

УДК 663.2:663.125

UDC 663.2:663.125

**К ВОПРОСУ БИОСИНТЕЗА КРОТОНОВОГО АЛЬДЕГИДА ВИННЫМИ ДРОЖЖАМИ И МОЛОЧНОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ В ПРОЦЕССЕ ВИНФИКАЦИИ**

**TO THE QUESTION OF BIOSYNTHESIS OF CROTONALDEHYDE OF WINE YEAST AND LACTIC ACID BACTERIA DURING VINIFICATION**

Кушнерева Елена Викторовна  
к.т.н.

Kushnereva Elena Victorovna  
Cand.Tech.Sci.

Агеева Наталья Михайловна  
д.т.н., профессор

Ageeva Natalia Mikhailovna  
Dr.Sci.Tech., professor

Гугучкина Татьяна Ивановна  
д.с.-х.н., профессор  
*Государственное научное учреждение Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства Россельхозакадемии, Краснодар, Россия*

Guguchkina Tatiyana Ivanovna  
Dr.Sci.Agr., professor  
*State Scientific organization North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture and Viticulture of the Russian Academy of agricultural sciences, Krasnodar, Russia*

Статья посвящена исследованию возможных путей образования кротонowego альдегида в винодельческой продукции в результате жизнедеятельности винных дрожжей и молочнокислых бактерий. Установлено, что воздействие выхлопных газов, благородной плесени, возбудителей болезней и вредителей на виноградное растение не приводит к биосинтезу кротонowego альдегида в виноградной ягоде. Представлены экспериментальные данные по выявлению вероятных путей образования кротонowego альдегида в процессе винификации. Оценено влияние исследуемого вещества на жизнедеятельность дрожжей и молочнокислых бактерий

The article investigates the possible pathways for the formation of crotonaldehyde in wine production in the result of the activity of wine yeast and lactic acid bacteria. It established that exposure to exhaust gases, noble rot, pathogens and pests on grape plant does not lead to the biosynthesis of crotonaldehyde in grape berry. The experimental data to identify probable pathways for the formation of crotonaldehyde during vinification has been presented. The effect of the test substance on the life of yeasts and lactic acid bacteria has been estimated

Ключевые слова: КРОТОНОВЫЙ АЛЬДЕГИД, ВИНОГРАД, ВИНО, МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ, ДРОЖЖИ, ВИДОВАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ, БИОСИНТЕЗ

Keywords: CROTONALDEHYDE, GRAPES, WINE, LACTIC ACID BACTERIA, YEAST SPECIES, BIOSYNTHESIS

**Введение:**

Исследование механизма образования токсинов биосистемой дрожжей или молочнокислых бактерий под воздействием параметров и условий сбраживаемых сред в аспектах виноделия в настоящее время является актуальной задачей, поскольку образование и накопление в винодельческой продукции токсичных веществ ведет к нарушению физико-химических свойств продукта и оказывает токсичное действие на организм человека.

В виду высокой токсичности кротонового альдегида [1,2,3] и вероятности его образования в пищевых продуктах [4,5], исследования, направленные на решение фундаментальной проблемы в области пищевой биотехнологии, связанной с повышением качества и экологической безопасности пищевых продуктов, полученных с использованием микроорганизмов, являются актуальными.

Работа выполнена в рамках регионального гранта РФФИ 13-08-96506 р\_юг\_а «Исследование механизмов и закономерностей биосинтеза биогенных аминов и кротонового альдегида биосистемами дрожжей и молочнокислых бактерий».

#### **Объекты и методы исследований:**

Объектами исследований служили виноград, сусло и столовые виноматериалы, приготовленные из винограда белых и красных технических сортов, произрастающих на территории Краснодарского края, а также винные дикие дрожжи, выделенные на виноградниках Краснодарского края.

Образцы винограда отбирали один раз в год во время сбора урожая в августе (2013г.), когда виноград достигает технической зрелости. Грозди винограда снимали в разных точках участка в равных количествах и, соблюдая необходимые меры стерильности, смешивали для получения средней пробы. Отделяли ягоды винограда от грозди, подвергали прессованию, сусло белых сортов и мезгу красных сортов помещали в стерильные 3-х литровые баллоны и сбраживали по белому и красному способу соответственно. С момента спонтанного забраживания мезги до остановки брожения каждые 3 дня проводили высевы на твердую питательную среду OFS агар производства фирмы DÖHLER (Германия). Идентификацию диких дрожжей проводили с помощью секвенирования амплифицированного региона в Научно-производственной компании «Синтол» (г. Москва). Полученные результаты были использованы для

проведения филогенетического анализа с помощью программ MAFFT 6 и MEGA4. Сиквенсы типовых штаммов были использованы из генбанка NCBI [[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)].

В качестве контрольных штаммов микроорганизмов использовали штаммы винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ZYMAFLORE X 5 и АСТIFLORE F 33 (Производитель: Лаффорт энолоджи) и молочнокислых бактерий *Oenococcus oeni* Максифлор (Производитель: «Институт энологии Шампани»).

Содержание кротонового альдегида определяли по методикам, разработанным в научном центре виноделия ГНУ СКЗНИИСиВ Россельхозакадемии:

- методика измерений массовой концентрации кротонового альдегида в продукции винодельческой методом газовой хроматографии СТО 00668034-009-2012 [6]. Настоящий стандарт распространяется на продукцию винодельческую и устанавливает газохроматографический метод определения массовой концентрации кротонового альдегида. Диапазон измеряемых массовых концентраций – от 0,2 до 5,0 мг/дм<sup>3</sup>. Разработанный метод основан на хроматографическом разделении летучих органических примесей, в том числе кротонового альдегида, с использованием капиллярных колонок и последующем детектировании пламенно-ионизационным детектором с применением градуировки методом внутреннего стандарта. Разработанный метод хорошо зарекомендовал себя при анализе алкогольной продукции на наличие кротонового альдегида;

- метод качественного определения присутствия кротонового альдегида в вине [Кушнерева Е.В. Методы определения кротонового альдегида в пищевых продуктах / Е.В. Кушнерева // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета (Научный журнал КубГАУ) [Электронный

ресурс]. – Краснодар: КубГАУ, 2013. – №10(094). – IDA [article ID]: 0941310041. – Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/41.pdf>. Метод основан на взаимодействии кротонового альдегида с сульфаниловой кислотой в присутствии нитрита натрия с образованием окрашенного в желтый цвет красителя и последующем измерении окрашенного продукта реакции при длине волны 435 нм;

Исследования микробиологического состояния опытных вин проводились в соответствии с ГОСТ ISO 7218-2011, ИК 9170-1128-00334600-07.

#### **Экспериментальная часть:**

Целью исследований явилось изучение вероятности биосинтеза кротонового альдегида дрожжами и молочнокислыми бактериями в процессе винификации.

Из возможных причин биосинтеза кротонового альдегида в виноградной ягоде, некоторые авторы указывали [7] выращивание винограда на территории, расположенной вблизи автострады, ботритизация винограда благородной плесенью, болезнями и вредителями [8]. С целью выявления влияния сортовых особенностей винограда, места его выращивания и микробиологического состояния на вероятность биосинтеза кротонового альдегида виноград в стадии технической зрелости белых сортов Шардоне, Алиготе, Рислинг и красных сортов Каберне Совиньон, Достойный, Мерло был подвергнут анализу на наличие кротонового альдегида.

Исследования показали, что близость автострад, развитие на поверхности ягоды благородной плесени, повреждение болезнями и вредителя не приводят к протеканию биосинтетических процессов по образованию и накоплению кротонового альдегида в виноградной ягоде (таблица 1).

Таблица 1 – Анализ опытных образцов винограда и вина на наличие кротонового альдегида

Наименование варианта	Содержание кротонового альдегида
<u>Виноград технический белых сортов</u> - возле автострады - ботритизированный - гнилой	Отсутствует Отсутствует Отсутствует
<u>Виноград технический красных сортов:</u> - возле автострады - ботритизированный - гнилой	Отсутствует Отсутствует Отсутствует
<u>Вино сухое белое</u> - возле автострады - ботритизированный - гнилой	Отсутствует Отсутствует Отсутствует
<u>Вино сухое красное</u> - возле автострады - ботритизированный - гнилой	Отсутствует Отсутствует Отсутствует

Винификация по традиционным технологиям белых и красных сортов винограда исследуемых экспериментальных вариантов также не привела к биосинтезу кротонового альдегида коммерческими штаммами винных дрожжей ZYMAFLORE X 5 (для белых вин), ACTIFLORE F 33 (для красных вин) (таблица 1).

Использованные штаммы винных дрожжей являются коммерческими препаратами, выделенными из одной клетки и специально подобранные путем селекции для определенных типов вин – столовых, шампанских, хересных. Все исходные культуры дрожжей представлены видами *Saccharomyces cerevisiae* или *Saccharomyces bayanus*, выделенными и селекционированными в различных регионах Франции. Данные штаммы получены в процессе гибридизации, без использования ГМО. Эти дрожжи

приспособлены к трудным условиям брожения, свободны от декарбоксилазной активности, обладают низкой способностью к образованию ацетальдегида и других токсичных соединений. В виду того, что на виноградном сусле присутствуют штаммы диких дрожжей, которые могут также развиваться в процессе спиртового брожения, одним из возможных путей образования кротонового альдегида является спонтанное брожение сусла на диких культурах дрожжей. Проведенный скрининг дрожжевых культур, присутствующих на виноградниках Анапской зоны Краснодарского края показал, что основную долю диких дрожжей составляют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, наряду с которыми на поверхности виноградной ягоды присутствуют *Candida zemplina*, *Hanseniaspora uvarum*, *Mechnikowia pulcherrima*.

Поскольку некоторые исследователи указывают на возможность биосинтеза кротонового альдегида винными дрожжами в ходе разложения линолевой кислоты [8], сорбиновой кислоты, этанала [9], пировиноградной кислоты, исследовано влияние на биосинтез кротонового альдегида различных источников его прекурсоров в процессе культивирования диких винных дрожжей, выделенных с ягод винограда.

Для выявления штаммов диких дрожжей, способных к биосинтезу кротонового альдегида в условиях сбраживания виноградного сусла, были приготовлены питательные среды с добавками:

1. линолевая кислота (концентрации: 1, 4, 8, 10 мг/дм<sup>3</sup>)
2. сорбиновая кислота (концентрации: 10, 50, 100, 200, 300, 400 мг/дм<sup>3</sup>)
3. этаналь (ацетальдегид) (концентрации: 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 мг/дм<sup>3</sup>)
4. пировиноградная кислота (концентрации: 0,1, 0,5, 1 г/дм<sup>3</sup>)

Образец стерильного виноградного сусла без внесения добавок использовался в качестве контрольного. Анализ сбраживаемых сред на

присутствие кротонового альдегида проводили дважды: в процессе брожения в момент накопления в среде 4% об. спирта и после выбраживания насухо. В бродящем сусле коммерческие штаммы винных дрожжей образовали 4% об. спирта на 3-и сутки, дикие — значительно позднее: *Saccharomyces cerevisiae* на 6-й день, а *Candida zemplina*, *Hanseniaspora uvarum*, *Mechnikowia pulcherrima* — на 9-й день.

Результаты исследований свидетельствовали об отсутствии процесса биосинтеза кротонового альдегида биосистемами винных дрожжей, как коммерческого штамма, так и выделенных диких дрожжей. Внесение вероятных прекурсоров кротонового альдегида независимо от концентрации также не провоцировало биосинтез исследуемого компонента (таблица 2).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено, что внесение в сбраживаемую среду линолевой кислоты, сорбиновой кислоты, ацетальдегида или пировиноградной кислоты и сбраживание с помощью исследуемых штаммов диких дрожжей не приводит к образованию кротонового альдегида (таблица 2).

Искусственное инфицирование сброженных экспериментальных сред штаммами молочнокислых бактерий *Oenococcus oeni* также не провоцирует биосинтез кротонового альдегида в среде.

В процессе спонтанного спиртового брожения виноградного сусла принимают участие всего лишь 2-3 вида дрожжей [10]. Известно, что между винными дрожжами присутствует такое явление как антогонизм, проявляющийся в выделении антибиотиков или других токсичных соединений, которые угнетающе действуют на микроорганизмы-конкуренты.

Таблица 2 – Результаты исследований влияния видовой принадлежности винных дрожжей и молочнокислых бактерий на биосинтез кротонowego альдегида

Варианты	Коммерческие штаммы винных дрожжей		Винные дикие дрожжи				Коммерческий штамм молочнокислых бактерий
	ZYMAFLORE X 5	ACTIFLORE F 33	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida zemplinia</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Mechnikowia pulcherrima</i>	<i>Oenococcus oeni</i> Максифлор
контроль	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
линолевая кислота с концентрацией:							
1 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
4 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
8 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
10 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
сорбиновая кислота с концентрацией:							
10 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
50 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
100 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
200 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
300 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
400 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
этаналь (ацетальдегид) с концентрацией:							
10 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
20 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
30 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
40 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
50 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
100 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
150 мг/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
пировиноградная кислота с концентрацией:							
0,1 г/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
0,5 г/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
1 г/дм <sup>3</sup>	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

Следовательно, присутствующие в виноградном сусле штаммы диких винных дрожжей в результате спиртового брожения могут в процессе развития антагонизма синтезировать токсичные соединения, такие как кротоновый альдегид. Установлено, что одновременное инкубирование в среде выделенных штаммов диких дрожжей не приводит к образованию и накоплению в сброживаемой среде кротонового альдегида.

Для определения устойчивости штаммов винных дрожжей и молочнокислых бактерий к действию кротонового альдегида были приготовлены питательные среды с добавлением кротонового альдегида до достижения концентрации 0,01, 0,03, 0,06, 0,09, 0,1 мг/дм<sup>3</sup>. Образец без добавления кротонового альдегида использовался в качестве контрольного. Результаты исследования показали, что инкубация образцов в течение 72 часов не приводит к росту исследуемых штаммов, что свидетельствует о чувствительности к действию кротонового альдегида и его вероятный биосинтез даже в минимальных концентрациях биосистемами дрожжей и молочнокислых бактерий в виноделии маловероятен.

#### **Выводы:**

В рамках выполнения научно-исследовательской работы по установлению вероятности образования кротонового альдегида биосистемами винных дрожжей и молочнокислых бактерий выявлено, что штаммы диких винных дрожжей и коммерческие штаммы молочнокислых бактерий не образуют кротоновый альдегид в процессе винификации виноградного сусла.

Оценено влияние исследуемого вещества на жизнедеятельность дрожжей и молочнокислых бактерий с использованием последних достижений биохимии.

**Библиографический список:**

- 1 СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения»
- 2 Eder, E. Acrolein and crotonaldehyd are carcinogenic and mutagenic air, water and food polutans / E. Eder, B.D. Schuler // EUROTOX`95. Abstracts of Satelit symposium. —Pragua, 1995.
- 3 Eder, E. Cancer risk assessment for the environmental mutagen and carcinogen crotonaldehyde on the basis of TD(50) and comparison with 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adduct levels // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. —2001. —10, 8. —P. 883—888.
- 4 Савчук, С.А. Новые методические подходы к контролю качества алкогольной продукции и к выявлению наркотических веществ в биологических средах хроматографическими и хромато-масс-спектрометрическими методами: Автореф. дис. ...д-ра хим. наук. – С.-П., 2012. - 48с.
- 5 Varlet, V. Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurence and mechanisms of formation / V. Varlet, C. Prost, T. Serot / Food Chemistry 105. – 2007. - P. 1536–1556.10 Von Drews B, Specht H, Brfimmer J-M (1965) Branntweinwirtschaft 105:77
- 6 Марковский, М.Г. Кротоновый альдегид: причины образования и методика определения / Марковский М.Г., Гугучкина Т.И., Агеева Н.М. // Биологизация и экологизация технологии производств – приоритетные направления развития виноделия: Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ (Материалы научно-практического форума «Роль экологизации и биологизации в повышении эффективности производства плодовых культур, винограда и продуктов их переработки»), г. Краснодар – 2013. – Том. 4. – С. 185-187.
- 7 Feron, V.J.,Til, H.P.,de Vrijer, F., Woutersen, R.A., Cassee, F.R.& van Bladeren, P.J. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment // Mutat.Res. —1991. —259. —P. 363—385.
- 8 Wolf-Rfidiger Sponholz Analyse und Vorkommen von Aldehyden in Weinen / Z Lebensm Unters Forsch (1982) 174:458-462
- 9 Гроссе, Э. Химия для любознательных. Основы химии и занимательные опыты / Э. Гроссе, Х. Вайсмантиль // Перевод с нем. Л.Н. Исаевой под ред. Р.Б. Добротина и А.Б. Томчина. – Л.: Химия. -1985. – 159 с.
- 10 Бурьян, Н. И. Микробиология виноделия. – Таврия, Симферополь. – 2002. – с.108

**References**

- 1 SanPiN 2.1.4.1074-01 «Pit'evaja voda. Gigienicheskie trebovanija k kachestvu vody centralizovannyh sistem pit'evogo vodosnabzhenija»
- 2 Eder, E. Acrolein and crotonaldehyd are carcinogenic and mutagenic air, water and food polutans / E. Eder, B.D. Schuler // EUROTOX`95. Abstracts of Satelit symposium. —Pragua, 1995.
- 3 Eder, E. Cancer risk assessment for the environmental mutagen and carcinogen crotonaldehyde on the basis of TD(50) and comparison with 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adduct levels // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. —2001. —10, 8. —R. 883—888.
- 4 Savchuk, S.A. Novye metodicheskie podhody k kontrolju kachestva alkogol'noj produkcii i k vyjavleniju narkoticheskikh veshhestv v biologicheskikh sredah hromatograficheskimi i hromato-mass-spektrometriceskimi metodami: Avtoref. dis. ...d-ra him. nauk. – S.-P., 2012. - 48s.
- 5 Varlet, V. Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurence and mechanisms of formation / V. Varlet, C. Prost, T. Serot / Food Chemistry 105. – 2007. - R. 1536–1556.10 Von Drews B, Specht H, Brfimmer J-M (1965) Branntweinwirtschaft 105:77

6 Markovskij, M.G. Krotonovyj al'degid: prichiny obrazovanija i metodika opredelenija / Markovskij M.G., Guguchkina T.I., Ageeva N.M. // Biologizacija i jekologizacija tehnologii proizvodstv – prioritetye napravlenija razvitija vinodelija: Nauchnye trudy GNU SKZNIISiV (Materialy nauchno-praktičeskogo foruma «Rol' jekologizacii i biologizacii v povyšennii jeffektivnosti proizvodstva plodovyh kul'tur, vinograda i produktov ih pererabotki»), g. Krasnodar – 2013. – Tom. 4. – S. 185-187.

7 Feron, V.J., Til, H.P., de Vrijer, F., Woutersen, R.A., Cassee, F.R. & van Bladeren, P.J. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment // Mutat. Res. —1991. —259. —R. 363—385.

8 Wolf-Rfidiger Sponholz Analyse und Vorkommen von Aldehyden in Weinen / Z Lebensm Unters Forsch (1982) 174:458-462

9 Grosse, Je. Himija dlja ljuboznatel'nyh. Osnovy himii i zanimatel'nye opyty / Je. Grosse, H. Vajsmantel' // Perevod s nem. L.N. Isaevoj pod red. R.B. Dobrotina i A.B. Tomchina. – L.: Himija. -1985. – 159 s.

10 Bur'jan, N. I. Mikrobiologija vinodelija. – Tavrija, Simferopol'. – 2002. – s.108