological conditions. *Biotech Tech.* 1:181-184.
- Salmon, J. M. 1989. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 55:953-958.
- Salmon, J. M., O. Vincent, J. C. Mauricio, M. Bely, and P. Barre. 1993. Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentation. *Am J Enol Viticul.* 44:56-64.
- Salmon, J. M. 1996. Sluggish and stuck fermentations: Some actual trends on their physiological basis. *Vitic Enol Sci.* 51:137-140.

По материалам пресс-релизов Lallemand inc.
www.lallemandwine.com

Перевод и редактирование © Филько Я.В. – 2010.
Y_Filko@ukr.net

Использование материалов статьи, полное или частичное, - только со ссылкой на источник.