

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ, СЕЛЕКЦИЯ,
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 575.852:577.152.3

ОТБОР ШТАММОВ *Saccharomyces bayanus*
С ВЫСОКОЙ ПЕКТИНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ
И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ *PGU*

© 2022 г. А. Н. Боровкова^{1, 2}, М. Ю. Шаламитский³, Е. С. Наумова¹ *

¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра
микологии и альгологии, Москва, 119234 Россия

³ФГБУН Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства
и виноделия “Магарач” Российской академии наук, Ялта, 298600 Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.12.2021 г.

После доработки 11.01.2022 г.

Принята к публикации 14.01.2022 г.

Впервые проведен масштабный скрининг пектинолитической активности штаммов дрожжей *Saccharomyces bayanus*, изолированных в разных регионах мира из ферментационных процессов и природных источников. Показано, что способность секретировать активную эндополигалактуроназу является видовой особенностью этих дрожжей. Независимо от источника и места выделения штаммы *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus* имели генотип *PGU1b PGU2b PGU3b*. Согласно филогенетическому анализу, пектиназные гены *PGU* гибридных пивных дрожжей *S. pastorianus* происходят от холодоустойчивых дрожжей *S. bayanus*, а не от *S. cerevisiae*. Отобрано пять штаммов *S. bayanus* с наибольшей пектинолитической активностью, которые представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных работ с винными дрожжами.

Ключевые слова: винные дрожжи, *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum*, *Saccharomyces bayanus* var. *bayanus*, *Saccharomyces eubayanus*, эндополигалактуроназа, пектиназа, гены *PGU*, филогенетический анализ

DOI: 10.56304/S0234275822010021

Пектин – полисахарид растительного происхождения, состоящий из соединенных $\alpha(1-4)$ -гликозидной связью остатков галактуронозой кислоты, частично этерифицированной метанолом. Пектиновые вещества, будучи структурным элементом растительных тканей, содержатся во всех высших растениях и способствуют их устойчивости к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Наибольшее количество пектина содержится в ягодах, фруктах и овощах. Содержание пектиновых веществ в ягодах винограда составляет от 0,5 до 5 г/л – в зависимости от сорта. При механическом измельчении богатых пектином плодов получается сок с высокой вязкостью, который остается связанным с мякотью в виде желеобразной массы. Даже незначительное содержание пектиновых веществ в вине может приводить к появлению коллоидных помутнений и засорению фильтров [1].

Гидролиз высокомолекулярных пектиновых соединений растительного происхождения – сложный процесс с участием нескольких ферментов, основным из которых является пектиназа (эндополи-

галактуроназа, К.Ф. 3.2.1.15). Пектинолитические ферменты находят широкое применение в биотехнологии и используются для осветления фруктовых соков и вина, ферментации чая и кофе, очистки растительных волокон и сточных вод, отбеливания бумаги и др. [2–7]. На долю пектиназ приходится около 25% мировых продаж пищевых ферментов и их производство постоянно увеличивается [8]. Наибольшее применение пектинолитические ферменты находят в виноделии и при производстве фруктовых соков. Обработка мезги пектиназами улучшает процесс отделения и осветления сусла, снижает излишнее пенообразование при брожении и улучшает органолептические показатели конечного продукта [9]. Практически все коммерческие ферментные препараты пектиназ получают из мицелиальных грибов *Aspergillus* и *Trichoderma*. Коммерческие препараты грибного происхождения, помимо эндополигалактуроназы, содержат также примеси и ферменты с нежелательной побочной активностью, например пектинэстеразой, которая приводит к повышенному содержанию

токсичного метанола в вине [10]. Дрожжи обычно не секретируют пектиноэстеразу, поэтому их пектиназы безопасны для осветления фруктовых соков и вина [11, 12]. Показано, что использование в виноделии штаммов *Saccharomyces cerevisiae* с эндополигалактуроназной активностью приводит к эффективному осветлению вина и сокращению времени его фильтрации в два раза [9].

Род *Saccharomyces* включает восемь видов: *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. jurei*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* [13–17]. Дрожжи *S. arboricola*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* обладают низкой пектинолитической активностью, тогда как некоторые штаммы *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. jurei* способны активно расщеплять пектиновые соединения [18]. Указанные дрожжи не связаны с хозяйственной деятельностью человека и, как правило, их выделяют из сокоотечений и коры широколиственных деревьев, различных насекомых, почвы и др. В виноделии встречаются два вида *Saccharomyces*: *S. cerevisiae* и *S. bayanus*, – а также межвидовые гибриды различной геномной композиции: *S. cerevisiae* × *S. bayanus*, *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* [19–24].

Дрожжи *S. cerevisiae*, как правило, обладают очень слабой пектинолитической активностью или совсем не способны гидролизировать пектиновые вещества [11, 25, 26]. В то же время среди родственных дрожжей *S. bayanus* встречаются штаммы, способные активно секретировать эндополигалактуроназу [18, 27, 28]. Вид *S. bayanus* имеет сложный состав и включает две разновидности: *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *uvarum* [21, 29]. Специфической экологической нишей дрожжей *S. bayanus* var. *uvarum* является виноградарство и виноделие при пониженных температурах [30]. Эти дрожжи ассоциированы с производством белых, сладких и игристых вин, а также сидра [19, 31–36]. *S. bayanus* var. *bayanus* в основном представлен штаммами, загрязняющими пивоварение [21]. В 2011 году из коры бука в Аргентине выделили родственные дрожжи – *S. eubayanus* [37]. Позднее штаммы *S. eubayanus* обнаружили в Китае [38], США и Канаде [39, 40]. Дрожжи *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum* и *S. eubayanus* частично генетически изолированы, то есть их гибриды имеют низкую выживаемость аскоспор [41]. Европейские пивные дрожжи низового брожения *S. pastorianus* (син. *S. carlsbergensis*) – это межвидовой гибрид *S. cerevisiae* × *S. bayanus*, а их холодостойкость определяется последним видом. Полногеномное секвенирование нескольких штаммов *S. eubayanus* выявило их большое сходство с холодоустойчивым родителем гибридных дрожжей *S. pastorianus* [40, 42, 43].

Цель этой работы – изучение пектинолитической активности дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum* и *S. eubayanus* на материале

штаммов различного экологического и географического происхождения. Отобраны штаммы, обладающие высокой пектинолитической активностью, которые представляют интерес для селекционной работы с винными дрожжами.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Происхождение изученных штаммов дрожжей *S. bayanus* приведено в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°C на полной питательной среде YPD (г/л): дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20, агар – 20. Для приготовления нативной хромосомной ДНК дрожжи выращивали в 15 мл жидкой YPD-среды при 28°C в течение 12–16 ч.

Пектинолитическая активность дрожжей

Скрининг на наличие пектинолитической активности проводили по методике Louw и др. [26] с модификациями. Дрожжи культивировали в течение суток на твердой YPD-среде. Суточные культуры дрожжей с помощью микробиологической петли высевали на минимальную среду с полигалактуроновой кислотой следующего состава (г/л): дрожжевая азотная основа с аминокислотами (Difco, США) – 6.7, полигалактуроновая кислота (Sigma, США) – 12.5, глюкоза – 10, агар (Difco) – 20, Na₂HPO₄ – 6.8 (pH 4.0), – культивировали при 28°C в течение 3 сут. Выросшие колонии дрожжей смывали дистиллированной водой, а затем чашки Петри заливали 6 М раствором HCl на 5–10 мин. Ферментативную активность определяли по четким зонам гидролиза (ореолам) полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей. Чашки Петри фотографировали и определяли размер ореолов с использованием программного обеспечения IC Measure_2.0.0.272 (www.helicon.ru). Для каждого штамма проведено два независимых эксперимента. О степени эффективности гидролиза полигалактуроновой кислоты (пектинолитической активности штаммов) судили по размеру ореолов. В качестве контроля использовали запатентованный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718, обладающий высокой пектинолитической активностью, – экспериментально полученный полиплоид винного штамма Кокур-3 [44].

Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК (молекулярное кариотипирование) и Саузерн-гибридизация

Выделение хромосомной ДНК проводили, как описано ранее [31]. Для разделения хромосомной ДНК использовали аппарат CHEF-DR III (BioRad, США). Образцы помещали в щели 1%-ного агарозного геля. Пульс-электрофорез проводили при 200 В в течение 15 ч при времени переключения

Таблица 1. Происхождение и пектинолитическая активность штаммов *Saccharomyces*
Table 1. Origin and pectinolytic activity of the *Saccharomyces* strains

№ п/п	Штамм ^a	Источник/Место выделения	Диаметр ^b , мм	Номер группы
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i>				
1	CBS 425	Яблочный сок/Швейцария	11.5	2
2	CBS 424	Грушевый сок	13.6	2
3	CBS 380 ^T	Мутное пиво/Европа	14.1	2
4	NBRC 1948	Испорченное пиво/Европа	18.7	3
5	CBS 378	Пиво/Европа	23.7	4
<i>S. bayanus</i> var. <i>uvarum</i>				
6	PJS1.94	Бродящая мезга/Бордо, Сотерн, Франция	0	1
7	SRC410	Яблочный сок/Нормандия, Франция	8.6	1
8	LC1.95	Бродящая мезга/Сансер, Франция	9.1	1
9	RJP1.95	Бродящая мезга/Поули Фюме, Франция	10.4	2
10	RJP11.94	Бродящая мезга/Поули Фюме, Франция	10.5	2
11	UWO(PS) 99-808	Сокотечение бука <i>Nothofagus</i> sp./Патагония, Аргентина	10.7	2
12	BKM Y-362	Токайское вино/Словакия	10.9	2
13	PJS2.95	Бродящая мезга/Сансер, Франция	11.0	2
14	SCU 74	Вино “Мюскаде”/Долина Луары, Франция	11.1	2
15	M300	Красное вино/Ростов, Россия	11.2	2
16	SECT 1369	Вино/Испания	11.4	2
17	SCU 299	Вино “Мюскаде”/Долина Луары, Франция	11.4	2
18	CCY21-31-12	Гриб <i>Amanita citrine</i> /Словакия	11.5	2
19	PYCC 6330	Плодовое тело <i>Cyttaria hariotii</i> /Патагония, Аргентина	11.7	2
20	T4/1	Токайское вино/Венгрия	11.8	2
21	VS2.94	Бродящая мезга/Бордо, Сотерн, Франция	11.8	2
22	DBVPG 1690	Виноград/Италия	12.2	2
23	SRC306	Яблочный сок/Нормандия, Франция	12.4	2
24	I7e1	Виноградный сок/Бордо, Франция	12.4	2
25	SRC55	Яблочный сок/Бретань, Франция	12.7	2
26	SC4	Шампанское/Шампань, Франция	12.7	2
27	Sμ1-5A	Ягоды винограда/Сансер, Долина Луары, Франция	12.7	2
28	IFI 371	Вино/Испания	12.9	2
29	PYCC 6864	<i>Cyttaria gunni</i> на <i>Nothofagus menziesii</i> /Новая Зеландия	13.0	2
30	BKM Y-509	Токайское вино/Словакия	13.1	2
31	SECT 1884	Вино/Испания	13.3	2
32	YPC2.93	Бродящая мезга/Бордо, Сотерн, Франция	13.3	2
33	SRC274	Яблочный сок/Нормандия, Франция	13.3	2
34	ТВПb13.92	Бродящая мезга/Бордо, Сотерн, Франция	13.6	2
35	IFI 373	Вино/Испания	13.7	2
36	IFI 369-4B	Вино/Испания	13.7	2
37	M471	Виноград/Молдавия	13.9	2
38	BKM Y-364	Токайское вино/Словакия	13.9	2
39	148.01	Экссудат вяза <i>Ulmus pumila</i> /Благовещенск, Россия	13.9	2
40	PYCC 6868	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> /перевал Льюиса, Новая Зеландия	14.0	2
41	SCU 397	Вино “Мюскаде”/Долина Луары, Франция	14.2	2
42	PYCC 7082	<i>Cyttaria</i> sp. на <i>Nothofagus dombeyi</i> /Патагония, Аргентина	14.5	2

Таблица 1. Продолжение

№ п/п	Штамм ^а	Источник/Место выделения	Диаметр ^б , мм	Номер группы
43	SCU 197	Вино “Мюскаде”/Долина Луары, Франция	14.5	2
44	136.01	Экссудат вяза <i>Ulmus pumila</i> /Благовещенск, Россия	14.7	2
45	SCU 374	Вино “Мюскаде”/Долина Луары, Франция	15.1	3
46	CBS 377	Грушевое вино/Германия	15.2	3
47	BKM Y-508	Токайское вино/Словакия	15.2	3
48	TBVIc2.95	Бродящая мезга/Бордо, Сотерн, Франция	15.3	3
49	DBVPG 1693	Виноград/Италия	15.5	3
50	CBS 7001	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> /Испания	15.5	3
51	D13	Белое вино/Эльзас, Франция	15.6	3
52	BKM Y-363	Токайское вино/Словакия	15.6	3
53	PYCC 7083	Кора <i>Nothofagus pumillio</i> /Патагония, Аргентина	15.6	3
54	M369	Вино/Словакия	16.0	3
55	PYCC 6867	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> /Новая Зеландия	16.3	3
56	M488	Виноград/Молдавия	16.4	3
57	M478	Виноград/Молдавия	16.6	3
58	SCU 11	Вино “Мюскаде”/Долина Луары, Франция	16.6	3
59	T5/6	Токайское вино/Венгрия	17.0	3
60	BKM Y-1146	Виноград/Мичуринск, Россия	17.2	3
61	DDI4.95	Бродящая мезга/Бордо, Барсак, Франция	17.5	3
62	PYCC 6865	Кора <i>Nothofagus cunninghamii</i> /Тасмания, Австралия	17.7	3
63	PYCC 6869	Кора <i>Nothofagus solandri</i> var. <i>solandri</i> /перевал Льюиса, Новая Зеландия	17.7	3
64	BKM Y-361	Токайское вино/Словакия	17.7	3
65	SCU 13	Вино “Мюскаде”/Долина Луары, Франция	18.0	3
66	SRC258	Яблочный сок/Нормандия, Франция	18.0	3
67	CBS 395 ^T	Сок черной смородины <i>Ribes nigrum</i> /Нидерланды	18.0	3
68	M477	Виноград/Молдавия	18.5	3
69	M489	Виноград/Молдавия	18.6	3
70	T13/30	Токайское вино/Венгрия	18.8	3
71	NCAIM Y-00677	Алкольный напиток/Венгрия	18.9	3
72	SECT 10560	Вино/Испания	19.2	3
73	CBS 8711	Вино/Долина Луары, Тур, Франция	20.1	4
74	M472	Виноград/Молдавия	20.7	4
75	CBS 431	Забродивший сок груш сорта Маркс	23.7	4
76	NCAIM Y-00676	Алкольный напиток/Венгрия	23.8	4
<i>S. eubayanus</i>				
77	PYCC 7088	Почва под <i>Nothofagus pumilio</i> /Аргентина	13.6	2
78	PYCC 7089	Почва под <i>Nothofagus oblique</i> /Аргентина	13.6	2
79	PYCC 7085	Кора <i>Nothofagus antarctica</i> /Аргентина	14.2	2
80	yHKS212	Кора <i>Acer saccharum</i> /Висконсин, США	14.3	2
81	PYCC 7084	<i>Cyttaria harioti</i> на <i>Nothofagus dombeyi</i> /Аргентина	14.7	2
82	PYCC 7087	Почва под <i>Nothofagus pumilio</i> /Аргентина	16.2	3
83	CBS 12357 ^T	<i>Cyttaria harioti</i> /Аргентина	16.6	3
84	yHKS210	Кора <i>Fagus grandifolia</i> /Висконсин, США	17.1	3
85	yHKS211	Кора <i>Fagus grandifolia</i> /Висконсин, США	17.1	3
86	PYCC 7086	Почва под <i>Nothofagus antarctica</i> /Аргентина	18.6	3

Таблица 1. Окончание

№ п/п	Штамм ^а	Источник/Место выделения	Диаметр ^б , мм	Номер группы
		<i>S. pastorianus</i>		
87	CBS 1538	Пиво/Европа	13.2	2
		<i>S. arboricola</i>		
88	CBS 10644 ^T	Кора дуба <i>Quercus fabric</i> /Китай	3.5	1
		<i>S. cariocanus</i>		
89	UFRJ 50816 ^T	<i>Drosophila</i> sp./Бразилия	11.8	2
		<i>S. cerevisiae</i>		
90	CBS 1171 ^T	Пивоварня Ooranjebroom/Нидерланды	0	1
91	ВКПМ Y-718	Полиплоидный мутант штамма Кокур-3, сухое белое вино/Крым	27.0	4
		<i>S. jurei</i>		
92	NCYC 3947 ^T	Кора дуба <i>Quercus robur</i> /Франция	17.2	3
		<i>S. kudriavzevii</i>		
93	NBRC 1802 ^T	Гниющие листья/Япония	5.0	1
		<i>S. mikatae</i>		
94	NBRC 1815 ^T	Почва/Япония	5.0	1
		<i>S. paradoxus</i>		
95	CBS 432 ^T	Кора дуба <i>Quercus</i> sp./Россия	16.2	3

^а Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино (Москва), Россия; ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва, Россия; М – Коллекция микроорганизмов виноделия “Магарах” (КМВ “Магарах”), ФГБУН ВНИИВиВ “Магарах” РАН, Ялта, Россия; CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды; СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia, Валенсия, Испания; ССУ – Culture Collection of Yeasts, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Братислава, Словакия; DBVPG – Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Perugia, Италия; NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation, Токио, Япония; NCAIM – National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Будапешт, Венгрия; NCYC – National Collection of Yeast Cultures, Норидж, Великобритания; PYCC – Portuguese Yeast Culture Collection, Лиссабон, Португалия; SRC – The Yeast Collection of Station de Recherche Cidricoles, Ле-Рё, Франция; UCDFST – Herman J. Phaff Yeast Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, University of California, Дэвис, Калифорния, США; UFRJ – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Бразилия; UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario, Онтарио, Канада; D13, PJP1.95, ТВ1В13.92, ТВ1С2.95, У1С2.93, VS2.94, PJS1.94, LC1.95, PJS2.95, DDI4.95 – штаммы из коллекции Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Вильнав-д’Ормон, Франция; IFI – Instituto de Fermentaciones Industriales, Мадрид, Испания; SCU – Institut Technique de la Vigne et du Vin, Centre d’Expérimentation de Nantes, Нант, Франция; УНКС – штаммы из коллекции Hittinger С.Т., Мэдисон, Висконсин, США. Остальные штаммы из коллекции лаборатории молекулярной генетики дрожжей ФГБУ ГосНИИгенетика НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия. Соответствие штаммов различных коллекций: CBS 8711 = L19, CBS 7001 = МСУС 623, NBRC 1815 = CBS 8839, NBRC 1802 = CBS 8840, NCYC 3947 = CBS 14759, UFRJ 50816 = CBS 8841. Т – типовая культура.

^б Диаметр зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей.

^а Acronyms for culture collections are as follows: VKM – All-Russian Collection of Microorganisms, Moscow, Russia; VKPM – All-Russian Collection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia; M – Magarach Collection of Winemaking Microorganisms, Magarach All-Russian National Institute for Vine and Winemaking, Russian Academy of Sciences, Yalta, Russia; CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands; СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia, Valencia, Spain; ССУ – Culture Collection of Yeasts, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia; DBVPG – Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Perugia, Italy; NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation, Tokyo, Japan; NCAIM – National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest, Hungary; NCYC – National Collection of Yeast Cultures, Norwich, United Kingdom; PYCC – Portuguese Yeast Culture Collection, Lissabon, Portugal; SRC – The Yeast Collection of Station de Recherche Cidricoles, Le Rheu, France; UCDFST – Herman J. Phaff Yeast Culture Collection of the Department of Food Science and Technology, University of California, Davis, California, USA; UFRJ – Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil; UWO (PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario, Ontario, Canada; D13, PJP1.95, ТВ1В13.92, ТВ1С2.95, У1С2.93, VS2.94, PJS1.94, LC1.95, PJS2.95, DDI4.95 – strains from the collection of Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Villenave-d’Ornon, France; IFI – Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid, Spain; SCU – Institut Technique de la Vigne et du Vin, Centre d’Expérimentation de Nantes, Nante, France; УНКС – strains from the collection of Dr. Hittinger С.Т., Madison, Wisconsin, USA. The remaining strains are from the collection of the Laboratory of Molecular Genetics of Yeasts, State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute” (Moscow, Russia); correspondence of strains from different collections: CBS 8711 = L19, CBS 7001 = МСУС 623, NBRC 1815 = CBS 8839, NBRC 1802 = CBS 8840, NCYC 3947 = CBS 14759, UFRJ 50816 = CBS 8841. Т – type culture.

^б Diameter of the polygalacturonic acid hydrolysis zone around yeast colonies.

полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 90 с. В качестве буфера использовали 0.5 × ТВЕ (45 мМ трис, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота, pH 8.0), охлажденный до 14°C. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 (Bio-Rad), имеющий известный порядок и размеры хромосом, служил кариотипическим стандартом. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием в течение 2–3 ч, затем промывали в дистиллированной воде в течение 2 ч и фотографировали в УФ-свете.

Хромосомную ДНК переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя аппарат Vacuum blotter (Bio-Rad). ДНК фиксировали на мембране путем отжига при 80°C в течение 2 ч. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный фрагмент, покрывающий большую часть кодирующей области гена *PGU1b* штамма *S. bayanus* var. *ivarum* CBS 7001. Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием dUTP, меченого дигоксигенином (dig-II-dUTP), из набора DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche, Швейцария), согласно инструкции производителя. Гибридизацию и проявление гибридизационных полос также проводили по инструкции указанной фирмы.

Секвенирование и филогенетический анализ

Для проведения ПЦР использовали ДНК-амплификатор (Bio-Rad). Дрожжевую ДНК выделяли по методике Løoke и др. [45]. Для амплификации пектиназных генов *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b* *S. bayanus* использовали следующие пары праймеров: PGU13/PGU14 (5'-CCACCAACGCAATGATTT-3'/5'-ATGATGCACCTGAGCCAGAT-3'); PGE11/PGE12 (5'-GCTTTATGCGCTTTTGCTGT-3'/5'-AACAGATGGGATGCCAGAA-3') и PGB51/PGB52 (5'-TTTTGCTGTCTCAGCAGCTC-3'/5'-TTCCAGAACAGCCAGAAAAGG-3'). Для амплификации гена *PGU1* *S. cerevisiae* использовали праймеры PGU11 (5'-CACATTTGATGGACAAACGCA-3')/PGU12 (5'-AGGATTAACAGCTTGCACCA-3').

ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 U Taq-полимеразы (“Синтол”, Россия) и 20–200 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 4 мин, затем 35 циклов в режиме: денатурация при 94°C в течение 60 с, отжиг праймеров при 55°C в течение 60 с, синтез ДНК при 72°C в течение 120 с – и завершающая элонгация при 72°C в течение 10 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5 × ТВЕ-буфере в течение 2–3 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в УФ-свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Vilber, Франция). В качестве маркера молекуляр-

ных масс использовали набор 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, США).

Амплифицированные фрагменты элюировали из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Нуклеотидные последовательности генов *PGU* определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 (Applied Biosystems, США). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями *PGU* проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и SGD (<http://www.yeastgenome.org/>). Множественные выравнивания изученных нуклеотидных и гипотетических аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Филогенетические деревья строили методом “ближайшего соседа” (neighbor-joining) в программе MEGA 7 [46]. В качестве внешней группы использовали эндополигалактуроназу Epg1 дрожжей *Kluveromyces marxianus* CBS 6566.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пектинолитическая активность

Для типовой культуры *S. pastorianus* CBS 1538 и 86 штаммов *S. bayanus*, выделенных из различных типов вин, винограда, фруктовых и ягодных соков, а также из природных источников (сокотечение и кора широколиственных деревьев, насекомые, почва и др.), определяли пектинолитическую активность (табл. 1). В качестве контроля использовали полиплоидный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718, обладающий высокой эндополигалактуроназной активностью. Для сравнения также использовали типовые культуры *S. cerevisiae* CBS 1171, *S. arboricola* CBS 10644, *S. cariocanus* UFRJ 50816, *S. kudriavzevii* NBRC 1802, *S. jurei* NCYC 3947, *S. mikatae* NBRC 1815 и *S. paradoxus* CBS 432. В зависимости от диаметра зон гидролиза полигалактуронозой кислоты изученные штаммы *S. bayanus* были разделены на четыре группы: 1) до 10, 2) 10–15, 3) 15–20, 4) более 20 мм (см. табл. 1). Первая группа представлена выделенными во Франции штаммами *S. bayanus* var. *ivarum* LC1.95 (диаметр ореола 9.1 мм) и SRC410 (8.6 мм) – соответственно из бродящей мезги и яблочного сока (табл. 1). Пектинолитическая активность полностью отсутствовала только у одного винного штамма – PJS1.94, – выделенного из бродящей мезги во Франции. Большинство изученных штаммов проявляло достаточно высокую пектинолитическую активность: 44 отнесены к группе 2 и 34 к группе 3. В группу 3 вошло 23 штамма *S. bayanus* var. *ivarum*, выделенных из винограда и

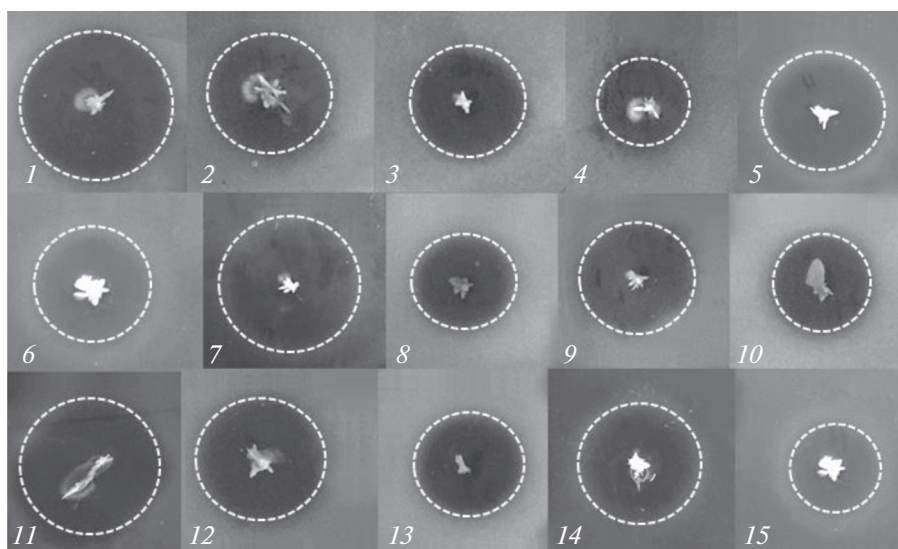


Рис. 1. Скрининг штаммов *Saccharomyces bayanus* на наличие пектинолитической активности на содержащей полигалактуроновую кислоту среде: контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718 (1); *S. bayanus* var. *uvarum* M489 (2), ВКМ Y-361 (3), SCU 197 (4), M472 (5), CBS 395 (6), CBS 431 (7), PYCC 6867 (8), PYCC 6869 (9), PYCC 7083 (10); *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 378 (11), NBRC 1948 (12); *S. eubayanus* CBS 12357 (13), PYCC 7086 (14), уНКС 212 (15). Пунктирной линией обозначены зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей.

Fig. 1. Screening of *Saccharomyces bayanus* strains for the presence of pectinolytic activity on a medium containing polygalacturonic acid: reference strain of *S. cerevisiae* VKPM Y-718 (1); *S. bayanus* var. *uvarum* M489 (2), VKM Y-361 (3), SCU 197 (4), M472 (5), CBS 395 (6), CBS 431 (7), PYCC 6867 (8), PYCC 6869 (9), PYCC 7083 (10); *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 378 (11), NBRC 1948 (12); *S. eubayanus* CBS 12357 (13), PYCC 7086 (14), уНКС 212 (15). Zones of polygalacturonic acid hydrolysis around yeast colonies are shown with dashed lines.

различных вин во Франции, Испании, Венгрии и Словакии, а также 5 природных изолятов (табл. 1, рис. 1, дорожки 2, 3, 6, 8–10). Диаметр ореолов от 15 до 20 мм также зарегистрирован для 5 из 10 изученных штаммов *S. eubayanus* и штамма *S. bayanus* var. *bayanus* NBRC 1948 (18.7 мм) (табл. 1, рис. 1, 12).

Наибольшая пектинолитическая активность обнаружена у 5 штаммов: M472 (20.7 мм), CBS 8711 (20.1 мм), CBS 431 (23.7 мм), NCAIM Y-00676 (23.8 мм) и CBS 378 (23.7 мм) (рис. 1). Первые четыре штамма относятся к *S. bayanus* var. *uvarum*, а последний к *S. bayanus* var. *bayanus* (табл. 1). По степени эффективности гидролиза полигалактуроновой кислоты штаммы CBS 431 (бродящий сок груши), NCAIM Y-00676 (алкогольный напиток) и CBS 378 (пиво) сопоставимы с контрольным штаммом *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718 (27.0 мм). Это тетраплоидный штамм, полученный при воздействии раствора колхицина на диплоидный винный штамм Кокур-3 [44]. Следует отметить, что все изученные нами штаммы *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum* и *S. eubayanus* относятся к диплоидным и представлены фертильными моноспоровыми культурами. Ранее нами установлено, что типовая культура гибридных дрожжей *S. pastorianus* CBS 1538 также диплоидна [21].

Хромосомное картирование генов *PGU* в геноме дрожжей *S. bayanus*

Дрожжи *S. cerevisiae* обладают единственным геном пектиназы – *PGU1*, – расположенным в X-хромосоме [11, 25, 26]. Нами ранее показано, что дрожжи *S. bayanus* var. *uvarum* имеют три гена *PGU*, причем в разной хромосомной локализации: *PGU1b* (хромосома X), *PGU2b* (I) и *PGU3b* (XIV) [18, 47, 48]. Установлено, что сходство нуклеотидных последовательностей гена *PGU1b* с генами *PGU2b* и *PGU3b* составляет 86–87%, а последние два гена идентичны на 96%.

В этой работе мы определили число генов *PGU* в штаммах *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 380, CBS 378, CBS 425, CBS 424, NBRC 1948) и *S. eubayanus* (CBS 12357, PYCC7085, PYCC7084, PYCC7086, PYCC7087, PYCC7088, PYCC7089, уНКС210, уНКС211 и уНКС212). С помощью трех пар праймеров, приведенных в разделе “Условия эксперимента”, из ДНК изученных штаммов были амплифицированы ПЦР-фрагменты, соответствующие генам *PGU1b*, *PGU2b* и *PGU3b*. Саузерн-гибридизация подтвердила наличие трех указанных генов *PGU* в геномах дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus*. Согласно ПЦР-анализу и Саузерн-гибридизации, типовая культура гибридных дрожжей *S. pastorianus* CBS 1538 также имеет три гена. С другой стороны, в геноме CBS 1538 не обнаружено гена *PGU1*, характерного для дрожжей *S. cerevisiae*.

Таким образом, независимо от источника и места выделения, дрожжи *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. eubayanus* имеют генотип *PGU1b* *PGU2b* *PGU3b*. Единственным исключением является французский винный штамм *S. bayanus* var. *ivarum* PJS1.94, обладающий только двумя пектиназными генами: *PGU1b* (хромосома X) и *PGU3b* (XIV) [48]. Интересно отметить, что это единственный из 87 изученных штаммов, не способный гидролизировать полигалактуроновую кислоту (табл. 1).

Филогенетический анализ генов PGU1b дрожжей S. bayanus и кодируемых ими аминокислотных последовательностей

Мы провели секвенирование генов *PGU1b* из 18 штаммов *S. bayanus* различного происхождения и с различной пектинолитической активностью: *S. bayanus* var. *ivarum* (SC4, SRC258, CBS 8711, TBVIC2.95, PJS2.95, СЕСТ 10560, РУСС 6330, РУСС 7082, РУСС 7083), *S. bayanus* var. *bayanus* (CBS 380, CBS 378, NBRC 1948) и *S. eubayanus* (РУСС 7084, РУСС 7085, РУСС 7086, РУСС 7087, РУСС 7088, уHKS 210), а также для типовой культуры *S. pastorianus* CBS 1538. Нуклеотидные последовательности генов *PGU1b* 14 штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* (CBS 7001, CBS 395, CBS 377, M300, ВКМ Y-361, ВКМ Y-1140, NCAIM Y.00677, T5/6, T13/30, PJS1.94, UWO (PS) 99-808.3, ССУ21-31-12, 136.01 и 148.01) и типовой культуры *S. eubayanus* CBS 12357 были взяты из работ [18, 48] и компьютерной базы данных Genbank. Полученные нуклеотидные последовательности имели длину 1077 н., что покрывает большую часть кодирующей области гена *PGU1b*. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей выявил две группы штаммов *S. bayanus* var. *ivarum*, отличающихся 18–20 нуклеотидными заменами. В первую группу попали 16 штаммов, отличающиеся по диаметру зон лизиса полигалактуроновой кислоты, то есть по эндополигалактуроназной активности. Нуклеотидные последовательности гена *PGU1b* в штаммах: PJS1.94 (0 мм), UWO(PS) 99–808.3 (10.7 мм), PJS2.95 (11.0 мм), M300 (11.2 мм), ССУ21-31-12 (11.5 мм), РУСС 6330 (11.7 мм), РУСС 7082 (14.5 мм), CBS 377 (15.2 мм), TBVIC2.95 (15.3 мм), CBS 7001 (15.5 мм), ВКМ Y-1146 (17.2 мм), T5/6 (17.0 мм), ВКМ Y-361 (17.7 мм) и T13/30 (18.8 мм) – идентичны и отличаются одной заменой от *PGU1b*-последовательности штаммов CBS 395 (18.0 мм) и SC4 (12.7 мм). Во вторую группу вошли 9 штаммов: 148.01 (13.9 мм), 136.0 (14.7 мм), ВКМ Y-508 (15.2 мм), РУСС 7083 (15.6 мм), M488 (16.4 мм), СЕСТ 10560 (19.2 мм), SRC258 (18.0 мм), NCAIM Y.00677 (18.9 мм) и CBS 8711 (20.1 мм). Ген *PGU1b* последнего штамма отличается двумя нуклеотидными заменами от остальных штаммов этой группы. Следует отметить, что большинство нуклео-

тидных замен были синонимичными и не влияли на последовательность белка. Последовательности пектиназ штаммов *S. bayanus* var. *ivarum* из двух групп различались только по двум аминокислотам.

Штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* CBS 380 (14.1 мм) и CBS 378 (23.7 мм) имели идентичные нуклеотидные последовательности, которые отличались от гена *PGU1b* штамма NBRC 1948 (18.7 мм) по одной позиции (С–Т), а от гибридных дрожжей *S. pastorianus* CBS 1538 (13.2 мм) по трем позициям: транзисиями А–G, С–Т и трансверсией Т–А. При этом, последовательности пектиназ штаммов *S. bayanus* var. *bayanus* и гибридных дрожжей *S. pastorianus* CBS 1538 были идентичны. Интересно отметить, что нуклеотидные последовательности гена *PGU1b* штамма CBS 1538 и эндополигалактуроназных генов других штаммов *S. pastorianus*, депонированных в GenBank, идентичны, включая как старые коллекционные штаммы CBS 1486, CBS 1503, CBS 1513, так и современные коммерческие пивные дрожжи низового брожения W34/70 и Weihenstephan 34/70. Важно заметить, что в геноме всех указанных штаммов *S. pastorianus* не обнаружено пектиназных генов *S. cerevisiae*-типа. Различия между пектиназными генами штаммов *S. eubayanus* составили от 0 до 5 нуклеотидов, обнаружено 4–7 замен с *S. pastorianus* и 7–10 замен с *S. bayanus* var. *bayanus*. Нуклеотидные последовательности генов *PGU1b* *S. bayanus* var. *ivarum* и *S. bayanus* var. *bayanus*/*S. eubayanus* отличались более чем по 80 позициям, а *S. bayanus* и остальных 7 видов рода *Saccharomyces* (*S. arboricola* CBS 10644, *S. cariocanus* UFRJ50816, *S. jurei* NCYC 3947, *S. cerevisiae* CBS 1171, *S. kudriavzevii* NBRC 1802, *S. mikatae* NBRC 1815 и *S. paradoxus* CBS 432) – более чем по 190.

По полученным нуклеотидным последовательностям генов *PGU* были определены аминокислотные последовательности кодируемых ими белков. На основании анализа аминокислотных последовательностей построено филогенетическое древо (рис. 2).

В качестве внешней группы использовали эндополигалактуроназу Epg1 дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. На филогенетическом древе выделяются два основных кластера. В первом кластере с 97%-ной статистической достоверностью объединены пектиназы *S. bayanus* var. *ivarum*, *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. eubayanus* и гибридных пивных дрожжей *S. pastorianus*, которые идентичны на 94–99%. Наибольшее сходство имеют белки полигалактуроназ последних трех таксонов: 99–100%.

Второй кластер сформировали остальные 7 видов *Saccharomyces*. Внутри этого кластера выделяются два подкластера. Первый образован белками дрожжей *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus* – их сходство составляет 97–98%. Второй подкластер объединяет дрожжи *S. mikatae* и *S. jurei*, эндопо-

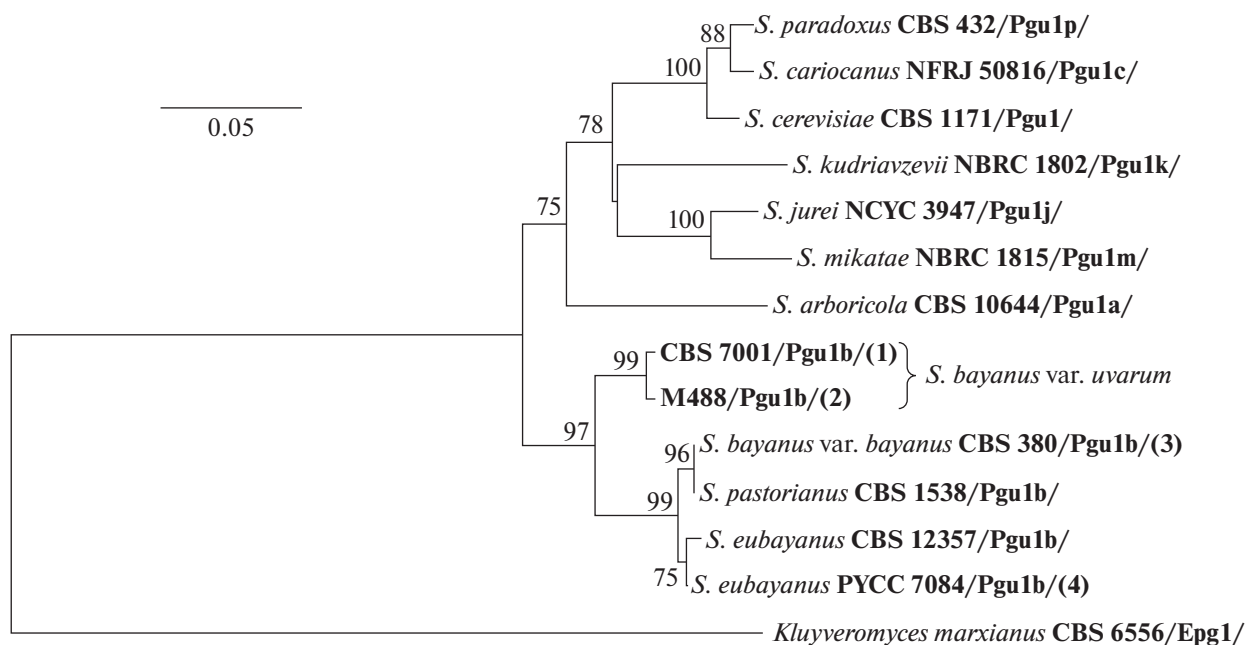


Рис. 2. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей эндополигалактуроназ (Pgu) дрожжей *Saccharomyces bayanus* и других видов рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована эндополигалактуроназа Epg1 дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приведены значения бутстрепа > 70%. Шкала соответствует 50 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – M300, VKM Y-1146, T5/6, T13/30, UWO (PS)99-808, PYCC6330, PYCC7082, CCY21-31-12, CBS377, PJS1.94, PJS2.95, TBVIC 2.95, VKM Y-361, SC4; (2) – 136.01, 148.01, NCAIM Y.00677, VKM Y-508, CBS 8711, СЕСТ 10560, SRC258, PYCC7083; (3) – NBRC1948; (4) – yHKS210, PYCC7085, PYCC7086, PYCC7087, PYCC7088.

Fig. 2. Phylogenetic analysis of endo-polygalacturonase amino acid sequences of *Saccharomyces bayanus* and other species of the genus *Saccharomyces*. Endo-polygalacturonase of *Kluyveromyces marxianus* (Epg1) was used as an outgroup. The tree shows bootstrap support values higher than 70%. The scale bar corresponds to 50 amino acid substitutions per 1 000 amino acid positions. The numbers in brackets indicate groups of strains with identical amino acid sequences: (1) – M300, VKM Y-1146, T5/6, T13/30, UWO (PS)99-808, PYCC6330, PYCC7082, CCY21-31-12, CBS377, PJS1.94, PJS2.95, TBVIC 2.95, VKM Y-361, SC4; (2) – 136.01, 148.01, NCAIM Y.00677, VKM Y-508, CBS 8711, СЕСТ 10560, SRC258, PYCC7083; (3) – NBRC1948; (4) – yHKS210, PYCC7085, PYCC7086, PYCC7087, PYCC7088.

лигалактуроназы которых идентичны на 96%. К этому подкластеру примыкает пектиназа Pgu1k *S. kudriavzevii*: 88–92% сходства. Ко второму кластеру примыкает белок Pgu1a дрожжей *S. arboricola*, который идентичен соответствующим белкам *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* на 87–88%. Сходство эндополигалактуроназ дрожжей *S. bayanus* и остальных видов *Saccharomyces* составило 86–88%.

Таким образом, на основании результатов филогенетического анализа можно судить о видоспецифичности генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces*. Так, гены *PGU* гибридных пивных дрожжей *S. pastorianus*, по-видимому, происходят от холодоустойчивых дрожжей *S. bayanus*, а не от *S. cerevisiae*. Это хорошо согласуется с тем, что дрожжи *S. bayanus* встречаются в пивоварении, а пивные дрожжи *S. cerevisiae* не обладают пектинолитической активностью. Например, выделенная из пивоварения типовая культура *S. cerevisiae* CBS 1171 не способна расщеплять пектин (табл. 1). Все изученные нами штаммы *S. bayanus* обладали достаточно

высокой пектинолитической активностью, что, по-видимому, является видовой особенностью этих дрожжей. Независимо от источника и места выделения изученные штаммы *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. eubayanus* имели генотип *PGU1b PGU2b PGU3b*. Исключением является французский винный штамм *S. bayanus* var. *uvarum* PJS1.94, имеющий генотип *PGU1b PGU3b* и не способный разлагать полигалактуроновую кислоту.

Штаммы M472, CBS 8711, CBS 431, NCAIM Y-00676 и CBS 378, секретирующие активную эндополигалактуроназу, представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных работ, в том числе по созданию новых винных штаммов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А20-120093090015-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van Rensburg P., Pretorius I.S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalyst for efficient biotransformations – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21(1), 52–73. <https://doi.org/10.21548/21-1-3558>
2. Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. Applications of pectinases in commercial sector: a review. *Bioresour. Technol.*, 2001, 77(3), 215–227. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8)
3. Hoondal G.S., Tiwari R.P., Tewari R., et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 59, 409–418. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1061-1>
4. Jayani R.S., Saxena S., Gupta R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.*, 2005, 40, 2931–2944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.026>
5. Masoud W., Høj Kaltoft Ch. The effects of yeasts involved in the fermentation of Coffea Arabica in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, 106(2), 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.015>
6. Rebello S., Anju M., Aneesh E.M., et al. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 2017, 16(3), 381–394. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9437-y>
7. Amin F., Nawaz Bhatti H., Bilal M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases – a review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, 122, 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.048>
8. Global Pectinase Market Research Report. <https://dataintel.com/report/pectinase-market/>
9. Blanco P., Sieiro C., Villa T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 175(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13595.x>
10. Louw C., La Grange D., Pretorius I.S., van Rensburg P. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavor. *J. Biotechnol.*, 2006, 125, 447–461. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.029>
11. Fernández-González M., Úbeda J.F., Vasudevan T.G., et al. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, 237, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.042>
12. da Silva E.G., de Fátima Borges M., Medina C., et al. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Res.*, 2005, 5, 859–865. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2005.02.006>
13. Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S., et al. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, 50(Pt. 5), 1931–1942. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-5-1931>
14. Kurtzman C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vandervatozyma* and *Zygorulaspota*. *FEMS Yeast Res.*, 2003, 4, 233–245. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00175-2)
15. Wang S.A., Bai F.Y. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2008, 58, 510–514. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.65331-0>
16. Vaughan-Martini A., Martini A. *Saccharomyces* Meyen ex Rees (1870). In: The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th edition. Eds Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam, Elsevier, 2011, 2, 733–746. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00061-6>
17. Naseeb S., James S.A., Alsammar H., et al. *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2017, 67, 2046–2052. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002013>
18. Наумова Е.С., Боровкова А.Н., Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Природный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. *Микробиология*, 2021, 90(3), 344–356. <https://doi.org/10.31857/S0026365621030113>
19. Naumov G.I., Masneuf-Pomarede I., Naumova E.S., et al. Association of *S. bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.*, 2000, 151(8), 683–691. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)90131-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)90131-1)
20. Naumov G.I., Naumova E.S., Masneuf I., et al. Natural polyploidization of some cultured yeast *Saccharomyces sensu stricto*: auto- and allotetraploidy. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, 23(3), 442–449. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80076-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80076-4)
21. Naumova E.S., Naumov G.I., Masneuf-Pomarede I., et al. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast*, 2005, 22, 1099–1115. <https://doi.org/10.1002/yea.1298>
22. González S.S., Barrio E., Gafner J., Querol A. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res.*, 2006, 6(8), 1221–1234. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00126.x>
23. Le Jeune C., Lollier M., Demuyter C., et al. Characterisation of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res.*, 2007, 7(4), 540–549. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00207.x>
24. Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярная диагностика винных дрожжей гибридного происхождения: *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii*. *Биотехнология*, 2009, 2, 21–28.
25. Divol B., Rensburg P. *PGU1* gene natural deletion is responsible for the absence of endo-polygalacturonase activity in some wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2008, 7(8), 1328–1339. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00284.x>

26. Louw C., Young P.R., van Rensburg P., Divol B. Epigenetic regulation of *PGU1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2010, 10, 158–167. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00599.x>
27. Gainvors A., Frézier V., Lemarasquier H., et al. Detection of polygalacturonase, pectinlyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 1994, 10, 1311–1319. <https://doi.org/10.1002/yea.320101008>
28. Gognies S., Gainvors A., Aigle M., Belarbi A. Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (*PGL 1*). *Yeast*, 1999, 15, 11–22. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990115\)15:1<11::AID-YEA336>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990115)15:1<11::AID-YEA336>3.0.CO;2-O)
29. Наумов Г.И. Новая разновидность *S. bayanus* var. *ivarum*, установленная генетическим анализом. *Микробиология*, 2000, 69(2), 410–414.
30. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Маснёф-Помаред И. Таксономия, экология и генетика дрожжей *Saccharomyces bayanus* – нового объекта в науке и практике. *Микробиология*, 2011, 80(6), 723–730. <https://doi.org/10.1134/S0026261711060154>
31. Naumov G.I., Naumova E.S., Gaillardin C. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and Italy. *Syst. Appl. Microbiol.*, 1993, 16(2), 274–279. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80480-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80480-7)
32. Naumov G.I., Nguyen H.V., Naumova E.S., et al. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum*, a cider-fermenting yeast. *Int. J. Food Microbiol.*, 2001, 65(3), 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00515-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00515-8)
33. Naumov G.I., Naumova E.S., Antunovics Z., Sipiczki M. *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 59, 727–730. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1077-6>
34. Panon G., Massiot P., Drilleau J.-F. Production d'enzymes pectinolytiques par les levures d'intérêt cidricole. *Sci. Aliments*, 1995, 15, 31–42.
35. Torriani S., Zapparoli G., Suzzi G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. Diversity of *Saccharomyces* strains from Amarone wine. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1999, 75(3), 207–215. <https://doi.org/10.1023/a:1001773916407>
36. Rementeria A., Rodriguez J.A., Cadaval A., et al. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, 86, 201–207. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00289-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00289-7)
37. Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., et al. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108, 14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>
38. Bing J., Bing J., Han P.J., et al. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Curr. Biol.*, 2014, 24, 380–381. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.031>
39. Peris D., Sylvester K., Libkind D., et al. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Mol. Ecol.*, 2014, 23, 2031–2045. <https://doi.org/10.1111/mec.12702>
40. Peris D., Langdon Q.K., Moriarty R.V., et al. Complex ancestries of lager-brewing hybrids were shaped by standing variation in the wild yeast *Saccharomyces eubayanus*. *PLoS Genet.*, 2016, 12, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006155>
41. Наумов Г.И. Генетическое родство и биологический статус индустриально важных дрожжей *Saccharomyces eubayanus* Sampaio et al. *ДАН*, 2017, 473(5), 622–625. <https://doi.org/10.7868/S0869565217110263>
42. Baker E., Wang B., Bellora N., et al. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of Lager-brewing yeasts. *Mol. Biol. Evol.*, 2015, 32(11), 2818–31. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv168>
43. Eizaguirre J.I., Peris D., Rodríguez M.E., et al. Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environ. Microbiol.*, 2018, 20(10), 3732–3743. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14375>
44. Имшенецкий А.А., Кондратьева Т.Ф., Линькова М.А. и др. Полиплоидный штамм дрожжей *Saccharomyces vini*, используемый для приготовления столовых вин. Патент RU 1495368, опубл. 23.07.1989, Бюлл. №27
45. Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR based applications. *Biotechniques*, 2011, 50, 325–328. <https://doi.org/10.2144/000113672>
46. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
47. Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Новое семейство пектиназных генов *PGU1b–PGU3b* у пектинолитических дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum*. *ДАН*, 2016, 467(1), 109–111. <https://doi.org/10.7868/S0869565216070276>
48. Наумова Е.С., Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum*. *Биотехнология*, 2019, 35(2), 30–37. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-2-30-37>

Selection of *Saccharomyces bayanus* Strains with High Pectinolytic Activity and Phylogenetic Analysis of *PGU* Genes

A. N. Borovkova^{a, b}, M. Yu. Shalamitskii^c, and E. S. Naumova^{a, *}

^aState Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, "Kurchatov Institute" National Research Center, Moscow, 117545 Russia

^bFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^cAll-Russian National Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach", Russian Academy of Sciences, Yalta, 298600 Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Abstract—For the first time, a large-scale screening has been carried out of pectinolytic activity in *Saccharomyces bayanus* strains isolated in various regions of the world from fermentation processes and natural sources. The ability to secrete active endo-polygalacturonase was shown to be a feature of this species. Regardless of the source and place of isolation, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S. bayanus* var. *bayanus* and *S. eubayanus* have the *PGU1b PGU2b PGU3b* genotype. According to phylogenetic analysis, the pectinase genes (*PGU*) of the hybrid brewer's yeast *S. pastorianus* are originated from the cryophilic *S. bayanus* yeast and not from *S. cerevisiae*. Five selected *S. bayanus* strains with the highest pectinolytic activity are promising for further molecular genetic studies and breeding of wine yeasts.

Keywords: wine yeasts, *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, *Saccharomyces bayanus* var. *bayanus*, *Saccharomyces eubayanus*, endo-polygalacturonase, pectinase, *PGU* genes, phylogenetic analysis