

УДК 663.252.41: 575.22

UDC 663.252.41: 575.22

DOI 10.30679/2219-5335-2019-5-59-118-132

DOI 10.30679/2219-5335-2019-5-59-118-132

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
РАЗНООБРАЗИЯ
ЕСТЕСТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
РОДА *SACCHAROMYCES*
КАК ОСНОВА ПОИСКА ШТАММОВ,
ПЕРСПЕКТИВНЫХ
ДЛЯ ВИНОДЕЛИЯ**

**ANALYSIS OF GENETIC
VARIETY OF THE NATURAL
POPULATIONS
OF *SACCHAROMYCES* KIND
AS THE SEARCH BASIS
FOR STRAINS PROMISING
FOR WINE-MAKING**

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук
зав. селекционно-биотехнологической
лабораторией

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci.
Head of Breeding
and Biotechnology Laboratory

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

Ageyeva Natalia Mikhailovna
Dr. Sci. Tech., Professor
Chief Research Associate
of SC «Wine-making»
e-mail: ageyeva@inbox.ru

Лободина Елена Вадимовна
младший научный сотрудник
селекционно-биотехнологической
лаборатории

Lobodina Elena Vadimovna
Junior Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory

Насонов Андрей Иванович
канд. биол. наук
зав. лабораторией
биотехнологического контроля
фитопатогенов и фитофагов

Nasonov Andrey Ivanovich
Cand. Biol. Sci.
Head of Laboratory
of Biotechnology Control
of Phytopathogens and Phytophages

Токмаков Сергей Вячеславович
канд. биол. наук
старший научный сотрудник
селекционно-биотехнологической
лаборатории

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich
Cand. Biol. Sci.
Senior Research Associate
of Breeding and Biotechnology
Laboratory

Праха Антон Владимирович
канд. с.-х. наук
старший научный сотрудник
зав. лабораторией виноделия

Prakh Anton Vladimirovich
Cand. Agr. Sci.
Senior Research Associate
Head of Laboratory of Wine-making

*Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Северо-Кавказский федеральный
научный центр садоводства,
виноградарства, виноделия»,
Краснодар, Россия*

*Federal State Budget
Scientific Institution
«North Caucasian Federal
Scientific Center of Horticulture,
Viticulture, Wine-making»,
Krasnodar, Russia*

Производство российского вина основано на использовании активных сухих дрожжей, ввозимых в РФ из стран Европы – Франции, Германии, Италии. Между тем, известно, что высококачественные вина географического наименования необходимо производить с применением местных рас дрожжей. Поиск таких рас (штаммов) является актуальной задачей. Анализ генетического разнообразия популяций дикорастущих дрожжей и создание их коллекций является необходимым начальным этапом в создании новых перспективных штаммов для промышленного виноделия. Такие исследования постоянно проводятся в Европе для создания терруарспецифических штаммов дрожжей. Отбор проб винограда для выделения и изучения новых местных штаммов винных дрожжей проводили в виноградарских хозяйствах Темрюкского и Анапского районов Краснодарского края. Выделение ДНК, условия проведения ЦР и фрагментного анализа выполняли согласно действующим методикам. Для анализа полиморфизма длин амплифицируемых фрагментов при SSR-генотипировании использовали фрагментный анализ на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism 3130. Полученные данные визуализировали в программе Gene Mapper v 4.1. Установлено разнообразие видов и родов дрожжей на поверхности ягод винограда. При этом «выход» сахаромицетов составил порядка 30 % от общего количества полученных моноспоровых культур для каждой из точек отбора. Приведены результаты анализа генетических взаимосвязей и ряда технологических характеристик штаммов *Saccharomyces* sp., выделенных из естественных популяций в ампелоценозах. Выявлено, что географический фактор влиял на возникновение генетической изоляции. Показано, что генетически удалённые штаммы проявляют значительные различия по ряду физиолого-биохимических характеристик.

The production of Russian wine is based on the use of active dry yeast imported into the Russian Federation from European countries – France, Germany, Italy. Meanwhile, it is known that the high-quality wines of a geographical name must be produced using the local yeast races. The search for such races (strains) is an urgent task. Analysis of the genetic diversity of wild yeast populations and the creation of their collections is a necessary initial step in creating the new promising strains for industrial winemaking. Such studies are ongoing in Europe to create terroarspecific yeast strains. Grapes were sampled to isolate and study the new local strains of wine yeast in the vineyards of Temryuk and Anapa districts of the Krasnodar Territory. DNA isolation, conditions for PCR and fragment analysis were carried out according to current methods. To analyze the polymorphism length of amplified fragments during SSR genotyping, a fragment analysis was used on an ABIprism 3130 automated genetic analyzer. The data obtained were visualized in Gene Mapper v 4.1. A variety of species and genera of yeast on the surface of grape berries has been established. Moreover, the «yield» of saccharomycetes amounted to about 30 % of the total number of monospore cultures obtained for each of the selection points. The results of the analysis of genetic Relationships and a number of technological characteristics of strains of *Saccharomyces* sp. Isolated from natural population in ampelocenoses are presented. It was revealed that the geographical factor influenced the occurrence of genetic isolation. The genetically removed strains display the significant differences in a number of physiological and biochemical characteristics.

Ключевые слова: ВИННЫЕ ДРОЖЖИ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, АВТОХТОННЫЕ ПОПУЛЯЦИИ, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ, ШТАММ, ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Key words: WINE YEAST, GENETIC DIVERSITY, AUTOCHTHONOUS POPULATIONS, MICROSATELLITE ANALYSIS, STRAIN, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS

Введение. Отечественное виноградарство и виноделие в настоящее время находятся на этапе активного развития. Однако, несмотря на это, в мировом масштабе Россия остаётся пока региональным производителем вина. Для получения продукта, конкурентного на мировом уровне, требуется развитие высокотехнологичного инновационного производства.

Наряду с сортом винограда и агроклиматическими условиями его выращивания, важным фактором в производстве качественных вин, включая вина, обладающие уникальными органолептическими характеристиками, является использование специфичных штаммов винных дрожжей [1, 2]. Лишь использование дрожжей, которые представляют собой хорошо изученные и апробированные, с известными технологическими свойствами штаммы сахаромицетов может гарантировать достижение заданных свойств продукции [3, 4].

В настоящее время на отечественном рынке товаров для виноделия представлено значительное количество коммерческих препаратов винных культур дрожжей, исключительно зарубежного производства. Известно, что использование одного и того же промышленного штамма применительно к виноградному сырью, выращенному на терруарах с различающимися характеристиками, и даже к разным сортам винограда может привести к сглаживанию характеристик и потере уникальности органолептических свойств вина [5, 6]. В связи с этим актуальным является вопрос поиска и селекции новых рас дрожжей с учётом использования генофонда аборигенных популяций *Saccharomyces* для создания оригинальных вин географического наименования.

Анализ генетического разнообразия популяций дикорастущих дрожжей и создание их коллекций является необходимым начальным этапом в создании новых перспективных штаммов для промышленного виноделия. В мире существует целый ряд примеров успешного выполнения проектов по поиску перспективных коммерческих штаммов винных дрожжей среди диких популяций или созданию таковых на основе скрещивания диких форм и имеющихся в наличии коммерческих штаммов для получения новых штаммов с улучшенными характеристиками. Такие исследования постоянно проводятся во Франции, Испании, Португалии, Италии, а выделяемые дрожжи селекционируются и впоследствии применяются в технологии столовых и игристых вин, в том числе и для создания терруарспецифичных штаммов.

Применение методов молекулярно-генетического анализа на всех этапах создания новых перспективных штаммов позволяет на порядок повысить эффективность такой работы. Это обусловлено возможностью выполнения определённых задач.

Контроль дубликатных образцов. При выполнении первичного высева и последующем получении колоний сахаромицетов возможно дублирование значительного количества образцов, при этом разные колонии являются потомством клеток, принадлежащих к одному и тому же штамму. Очевидно, что выполнение последующей оценки физиолого-биохимических и винодельческих характеристик для всей выборки штаммов, по сути, являющихся генетически идентичным потомством одного родительского штамма, значительно повысит финансовые издержки и затраты времени, необходимые для выполнения эксперимента. Можно представить ситуацию, когда при значительном доминировании одного штамма производится высев значительного количества колоний (до 30-50), которые представляют один штамм. Себестоимость дальнейшей комплексной

оценки всей выборки полученных образцов винных дрожжей будет иметь стоимость, превышающую в 30-50 раз себестоимость оценки одного штамма. Очевидно, что использование молекулярно-генетических методов для идентификации генетической уникальности образцов позволяет полностью исключить наличие такой ситуации.

Выполнение видовой идентификации штамма. Физиолого-биохимические характеристики и винодельческие свойства во многом определяются видовой принадлежностью штамма, поэтому видовой идентификация является важным этапом в процессе селекционирования новых перспективных штаммов. Это может быть выполнено в сжатые сроки, на любом этапе исследования, начиная с первичного получения культур.

Контроль наличия штамма при сбраживании и анализ динамики численности популяции клеток. Молекулярно-генетические методы анализа позволяют не только проводить ДНК-маркерную идентификацию штамма, который использовался для сбраживания сусле, но также дают возможность оценивать темпы роста популяции клеток с использованием метода количественной ПЦР.

Охрана авторских прав и контроль подделок. С использованием молекулярно-генетических методов возможно проводить ДНК-паспортизацию штаммов для защиты авторских прав разработчиков. Кроме этого молекулярно-генетический анализ может быть использован для выявления фальсификаций – например при реализации известных штаммов под другим наименованием.

Наряду с вышперечисленным важной точкой приложения молекулярно-генетических методов является изучение генетического полиморфизма естественных популяций как предселекционного этапа, позволяющего существенно повысить эффективность процесса отбора перспективных штаммов. Использование молекулярно-генетического анализа позво-

ляет оценить степень генетического сходства отобранных штаммов, что можно использовать как критерий при формировании выборки для дальнейшей их оценки по комплексу характеристик. В случае выявления групп штаммов с высоким уровнем генетического сходства наиболее целесообразным может быть алгоритм, при котором, на первом этапе эксперимента для физиолого-биохимической и технологической оценки отбираются не все, а часть образцов – репрезентативная выборка из данной группы штаммов. Данная выборка должна отображать максимум генетического разнообразия группы, выражаемое в аллелях, используемых для оценки ДНК-маркеров.

Из методов, основанных на анализе полиморфизма ДНК, к одним из наиболее перспективных можно отнести метод, основанный на анализе SSR-локусов генома. SSR-маркеры (микросателлиты) – простые повторяющиеся последовательности – широко используются в генотипировании и при конструировании генетических карт. Их широкое применение обусловлено равномерным покрытием генома, высоким полиморфизмом, мультиаллельностью, кодоминантным характером наследования и воспроизводимостью. Эти характеристики сделали SSR-маркеры одними из наиболее часто используемых молекулярных ДНК-маркеров для выявления генетического разнообразия, ассоциативного картирования, картирования генетического сцепления, популяционного и эволюционного анализа. В настоящее время имеется ряд работ по изучению популяционных взаимосвязей дрожжей [7]. SSR-анализ может быть востребован при изучении генетического разнообразия и генетической идентификации штаммов, имеющих близкое происхождение [8].

В связи с высоким уровнем актуальности использования молекулярно-генетических методов для анализа генетической структуры естественных популяций винных дрожжей и оптимизации отбора штаммов для последующей оценки по комплексу технологических характеристик нами

была поставлена задача выполнить анализ генетических взаимосвязей штаммов *Saccharomyces*, отобранных в разных географических точках и провести оценку некоторых их физиолого-биохимических характеристик.

Объекты и методы исследований. Отбор образцов производили в 2016 году перед валовым сбором урожая винограда сорта Шардоне в винодельческих хозяйствах Новороссийского района ЗАО «Абрау-Дюрсо» и ООО «Имение Сикоры». Выделение аборигенных винных дрожжей в культуру, генетическую и технологическую оценку изолятов проводили в лаборатории генетики и микробиологии НЦ «Сортоизучения и селекции» и лаборатории виноделия НЦ «Виноделие» ФГБНУ СКФНЦСВВ.

Схема отбора, условия проведения спонтанного сбраживания, выделение и посев моноспоровых изолятов дрожжей – в соответствии с общепринятыми методиками [8, 9]. Выделение ДНК, проведение ПЦР и фрагментного анализа выполняли согласно рекомендациям [10, 11]. Для анализа полиморфизма длин амплифицируемых фрагментов при SSR-генотипировании использовали фрагментный анализ на автоматическом генетическом анализаторе ABIprism 3130. Полученные данные визуализировали в программе Gene Mapper v 4.1. Анализ генетических взаимосвязей проводили методом невзвешенного попарного среднего.

Обсуждение результатов. По результатам микроскопического анализа и оценки комплекса морфологических характеристик было установлено наличие дрожжей рода *Saccharomyces*, а также дрожжей родов *Pichia Hansen*, *Hansenula Sydow*, *Hanseniaspora apiculata*, *Candida mycoderma*, *Brettanomyces Dekkera*, *Debaryomyces Dekkeri (Torulopsis)*, *Schisosaccharomyces acidodevoratus*.

На рисунке 1 представлены примеры колоний дрожжеподобных микроорганизмов, полученных в моноспоровых посевах. Всего были выделены и идентифицированы 16 штаммов винных дрожжей рода

Saccharomyces для последующего изучения. При этом «выход» сахаромицетов составил порядка 30 % от общего количества полученных моноспоровых культур для каждой из точек отбора.



Рис. 1. Морфолого-культуральные типы дрожжеподобных микроорганизмов, полученных в моноспоровых посевах

Для выполнения молекулярно-генетического анализа была проведена экстракция проб ДНК из полученных культур и осуществлено генотипирование с использованием шести SSR-маркеров C6, YLR, C11, YPL009c, C5 и C4, которые используются в мире при решении аналогичных задач. На рисунке 2 приведен пример результатов электрофоретического анализа одного из штаммов экспериментальной выборки с использованием мультиплексного фрагментного анализа.

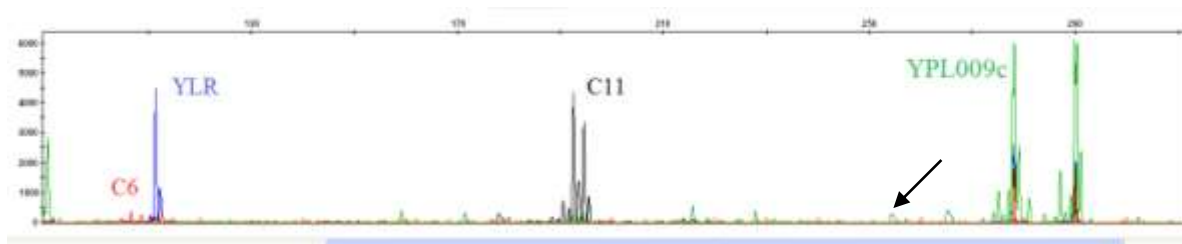


Рис. 2. Результаты фрагментного анализа штамма винных дрожжей по мультиплексному набору, включающему SSR-маркеры C6, YLR, C11, C4, YPL009c

Из рисунка 2 видно, что для каждого SSR-маркера характерен специфичный ему пик на электрофореграмме. В данном мультиплексном наборе SSR маркер С4, меченый красителем ROX, проявил очень низкий уровень амплификации (он не представлен на электрофореграмме, его позиция отмечена стрелкой). Однако, при масштабировании в программе GeneMapper 4.1, его фрагмент идентифицируется.

По результатам анализа были получены микросателлитные фингерпринты для изученных штаммов. На основании данных о наличии/отсутствии аллелей использованных SSR-маркеров выполнили анализ генетических взаимосвязей в выборке штаммов. Дендрограмма, иллюстрирующая степень генетического сходства, представлена на рисунке 3.

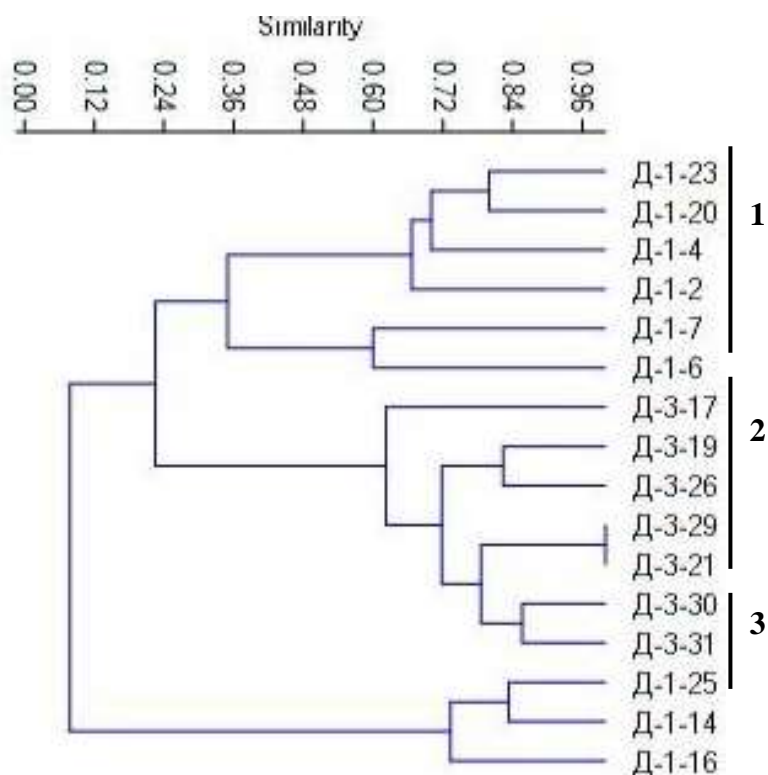


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма, характеризующая степень генетического сходства изученных штаммов сахаромицетов

В работе по изучению генетического разнообразия штаммов винных дрожжей нами для изученных штаммов была введена маркировка, вклю-

чающая номер точки отбора и номер штамма: Д-1-23 = Д-дрожжи; 1 – точка отбора №1; 23 – штамм №23.

На UPGMA дендрограмме видно, что штаммы из точки отбора № 1 (Абрау-Дюрсо – виноградники в окрестностях п. Большие хутора) сгруппированы в два кластера – № 1 и № 3. Штаммы из точки отбора № 3 (Долина Семигорья – виноградники ООО «Имение Сикоры») отнесены в отдельный кластер – № 2. Рассматривая распределение изученных штаммов на дендрограмме, можно предположить два основных вероятных аспекта, которые могли повлиять на такое распределение генетических взаимосвязей.

1) Присутствие элемента географической изоляции – в данном случае виноградники удалены не только дистанционно, но также имеют изоляцию за счет особенностей рельефа горных массивов, располагающихся между ними, что могло оказать большее влияние на изоляцию, нежели расстояние. Учитывая тот факт, что главным вектором-переносчиком дрожжей являются насекомые, можно сделать вывод о присутствии существенного влияния элементов рельефа на их перемещение в пространстве и, соответственно, на перемещение штаммов дрожжей от локации к локации. Это обусловило формирование генетически изолированных популяций.

2) Наличие разделения штаммов из точки отбора № 1 (Абрау-Дюрсо) на два кластера может свидетельствовать о наличии двух групп штаммов, генетически дистанцированных друг от друга. При этом, учитывая тот факт, что штаммы Д-1-25, Д-1-14, Д-1-16 генетически удалены на большее расстояние от остальных штаммов из своей точки отбора, нежели штаммы из точки отбора № 3, можно предположить, что в популяции дрожжей № 1 существует субпопуляция, которая была занесена туда относительно недавно. При этом она имеет значительное генетическое удаление как от популяции № 1, так и от популяции № 3.

Для репрезентативной выборки из изученных штаммов, входящих в разные кластеры, была выполнена оценка двух физиолого-биохимических

показателей, которые являются важными технологическими свойствами – активность дыхания и устойчивость к спирту.

Известно, что дыхание дрожжей в виноградном сусле происходит лишь в некоторой степени на начальных этапах процесса брожения [12, 13, 14]. Между тем, его присутствие важно для активного размножения дрожжей. При наличии растворенного кислорода в сусле брожение заторможено, в этот период происходит набор массы клеток, которые в процессе метаболизма расходуют его остатки, в результате чего запускается бродильный этап. Бродильная активность дрожжей определяет длительность спиртового брожения, физико-химические свойства вина, его биологическую и коллоидную стойкость, а также органолептический профиль и его стабильность при хранении [15, 16, 17].

Таким образом, исследование бродильной и дыхательной активности позволит получить объективные данные о свойствах изучаемых культур дрожжей и целесообразности их применения для производства вин определенной категории качества.

В таблице 1 представлены материалы исследований дыхательной активности исследуемых изолятов дрожжей. Результаты показали, что дыхательная активность постепенно снижается к четвертым суткам брожения. Однако это снижение было различным у изучаемых штаммов. Интересно, что штаммы винных дрожжей Д 3-17, Д 3-19, Д 3-21, Д 3-29, Д 3-30, выделенные при спонтанном сбраживании образца винограда сорта Шардоне из хозяйства «Имение Сикоры», имели более высокие значения активности дыхания на четвёртые сутки по сравнению со штаммами, выделенными из точки отбора № 1. Интенсивное сбраживание сахара виноградного сусла дрожжами коррелировало с низкой дыхательной активностью.

Из данных, полученных по спиртоустойчивости, было выявлено, что штаммы автохтонных дрожжей различались по спиртоустойчивости как между собой, так и в привязке к различным точкам отбора (табл. 2).

Таблица 1 – Активность дыхания, Q_{O_2} мм³ газа на 1 г дрожжей в час

Штамм	Период брожения, сутки			
	1	2	3	4
Д 1-2	8,4	3,6	2,4	0,7
Д 1-4	8,0	3,8	2,6	0,8
Д1-6	8,0	1,7	0,5	0,2
Д1-7	8,0	2,7	1,5	0,4
Д 1-14	8,1	1,2	0,2	0
Д 1-20	8,0	1,5	1,1	0,4
Д 1-23	8,2	2,3	1,6	0,7
Д 1-25	8,3	2,7	1,0	0,3
Д 3-17	7,5	7,6	2,3	1,6
Д 3-19	8,2	4,4	3,5	2,7
Д 3-21	7,7	5,1	3,8	2,6
Д 3-29	7,3	6,4	3,4	2,3
Д 3-30	7,7	8,4	4,1	3,5

Таблица 2 – Спиртоустойчивость штаммов дрожжей, количество колоний

Обозначение штамма	Объемная доля этилового спирта, %										
	5,0	7,5	10,0	12,5	14,0	15,0	16,0	17,0	18,0	19,0	20,0
Д1-2	216	208	208	206	156	122	54	12	2	нет	нет
Д1-6	224	218	216	216	184	148	64	24	6	3	1
Д1-14	215	214	216	204	188	112	52	27	4	нет	нет
Д1-20	215	217	216	207	176	93	46	18	4	нет	нет
Д3-17	215	212	203	176	58	32	14	4	2	нет	нет
Д3-29	216	207	198	132	64	28	11	3	нет	нет	нет
Д3-30	215	210	184	146	47	37	13	2	нет	нет	нет

Большая часть изученных штаммов характеризовалась устойчивостью к этанолу при его содержании до 10 % об. включительно, что соответствует требованиям винодельческого производства [18, 19, 20]. Дальнейшее увеличение концентрации этанола приводило к снижению толерантности дрожжей к спирту, что выражалось в уменьшении количества колоний на среде. При достижении 14 % объемной доли этанола происходило значительное снижение жизнеспособности клеток.

Также были выявлены различия в спиртоустойчивости для штаммов из разных мест отбора. Так, штаммы дрожжей из виноградника хозяйства из точки отбора № 3 (Имение Сикоры) характеризовались меньшей спиртоустойчивостью в сравнении с изолятами из точки отбора № 1 (Абрау-

Дюрсо). Снижение количества колоний этих дрожжей отмечается уже при объёмной доле этанола 12,5 %. На этом этапе разница между точками отбора №1 и №3 в количестве колоний начинает расти более существенно. При этом существенных различий между штаммами, вошедшими в контрастные кластеры 1 и 3, по спиртоустойчивости не было обнаружено.

Заключение. Таким образом, в соответствии с полученными результатами можно сделать вывод о влиянии генетической удаленности изученных штаммов, выявленной по результатам молекулярно-генетического анализа, на их фенотипические характеристики. Однако, учитывая тот факт, что часть штаммов из точки отбора № 1 (штаммы Д-1-25, Д-1-14, Д-1-16) генетически удалены от остальных штаммов из своей точки отбора, но при этом показывают схожие результаты по фенотипическим признакам, то вероятно, что данная закономерность может не всегда иметь место для каких-либо единичных признаков. Тем не менее, оценка генетических дистанций и выявление групп штаммов с наибольшим генетическим сходством может повысить эффективность работы по поиску новых штаммов, так как позволит оптимизировать процесс отбора штаммов для комплексной физиолого-биохимической и технологической оценки. Это будет наиболее востребовано при включении в работу значительных количеств штаммов сахаромицетов – 20-30 и более из одной точки отбора, что позволит уже на первом этапе работы оценить выборку, обладающую максимальным генетическим и фенотипическим разнообразием при минимизации количества образцов в выборке, и даст возможность существенно снизить финансовые и временные затраты при выполнении данного исследования.

Литература

1. Бурьян Н. И. Микробиология виноделия. Ялта, 2002. 433 с.
2. Травникова Е.Э., Скорикова Т.К. Выделение местных рас дрожжей сахаромицетов для приготовления столовых вин // Магарац. Виноградарство и виноделие. 2011. № 4. С. 21-22.

3. Kurtzman C.P, Piškur J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts (in Comparative Genomics: Using Fungi as Models. Sunnerhagen P, Piskur J, eds.). *Berlin: Springer. pp. 29–46.*
4. Barnett J.A. (2003). "Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research". *Microbiology (Reading, Engl.)* 149 (3): 557–567.
5. Schuller D., Cardoso S. Sousa [et al.] Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions // *PLoS ONE*. 2012. 7(2): e32507. doi:10.1371/journal.pone.0032507.
6. Исследование бродильной и дыхательной активности новых штаммов дрожжей, предназначенных для производства белых столовых вин / Агеева Н.М., Насонов А.И., Прах А.В., Супрун И.И. // *Наука Кубани*. 2018. № 2. С. 16-23.
7. Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking / I. S. Pretorius // *Yeast*. – 2000. – № 16. – P. 675–729.
8. Hennequin C., Thierery A., Richard G.F. [et al.] Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. p. 551-559.
9. Бурьян Н.И. Прикладная микробиология. Симферополь: Таврида, 2006. 440 с.
10. Degre R., Thomas D. Y., Ash J. Wine yeast strain identification [et al.] // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1989. – V. 40. – p. 309-315.
11. Апробация метода SSR-анализа для ДНК-паспортизации коммерческих штаммов винных дрожжей / И.И. Супрун, С.В. Токмаков, Н.М.Агеева, А.И. Насонов // *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. – 2017. № 125. С. 151-163.
12. Pretorius I.S., Westhuizen T.J. The impact of yeast genetics recombinant DNA technology on the wine industry // *S. Afr. J. Enol. Vitic.* – 1991. – V. 12. – p. 3-31.
13. Магомедова Е.С., Абдуллабекова Д.А., Абрамов Ш.А. Разнообразие и морфофизиологические свойства дрожжей, обитающих в условиях различной вертикальной поясности // *Юг России: экология, развитие*. 2009. № 1. С. 99-102.
14. Perrot L., Charpentier M., Charpentier C., Feuillat M., Chassagne D. // *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 2002. no. 29. pp. 134–139.
15. Палагина М.В., Ширшова А.А. Обоснование технологии плодовых винома- териалов с учетом выбора дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Современные наукоем- кие технологии*. 2013. № 2. С. 101-102.
16. Esteve-Zarzoso M., Peris-Torán M.J., García-maiquez E., Uruburu F., Querol A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological ageing of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (2001), pp. 2056-2061.
17. Ness, F. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction / F. Ness, F. Lavallee, D. Dubourdiou [et al.] // *J. Sci. Food Agric.* – 1993. – V. 63. – p. 89-94.
18. Valero, E. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts / E. Valero, B. Cambon, D. Schuller, M. Casal, S. Dequin // *FEMS yeast research*. – 2006. – Vol. 7. – №. 2. – P. 317–329.
19. Ciani M., Maccarelli F. Oenological properties of non *Saccharomyces* yeasts as- sociated with wine-making. *World J. Microb. Biot.*, 14 (1998), pp. 199-203.
20. Сборник основных правил, технологических инструкции и нормативных ма- териалов по производству винодельческой продукции. М.: Пищепромиздат. 1998. 370 с.

Reference

1. Bur'yan N. I. *Mikrobiologiya vinodeliya*. Yalta, 2002. 433 s.
2. Travnikova E.E., Skorikova T.K. Vydelenie mestnyh ras drozhzhej saharomicetov dlya prigotovleniya stolovyh vin // *Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie*. 2011. № 4. S. 21-22.

3. Kurtzman C.P, Piškur J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts (in Comparative Genomics: Using Fungi as Models. Sunnerhagen P, Piskur J, eds.). Berlin: Springer. pp. 29–46.
4. Barnett J.A. (2003). "Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research". *Microbiology (Reading, Engl.)* 149 (3): 557–567.
5. Schuller D., Cardoso S. Sousa [et al.] Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions // *PLoS ONE*. 2012. 7(2): e32507. doi:10.1371/journal.pone.0032507.
6. Issledovanie brodil'noj i dyhatel'noj aktivnosti novyh shtammov drozhzhej, prednaznachennyh dlya proizvodstva belyh stolovyh vin / Ageeva N.M., Nasonov A.I., Prah A.V., Suprun I.I. // *Nauka Kubani*. 2018. № 2. S. 16-23.
7. Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking / I. S. Pretorius // *Yeast*. – 2000. – № 16. – R. 675–729.
8. Hennequin C., Thierery A., Richard G.F. [et al.] Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V. 39. p. 551-559.
9. Bur'yan N.I. *Prikladnaya mikrobiologiya*. Simferopol': Tavrida, 2006. 440 s.
10. Degre R., Thomas D. Y., Ash J. Wine yeast strain identification [et al.] // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1989. – V. 40. – p. 309-315.
11. Aprobaciya metoda SSR-analiza dlya DNK-pasportizacii kommercheskih shtammov vinnyh drozhzhej / I.I. Suprun, S.V. Tokmakov, N.M.Ageeva, A.I. Nasonov // *Politematicheskij setevoj elektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2017. № 125. S. 151-163.
12. Pretorius I.S., Westhuizen T.J. The impact of yeast genetics recombinant DNA technology on the wine industry // *S. Afr. J. Enol. Vitic.* – 1991. – V. 12. – p. 3-31.
13. Magomedova E.S., Abdullabekova D.A., Abramov Sh.A. Raznoobrazie i morfologicheskie svoystva drozhzhej, obitayushchih v usloviyah razlichnoj vertikal'noj poyasnosti // *Yug Rossii: ekologiya, razvitie*. 2009. № 1. S. 99-102.
14. Perrot L., Charpentier M., Charpentier C., Feuillat M., Chas-sagne D. // *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 2002. no. 29. rr. 134–139.
15. Palagina M.V., Shirshova A.A. Obosnovanie tekhnologii plodovyh vinomaterialov s uchetom vybora drozhzhej *Saccharomyces cerevisiae* // *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*. 2013. № 2. S. 101-102.
16. Esteve-Zarzoso M., Peris-Torán M.J., García-maiquez E., Uruburu F., Querol A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological ageing of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (2001), pp. 2056-2061.
17. Ness, F. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction / F. Ness, F. Lavalley, D. Dubourdieu [et al.] // *J. Sci. Food Agric.* – 1993. – V. 63. – p. 89-94.
18. Valero, E. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts / E. Valero, B. Cambon, D. Schuller, M. Casal, S. Dequin // *FEMS yeast research*. – 2006. – Vol. 7. – №. 2. – P. 317–329.
19. Ciani M., Maccarelli F. Oenological properties of non *Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J. Microb. Biot.*, 14 (1998), pp. 199-203.
20. *Sbornik osnovnyh pravil, tekhnologicheskikh instrukcii i normativnyh materialov po proizvodstvu vinodel'cheskoj produkcii*. M.: Pishchepromizdat. 1998. 370 s.