

## РЕЗОЛЮЦИИ OIV-OENO 739-2025

### РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТАЦИИ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

**ВНИМАНИЕ.** Настоящая резолюция будет добавлена в качестве приложения к следующей резолюции:

- OIV-OENO 370-2012 «РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ХАРАКТЕРИСТИК ВИННЫХ ДРОЖЖЕЙ РОДА *SACCHAROMYCES*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ВИНОГРАДАРСКО-ВИНОДЕЛЬЧЕСКИХ СРЕД»

ГЕНЕРАЛЬНАЯ АССАМБЛЕЯ,

НА ОСНОВАНИИ статьи 2, пункта iv Соглашения от 3 апреля 2001 года о создании Международной организации по виноградарству и виноделию,

ПРИНИМАЯ ВО ВНИМАНИЕ результаты работы Экспертной группы «Микробиология»,

ПРИНИМАЕТ РЕШЕНИЕ по предложению Комиссии «Энология» о добавлении в преамбулу Резолюции OIV-OENO 370-2012 следующего пункта:

Оценка свойств ферментации штаммов дрожжей *S. cerevisiae* необходима для обеспечения качества спиртового брожения и производства вин с требуемыми органолептическими свойствами (См. Приложение 2). Ненадлежащие экспериментальные условия могут стать причиной получения противоречивых результатов, которые не отражают фактических свойств ферментации.

ПРИНИМАЕТ РЕШЕНИЕ о добавлении раздела «Стандартизованный протокол для оценки свойств ферментации штаммов дрожжей *S. cerevisiae*» к Резолюции OIV-OENO 370-2012 в качестве приложения.

## Приложение 2

### РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТАЦИИ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

## ВВЕДЕНИЕ

Использование штаммов *Saccharomyces cerevisiae* с выбранными свойствами играет ключевую роль в получении вина с требуемыми конечными характеристиками. Первым шагом на пути к получению дрожжевых разводов *S. cerevisiae* является клональная селекция на основе определения энологических характеристик винных штаммов *S. cerevisiae*, осуществляемого посредством оценки нескольких фенотипических характеристик путем сбраживания искусственных сред или виноградных сусел в лабораторных условиях. Полученные естественным путем виноградные сусла считаются более пригодными для определения достоверных характеристик винных дрожжей, однако непостоянство их химического состава влияет на результат такого определения, затрудняя сравнение различных штаммов *S. cerevisiae*, анализируемых в различных лабораториях или в одной лаборатории в разное время. Помимо этого, результаты могут в значительной степени зависеть от условий, в которых проводились эксперименты со сбраживанием.

## СФЕРА ПРИМЕНЕНИЯ

В этом приложении в таблице 1 представлен прошедший валидацию стандартизованный протокол оценки свойств ферментации и метаболических свойств винных штаммов *S. cerevisiae* в искусственной среде, позволяющий проводить прямое объективное сравнение экспериментальных данных, полученных при оценке характеристик винных дрожжей в разных лабораториях.

*Таблица 1. Протокол стандартизации экспериментов со сбраживанием искусственного сусла*

| Этап                    | Методика                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Источник штамма дрожжей | При необходимости, используют активные сухие дрожжи из одной партии после регидратации. При доступности других источников, жидкий инокулят готовят следующим образом: 100 мкл материнской культуры высевают в 5 мл свежей среды и инкубируют в течение 12 часов, повторяя три раза (т.е. для стандартизации инокулята эту операцию повторяют трижды). |

|                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Приготовление искусственного сусла | Состав искусственного сусла указан в таблице 1 Резолюции OIV-OENO 370-2012.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Розлив искусственного сусла        | В конические колбы объемом 500 мл с клапанами Muller наливают 350 мл искусственного сусла. Для испытаний используются три указанные колбы (три независимых эксперимента).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Регидратация дрожжей               | Регидратация активных сухих дрожжей проводится согласно методике, описанной в Резолюции OIV/OENO 329/2009: <ul style="list-style-type: none"> <li>• в стерильных условиях взвешивают 1 г активных сухих дрожжей;</li> <li>• регидратируют в 100 мл воды при температуре 36-40 °C в стерильных условиях;</li> <li>• в течение пяти минут медленно перемешивают раствор палочкой или магнитной мешалкой;</li> <li>• в течение 20 минут выдерживают раствор при температуре 36-40 °C;</li> <li>• в течение пяти минут повторно перемешивают раствор при комнатной температуре;</li> <li>• в стерильных условиях отбирают 10 мл раствора и производят подсчет жизнеспособных дрожжевых клеток в счетной камере Тома с использованием 0,1%-ного (масс./об.) раствора метиленового синего</li> </ul> |
| Инокуляция штамма дрожжей          | Регидратированные дрожжи или жидкую культуру после предварительного культивирования инокулируют в искусственное сусло в количестве, необходимом для получения суспензии жизнеспособных клеток с плотностью $2 \cdot 10^6$ клеток/мл                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Условия брожения                   | Конические колбы, закрытые клапанами Muller (заполненными серной кислотой) инкубируют без перемешивания в течение 15 суток при 25 °C или 17 °C для красного, белого и розового вина, соответственно                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Контроль брожения                  | Раз в сутки взвешивают каждую колбу для определения потери массы. Перед взвешиванием встряхивают колбу в руках в течение одной минуты                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Подготовка образцов для анализов   | После завершения брожения выполняют центрифугирование содержимого колб при $3000 \times g$ в течение пяти минут при комнатной температуре и отделяют клетки от надосадочной жидкости                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Химические анализы | <ol style="list-style-type: none"><li>1. Химические анализы полученного вина проводят после завершения спиртового брожения (остаточное содержание сахара &lt; 2 г/л).</li><li>2. В ходе анализов определяют следующие показатели: содержание этанола, глюкозы, фруктозы, глицерина и уксусной кислоты, а также концентрацию ацетальдегида, 1-пропанола, 2-метил-1-бутанола, этилацетата, 2-метил-1-пропанола, 3-метил-1-бутанола.</li><li>3. Количество образовавшихся продуктов брожения (этанол, глицерин, уксусная кислота) стандартизуют путем расчета количества продуктов брожения на единицу потребленного сахара.</li><li>4. Анализ выполняется официально принятыми OIV методами исследований в сертифицированной лаборатории.</li></ol> |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## ПРИНЦИП ПРОТОКОЛА

Протокол включает несколько этапов, и для каждого этапа должны быть выполнены подробные процедуры с целью определения стандартных условий, в которых следует определять энологические характеристики штаммов *S. cerevisiae*. Валидация данного протокола осуществлялась посредством межлабораторных сравнительных экспериментов по сбраживанию искусственной среды и виноградных сусел, а также путем проверки полученных результатов на повторяемость, воспроизводимость и статистическую достоверность. Для проверки повторяемости проводились эксперименты в стандартных условиях (с расчетом количества ферментационных продуктов на единицу потребленного сахара) и тщательно обрабатывались данные, в том числе с использованием сочетания непараметрических критериев и кластерных подходов.

## Список литературы

1. Romano P. *et al.*, (2022) Validation of a standard protocol to assess the fermentative and chemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *Frontiers in Microbiology*, 13: 830277. doi: 10.3389/fmicb.2022.830277