_____ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ____ СТАТЬИ

ПРИРОДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПЕКТИНАЗНЫХ ГЕНОВ *PGU* ДРОЖЖЕЙ РОДА *SACCHAROMYCES*

© 2021 г. Е. С. Наумова^{*a*, *}, А. Н. Боровкова^{*a*, *b*}, М. Ю. Шаламитский^{*c*}, Г. И. Наумов^{*a*}

^аГосударственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский Институт", Москва, 117519 Россия

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

^с Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия "Магарач" Российской академии наук, Ялта, 298600 Россия

> *e-mail: lena_naumova@yahoo.com Поступила в редакцию 11.12.2020 г. После доработки 12.01.2021 г. Принята к публикации 22.01.2021 г.

Изучено распространение и особенности пектиназных генов PGU у дрожжей Saccharomyces разной видовой принадлежности. С помощью молекулярного кариотипирования и Саузерн-гибридизации установлено, что дрожжи S. arboricola, S. cariocanus, S. cerevisiae, S. kudriavzevii и S. paradoxus обладают только одним геном PGU, расположенным в хромосоме Х. У остальных трех видов обнаружены полимерные гены PGU разной хромосомной локализации: S. mikatae и S. jurei (хромосомы X и VIII), S. bayanus (X, I и XIV). Впервые проведен сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов PGU у всех восьми видов рода Saccharomyces. Обнаружена видоспецифичность генов PGU, а также их внутривидовой полиморфизм у дрожжей S. kudriavzevii и S. paradoxиз, связанный с географическим происхождением штаммов. Наиболее дивергентными являются белки Pgula (S. arboricola) и Pgulb, Pgu2b, Pgu3b (S. bayanus), уровень сходства которых с белками Pgu остальных видов Saccharomyces не превышал 89%. Наибольшее сходство (>95%) отмечено для белков Pgu S. cerevisiae, S. paradoxus и S. cariocanus, а также S. mikatae и S. jurei. Наблюдался значительный внутривидовой полиморфизм секреции эндо-полигалактуроназы у изученных видов Saccharomyces. Исключением является вид S. bayanus, все изученные штаммы которого обладали достаточно высокой активностью. По-видимому, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью этих дрожжей.

Ключевые слова: дрожжи *Saccharomyces*, гены *PGU*, пектиназа, эндо-полигалактуроназа, пектин, филогенетический анализ, молекулярное кариотипирование **DOI:** 10.31857/S0026365621030113

Пектин – полисахарид растительного происхождения, состоящий из соединенных между собой α(1-4)-гликозидной связью остатков галактуроновой кислоты, присутствующих в виде метилового эфира. Являясь структурным элементом растительных тканей, пектин способствует устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Содержание пектиновых веществ в ягодах винограда зависит от сорта и составляет от 0.5 до 5 г/л. Известно, что даже незначительное содержание пектиновых веществ в вине может приводить к появлению коллоидных помутнений и засорению фильтров (Van Rensburg, Pretorious, 2000). Расщепление высокомолекулярных пектиновых веществ растительного происхождения является сложным процессом с участием нескольких ферментов, основным из которых является пектиназа (эндо-полигалактуроназа, К.Ф. 3.2.1.15). В виноделии для биохимического гидролиза пектиновых соединений используют коммерческие, как правило, неочищенные ферментные препараты грибов *Aspergillus* и *Trichoderma*, в которых, помимо эндо-полигалактуроназы, могут присутствовать примеси и ферменты с нежелательной побочной активностью, например, пектин-эстеразной, приводящей к повышенному содержанию метанола в вине (Louw et al., 2006). В этой связи, целесообразно в качестве стартовых культур в виноделии использовать штаммы сахаромицетов, обладающие высокой пектинолитической активностью.

Род Saccharomyces включает восемь видов: S. cerevisiae, S. arboricola, S. cariocanus, S. bayanus, S. kudriavzevii, S. jurei, S. mikatae и S. paradoxus

(Naumov et al., 2000a; Kurtzman, 2003; Wang, Bai, 2008; Vaughan-Martini, Martini, 2011; Naseeb et al., 2017). Традиционно в виноделии используются дрожжи S. cerevisiae, для которых не характерна пектинолитическая активность (Fernández-González et al., 2004; Divol, Rensburg, 2007; Louw et al., 2010). Большинство изученных штаммов этого вида не способны расшеплять пектин или обладают очень слабой пектинолитической активностью. Это может быть связано с мутациями в кодируюшем эндо-полигалактуроназу структурном гене PGU1 (псевдоген), его полным отсутствием или с мутациями в регуляторных генах. Высокой пектинолитической активностью обладает французский шампанский штамм SCPP (Gainvors et al., 1994; Gognies et al., 1999), который, согласно гибридологическому и кариотипическому анализам, относится к виду S. bayanus (Naumov et al., 2001а). В отличие от штаммов S. cerevisiae, имеющих по одному гену PGU, дрожжи S. bavanus обладают тремя полимерными генами PGU1b. PGU2b и PGU3b (Наумов и соавт., 2016а, 2016b; Наумова и соавт., 2019). В отличие от S. cerevisiae, дрожжи S. bavanus способны расти при пониженных температурах и часто выделяются при более позднем сборе ягод винограда (Naumov, 1996; Наумов и соавт., 2011). Доказана большая роль этих дрожжей в производстве белых, сладких и игристых вин, а также сидра (Naumov et al., 1993, 2000b, 2001b, 2002; Panon et al., 1995; Torriani et al., 1999; Rementeria et al., 2003). Вид S. paradoxus встречается повсеместно, его штаммы часто выделяются из сокотечений широколиственных деревьев, насекомых, неокультуренных почв, листьев растений и гораздо реже с различных ягод, включая виноград. Недавно показано, что выделенный с виноградников в Хорватии штамм S. paradoxus RO88 характеризуется высокой пектинолитической активностью (Eschstruth, Divol, 2011).

Ничего не известно о пектинолитической активности остальных видов рода *Saccharomyces*: *S. arboricola, S. cariocanus, S. kudriavzevii, S. jurei* и *S. mikatae.* Эти дрожжи выделяются из различных природных источников: в разных регионах мира. Интересно отметить, что многие коммерческие штаммы, используемые в виноделии Франции, Испании, Австрии, Швейцарии и Австралии, являются межвидовыми гибридами с участием дрожжей *S. kuriavzevii: S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* (Naumova et al., 2005; Pérez-Torrado et al., 2018).

Целью настоящего исследования является изучение распространения и особенностей пектиназных генов *PGU* разных видов рода *Saccharomyces* на материале штаммов различного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Происхождение изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces* приведено в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°C на полной среде YPD состава (г/л): бакто-агар – 20, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10, пептон – 20.

Пектинолитическая активность. Скрининг на наличие пектинолитической активности осуществляли согласно Louw et al. (2010) в нашей модификации. Дрожжи культивировали в течение 1 сут на твердой YPD среде. Суточные культуры дрожжей уколом микробиологической петли высевали на минимальную среду с полигалактуроновой кислотой (PG) следующего состава (г/л): дрожжевая азотная основа с аминокислотами ("Difco", США) - 6.7, полигалактуроновая кислота ("Sigma", США) – 12.5, глюкоза – 10, агар ("Difco", CIIIA) - 20, Na₂HPO₄, - 6.8 (pH 4.0). Культивировали при 28°С в течение 3 сут, затем выросшие колонии дрожжей смывали дистиллированной водой и визуализацию производили 6 М раствором HCl. Ферментативную активность определяли по четким зонам гидролиза (ореолам) полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей. Чашки Петри фотографировали и определяли размер ореолов с помощью ПО ІС Measure 2.0.0.272 (www.helicon.ru). Для каждого штамма были проведены два независимых эксперимента. Размер ореолов указывал на способность различных штаммов разлагать полигалактуроновую кислоту. В качестве контроля использовали запатентованный штамм S. cerevisiae ВКПМ Y-718, обладающий высокой пектинолитической активностью (Патент SU 1495368). Этот штамм является экспериментально полученным полиплоидом винного штамма Кокур-3.

Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК и Саузерн-гибридизация. Приготовление препаратов хромосомных ДНК описано ранее (Наумова и соавт., 1993). Электрофоретическое разделение хромосомных ДНК проводили на аппарате CHEF-DR III ("Bio-Rad", США) при 200 В в следующем режиме: 15 ч при времени переключения полей 60 с и 8 ч при времени переключения полей 90 с. В качестве буфера использовали 0.5× ТВЕ (45 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 10 мМ EDTA, 45 мМ борная кислота), охлажденный до 14°С. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в УФ-свете. В качестве кариотипического стандарта использовали штамм S. cerevisiae YNN 295 ("Bio-Rad", США), имеющий известный порядок и размеры хромосом.

После пульс-электрофореза хромосомные ДНК переносили вакуумным методом на нитроцеллюлозную мембрану на аппарате "Vacuum blotter" ("Bio-Rad", США). ДНК фиксировали на мембране отжигом при 80°С в течение 2 ч. В каче-

|--|

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*
-	S. arboricola	
CBS 10644 (T)	Кора дуба <i>Quercus fabric</i> , Китай	3.5
AS 2.3319	Кора каштана Castanopsis orthacantha, Китай	5.0
AS 2.3318	Кора каштана Castanopsis orthacantha, Китай	8.9
NRRL Y-63703	Плодовое тело Auricularia polytricha, Тайвань	6.1
	S. bayanus	
CBS 7001	Ручейник Mesophylax adopersus, Испания	15.5
UWO(PS) 99-808	Нектар Nothofagus sp., Патагония, Аргентина	10.7
148.01	Экссудат вяза Ulmus pumila, Благовещенск, Россия	13.9
PYCC 6866	Kopa Nothofagus cunninghamii, Тасмания, Австралия	14.6
TBVIc2.95	Бродящая мезга, Бордо, Сотерн, Франция	15.3
PYCC 6330	Плодовое тело Cyttaria hariotii, Патагония, Аргентина	11.7
M300	Красное вино, Ростов, Россия	11.2
D13	Белове вино, Эльзас, Франция	15.6
BKM Y-1146	Виноград, Мичуринск, Россия	17.2
DDI4.95.4A	Бродящая мезга, Бордо, Барсак, Франция	17.5
T5/6	Токайское вино, Венгрия	17.0
T13/30	Токайское вино, Венгрия	18.8
BKM Y-361	Токайское вино, Словакия	17.6
CBS 395	Сок черной смородины <i>Ribes nigrum</i> , Нидерланды	18.0
CBS 8711	Вино, долина Луары, Тур, Франция	20.1
NCAIM Y.00676	Алкогольный напиток, Венгрия	23.8
NCAIM Y.00677	Алкогольный напиток, Венгрия	18.9
	S. cariocanus	
UFRJ 50816 (T)	Drosophila sp., Бразилия	11.8
UFRJ 50791	Drosophila sp., Бразилия	14.6
	S. cerevisiae	
CBS1171 (T)	Пивоварня Oranjeboom, Роттердам, Нидерланды	0
YNN 295	Генетическая линия	0
S288C	Генетическая линия	0
BKM Y-502	Виноград, Дальний Восток	0
КБП-3793	Виноград, Белоруссия	0
M435	Виноградное сусло, Закарпатская область, Украина	0
SRC 120	Сидр, Бретань, Франция	0
DDI27.95	Бродящая мезга, Барсак, Франция	0
CECT 10484	Альпехин, Испания	0
CBS 7962	Бродящий сироп из сахарного тростника, Бразилия	0
M212	Шампанское, Украина	6.5
MUCL 30909	Ферментированная маниока, Бурунди, Африка	11.4
CECT 10485	Альпехин, Испания	13.7
GIV 51	Вино, Грузия	13.9
ATCC 66812	Альпехин, Греция	14.3
BKM Y-1553	Виноградная лоза, Братислава, Словакия	15.4
BKM Y-1554	Виноградное сусло, Словакия	15.6
ВКПМ Ү-4748	Ягоды винограда, Дагестан, Россия	17.5

346

Таблица 1. Продолжение

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*
ВКПМ Ү-718	Полиплоидный мутант штамма Кокур-3, сухое белое вино, Крым	27.0
	S. jurei	'
NCYC 3947 (T)	Кора дуба <i>Q. robur</i> , Франция	17.2
NCYC 3962	Кора дуба <i>Q. robur</i> , Франция	14.7
	S. kudriavzevii	·
NBRC 1802 (T)	Гниющие листья, Япония	5.0
NBRC 1803	Гниющие листья, Япония	12.5
NBRC 10991	Гниющие листья, Япония	0
NBRC 10990	Почва, Япония	7.8
PYCC 5979	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	6.1
PYCC 5977	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	6.7
ВКПМ Ү-4736	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Португалия	8.5
TJ13M05	Bolbitius sp., Хуалянь, Тайвань	5.0
NRRL Y-63706	Почва, Хуалянь, Тайвань	8.9
ES14S09	Почва, Наньтоу, Тайвань	9.9
TJ11S04	Почва, Хуалянь, Тайвань	10.9
NRRL Y-63705	Почва, Гаосюн, Тайвань	11.1
NRRL Y-63704	Листья Eupatorium tashiroi, Гаосюн, Тайвань	10.7
PYCC 5978	Дуб <i>Q. pyrenaica</i> , Португалия	Нд
SR85	Дуб, Испания	Нд
	S. mikatae	I
NBRC 1815 (T)	Почва, Япония	5.0
NBRC 10996	Почва, Япония	6.0
NBRC 10999	Почва, Япония	8.1
NBRC 1816	Опавшие листья, Япония	5.0
NBRC 11000	Сокотечение <i>Q. crispula</i> , Япония	12.7
NBRC 11001	Сокотечение Camellia japonica, Япония	5.0
NBRC 11002	Сокотечение Fagus crenata, Япония	7.0
NBRC 11003	Сокотечение Q. myrsinaefolia, Япония	10.9
NBRC 10992	Опавшие листья, Япония	11.5
NBRC 10993	Опавшие листья, Япония	12.3
NBRC 10995	Опавшие листья, Япония	12.4
NBRC 10997	Опавшие листья, Япония	13.1
NBRC 10998	Опавшие листья, Япония	13.5
NBRC 10994	Опавшие листья, Япония	14.9
	S. paradoxus	I
CBS 432 (T)	Кора дуба <i>Quercus</i> sp., Россия	16.2
CBS 406	Сокотечение <i>Quercus</i> sp., Нидерланды	18.4
CBS 5829	Лесная почва, Дания	16.8
CBS 7400	Испорченный майонез, Европа	11.8
N17	Сокотечение дуба <i>Q. robur</i> , Татарстан, Россия	13.1
BKM Y-1707	Дикий виноград, Армения	15.1
BKM Y-1708	Попу-культурный виноград. Армения	14.0
D1	Коралуба Новосибирск Россия	13.4
N43	Сокотецение О mongolica Пальний восток Россия	12.4
1115	Construction of the general construction of the second sec	12.1

Таблица 1. Окончание

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*
N44	Сокотечение Q. mongolica, Дальний восток, Россия	12.5
61.02-2B	Сокотечение осины Populus davidiana, Приморский край, Россия	13.9
BKM Y-505	Виноград, Дальний Восток, Россия	14.6
BKM Y-1704	Сок амурского винограда, Дальний Восток, Россия	13.1
95-1	Сокотечение <i>Quercus</i> sp., Мичиган, США	13.5
UCDFST 52-153	Drosophila sp., Калифорния, США	17.4
UCDFST 72-149	Течь <i>Myoporum sandwicense</i> , Гавайи, США	0
UWO (PS) 91-917.1	Течь <i>M. sandwicense</i> , Гавайи, США	0

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Пущино, Россия); ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Москва, Россия); КБП – коллекция кафедры биологии почв МГУ (Москва, Россия); М – Коллекция микроорганизмов виноделия "Магарач" (КМВ "Магарач"), ФГБУН ВННИИВиВ "Магарач" РАН (Ялта, Россия); АТТС – American Type Culture Collection (Манассас, США); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); CECT – Spanish Туре Culture Collection, University of Valencia (Вален-сия, Испания); MUCL – Mycotheque de L'Universite, Catholique de Louvain (Лёвен, Бельгия); 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); РҮСС - 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 Departament of Biology, University of Western Ontario (Онтарио, Канада); D13, TBVIc2.95, DDI27.95, DDI4.95.4A – штаммы из коллекции Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) (Вильнав-д'Орнон, Франция); TJ13M05, ES14S09, TJ11S04 штаммы из коллекции Dr. Ch.F. Lee, Department of Applied Science, National Tsing Hua University (Синьчжу, Тайвань). Остальные штаммы из коллекции лаборатории молекулярной генетики дрожжей ФГБУ "ГосНИИгенетика НИЦ "Курчатовский институт" (Москва, Россия); соответствие штаммов различных коллекций: CBS 8711 = L19, S288C = CBS 8803, CBS 7001 = MCYC 623, NBRC 1815 = CBS 8839, NBRC 1802 = CBS 8840, NCYC 3947 = CBS 14759, UFRJ 50816 = CBS 8841, UFRJ 50791 = CBS 7994. Т – типовая культура.

* Диаметр зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей на PG-среде, мм.

** Нд – нет данных.

стве зондов использовали ПЦР-амплифицированные фрагменты длиной 1077 п.н., что покрывает большую часть кодирующей области генов *PGU1* (*S. cerevisiae* S288C), *PGU1b* (*S. bayanus* MCYC 623), *PGU1m* (*S. mikatae* NBRC 1815), *PGU1a* (*S. arboricola* CBS 10644). Последовательности использованных праймеров приведены ниже. Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием дигоксигенина (dig-II-dUTP) из набора DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit I ("Roche", Швейцария). Гибридизацию и детекцию гибридизационных сигналов проводили согласно протоколу фирмы-изготовителя.

Секвенирование и филогенетический анализ. Полимеразную цепную реакцию осуществляли "Bio-Rad" на ДНК-амплификаторе (США). Дрожжевую ДНК выделяли согласно Lõoke et al. (2011). Дизайн олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования генов PGU осуществляли онлайн на сайте https://www.yeastgenome.org. Для амплификации генов *PGU* видов Saccharomyces использовали следующие праймеры: S. cerevisiae PGU11 (5'-CACATTGATGGACAAAC-GCA-3')/PGU12 (5'-AGGATTAACAGCTTGCAC-CA-3'); S. arboricola PGU17 (5'-CTTTTGT-CAACTTTGTGCGCT-3')/PGU18 (5'-ATGATG-CACCTGAGCCAGAT-3'); S. bayanus PGU13

(5'-CCACCAAACGCAATGATTT-3')/PGU14 (5'-AT-GATGCACCTGAGCCAGAT-3'); S. mikatae PGU15 (5'-GGCAAACGCGATGGTTTTTA-3')/PGU16 (5'-AGGTTTAGCATGTTGCACCA-3'); S. paradoxus PGU21 (5'-TTTGTGCGCTTTTGCTGTCG-3')/PGU23 (5'-АААТТGACACCCCGGACCAC-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы Тад-полимеразы ("Синтол", Россия). 20-200 нг ДНК по слелующей схеме: начальная денатурация ДНК при 94°С в течение 5 мин; затем 30 циклов в режиме: денатурация в режиме $94^{\circ}C - 30$ с, отжиг праймеров при $56^{\circ}C -$ 30 с. синтез ДНК при 72°С – 60 с: конечная достройка при 72°С - 10 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле при 60-65 В в 0.5× ТВЕ буфере в течение 1-1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 1 kb DNA Ladder ("Thermo Fisher Scientific", США). Амплифицованные фрагменты элюировали из геля с помощью набора Silica Beads DNA Gel Extraction Kit ("Thermo Fisher Scientific", США), согласно протоколу фирмы-изго-



Рис. 1. Скрининг штаммов Saccharomyces на наличие пектиназной активности на PG-среде. S. cerevisiae: 1 – S288C; 2 – ВКПМ Y-4748; 3 – GIV51; S. cariocanus: 4 – UFRJ 50791; S. paradoxus: 5 – CBS 432; 6 – CBS 406; S. kudriavzevii: 7 – NRRL 63705; 8 – NRRL 63704; S. mikatae: 9 – NBRC 1815; 10 – NBRC 10994; S. jurei: 11 – NCYC 3947; 12 – NCYC 3962; S. arboricola: 13 – NRRL Y-63703; S. bayanus: 14 – 148.01; 15 – CBS 8711; 16 – T5/6; 17 – NCAIM Y.00677; 18 – контрольный штамм S. cerevisiae ВКПМ Y-718. Пунктирной линией обозначены зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей.

товителя. Нуклеотидные последовательности гена PGU определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе "Applied Biosystems 3730" (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 аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/ BioEdit/bioedit.html). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2013). В качестве внешней группы использовали эндо-полигалактуроназный ген *EPG1* дрожжей *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 (=KCTC17555), выделенных из ферментированного кукурузного теста (Мексика).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пектинолитическая активность была определена у 87 штаммов *Saccharomyces* разной видовой принадлежности (табл. 1). Почти все изученные штаммы в той или иной степени были способны секретировать активную эндо-полигалактуроназу (рис. 1). Ферментативную активность изученных штаммов оценивали по размеру зон гидролиза полигалактуроновой кислоты вокруг колоний дрожжей. В зависимости от диаметра образующихся ореолов изученные штаммы были разделены на три группы: 1) 0–8 мм; 2) 8–15 мм; 3) более 15 мм.

У большинства штаммов S. cerevisiae пектинолитическая активность полностью отсутствовала или была очень низкой (табл. 1). К третьей группе отнесены только 3 из 18 изученных штаммов: ВКМ У-1553. ВКМ У-1554 и ВКПМ У-4748. Первые два штамма выделены в условиях виноделия в Словакии, а последний штамм – с ягод винограда в Дагестане. Все изученные штаммы дрожжей S. arboricola, S. cariocanus, S. kudriavzevii u S. mikatae также имели достаточно низкую активность и попали в первые две группы (рис. 1, табл. 1). В настоящее время известно только два штамма S. jurei, выделенных в 2013 году с коры дуба во Франции (Naseb et al., 2017). Несмотря на общее происхождение, штаммы имели различную пектинолитическую активность: NCYC 3947 (диаметр ореола 17.2 мм) и NCYC 3962 (<15 мм).

Изученные штаммы *S. paradoxus* существенно различались по пектинолитической активности (рис. 1). У гавайских штаммов UCDFST 72-149 и UWO(PS) 91-917.1 активность не обнаружена. Десять штаммов *S. paradoxus* различного происхождения отнесены ко второй группе. В третью группу попали 5 штаммов: типовая культура CBS 432, CBS 406, CBS 5829, BKM Y-1707 и UCDFST 52-153. Наибольшей активностью обладал штамм CBS 406 (*d*=18.4 мм), выделенный из сокотечения *Quercus* sp. в Нидерландах (табл. 1).





Рис. 2. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus* и *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1 S. cerevisiae* S288C. *S. cerevisiae* : 1 – YNN 295; 2 – S288C; *S. paradoxus*: 3 – CBS 432; 4 – CBS 5829; 5 – CBS 406; 6 – N17; 7 – N43; 8 – N44; 9 – 95-1; 10 – UCDFST 52-153; 11 – UWO (PS) 91-917.1; *S. cariocanus*: 12 – UFRJ 50816; 13 – UFRJ 50791; *S. kudriavzevii*: 14 – NBRC 1802; 15 – NBRC 1803; 16 – NRRL 63704; 17 – NRRL 63705; 18 – PYCC 5977; 19 – ВКПМ Y-4736; 20 – РҮСС 5979. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка *I*).

Штаммы *S. bayanus* обладали достаточно высокой активностью: 12 отнесены к третьей группе, а остальные 6 ко второй (рис. 1, табл. 1). Наибольшей активностью обладали три штамма: венгерский токайский штамм T13/30 (18.8 мм), французский винный штамм CBS 8711 (20.1 мм) и выделенный из алкогольного напитка в Венгрии штамм NCAIM Y.00676 (23.8 мм). Следует отметить, что уровень секреции эндо-полигалактуроназы у последнего штамма сопоставим с контрольным штаммом *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718 (27.0 мм).

Хромосомная локализация генов PGU у 87 изученных штаммов Saccharomyces была определена с помощью пульс-электрофореза нативных хромосомных ДНК и Саузерн-гибридизации. Идентификацию отдельных хромосомных полос проводили по кариотипу стандартного штамма S. cerevisiae YNN 295, имеющего известные размеры и порядок хромосом (рис. 2-4, дорожка 1). В качестве стандарта также использовали генетическую линию S. cerevisiae S288C (рис. 2 и 3, дорожка 2), у которой определена полная нуклеотидная последовательность генома (Saccharomyces Genome Database, SGD htpp://www.yeast-genome.org). Этот штамм используется в качестве референсного при изучении генов различных эукариотических организмов.

На рис. 2 представлены результаты Саузернгибридизации хромосомных ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* с зондом *PGU1* штамма *S. cerevisiae* S288C. Все изученные штаммы *S. cerevisiae*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* обладали только одним пектиназным геном *PGU*, расположенным в районе хромосомы X размером около 770 т.п.н. стандартного штамма YNN 295 (рис. 2, дорожки 1, 2, 3–11, 12, 13 и 14–20). Гибридизационные сигналы не были обнаружены у трех из 18 изученных штаммов S. cerevisiae: M435, CBS 7962 и CECT 10484, тогда как у остальных 8 штаммов первой группы без пектинолитической активности гибридизационные сигналы выявлены (рисунок не приводится). По-видимому, эти штаммы обладают нефункциональными генами PGU из-за мутаций в промоторной области или регуляторных генах. Псевдогенов среди них обнаружено не было. Известно, что виды S. cerevisiae, S. paradoxus и S. kudriavzevii имеют коллинеарные молекулярные кариотипы (Fisher et al., 2000). Дрожжи S. cariocanus имеют видоспецифичный кариотип благодаря наличию четырех решипрокных транслокаший (IX/XV, II/XVI, XI/IV и XII/XIV), которые, однако, не затрагивает хромосому Х. Таким образом, гены S. paradoxus PGU1p, S. kudriavzevii PGU1k, S. cariocanus PGU1с и S. cerevisiae PGU1 имеют одинаковую локализацию: хромосома Х. Следует отметить, что интенсивность гибридизационных сигналов у штаммов S. kudriavzevii с зондом PGU1 была значительно слабее, чем у S. cerevisiae, S. paradoxus и S. cariocanus.

Согласно Саузерн-гибридизации, у дрожжей *S. arboricola* ген *PGU1a* также расположен в хромосоме X (рис. 3, дорожки *19–22*). У этих дрожжей имеется одна хромосомная транслокация (IV/XIII), также не затрагивающая хромосому X (Liti et al., 2013). У дрожжей *S. mikatae* и *S. jurei* выявлено по два гибридизационных сигнала, расположенных в районе хромосом X (~770 т.п.н.) и VIII (~580 т.п.н.) стандартного штамма YNN 295 (рис. 3, дорожки *3–16, 17, 18* и *1* соответственно). Молекулярные кариотипы дрожжей *S. mikatae* и *S. jurei* характеризуются общей реципрокной транслокацией между хромосомами VI и VII, а у последнего вида имеется дополнительная хромосомная транслокация I/XIII (Наумова и соавт., 2011; Na-



Рис. 3. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК дрожжей *S. mikatae, S. jurei* с зондом *PGU1m* NBRC 1815 и *S. arboricola* с зондом *PGU1a* CBS 10644. *S. cerevisiae: 1* – YNN 295; 2 – S288C *S. mikatae: 3* – NBRC 1815; 4 – NBRC 1816; 5 – NBRC 10992; 6 – NBRC 10993; 7 – NBRC 10994; 8 – NBRC 10995; 9 – NBRC 10996; *10* – NBRC 10997; *11* – NBRC 10998; *12* – NBRC 10999; *13* – NBRC 11000; *14* – NBRC 11001; *15* – NBRC 11002; *16* – NBRC 11003; *S. jurei: 17* – NCYC 3947; *18* – NCYC 3962; *S. arboricola: 19* – CBS 10644; *20* – AS 2.3318; *21* – AS 2.3319; *22* – NRRL Y-63703. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка *1*).



Рис. 4. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомных ДНК дрожжей *S. bayanus* с зондом *PGU1b* CBS 7001. *S. cerevisiae*: *1* – YNN 295; *S. bayanus*: *2* – CBS 395, *3* – M300, *4* – T5/6, *5* – CBS 7001, *6* – CBS 1146, 7 – D13, *8* – BKM Y-361, *9* – BKПМ Y-2528, *10* – CBS 8711, *11* – PYCC 6866, *12* – TBVIc2.95, *13* – NCAIM Y.00676, *14* – NCAIM Y.00677. Нумерация и размеры хромосом приводятся согласно стандартному штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка *1*).

seeb et al., 2017; Боровкова и соавт., 2020). Таким образом, хромосомы X и VIII у S. mikatae, S. jurei и S. cerevisiae имеют примерно одинаковые размеры.

На рис. 4 представлены молекулярные кариотипы и результаты Саузерн-гибридизации дрожжей *S. bayanus*. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный ген *PGU1b* штамма CBS 7001, геном которого полностью секвенирован (Bon et al., 2000). У всех изученных штаммов *S. bayanus* обнаружено по три гибридизационных сигнала (рис. 4, дорожки 2–14). Сильный гибридизационный сигнал отмечен в четвертой, начиная с низа геля, хромосоме. Дрожжи *S. bayanus* имеют видоспецифичный кариотип за счет трех реципрокных транслокаций, одна из которых между хромосомами X и VI (Fisher et al., 2000; Naumova et al., 2005). Еще два гибридизационных сигнала расположены в хромосомных полосах, которые по размеру соответствуют хромосомам I (~245 т.п.н.) и XIV (~800 т.п.н.) стандартного

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 3 2021



Рис. 5. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована эндо-полигилактуроназа (Epg1) дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 50 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – GIV51, (2) – NCYC 2908, 95-1, UCDFST 52-153, (3) – N43, BKM Y-505, BKM Y-1704, (4) – CBS 406, N17, (5) – BKM Y-1708, (6) – NBRC 1816, NBRC 11000, (7) – SR85, (8) – AS 2.3319, AS 2.3318, NRRL Y-63703, (9) – CBS 395, M300, BKM Y-361, (10) – CBS 395. В косых скобках показаны различные эндо-полигалактуроназы Pgu.

штамма YNN 295 (рис. 4, дорожка 1). Следует отметить слабую гибридизацию зонда *PGU1b* с генами *PGU2b* и *PGU3b*, при этом гибридизация с геном *PGU1* дрожжей *S. cerevisiae* YNN 295 полностью отсутствовала (рис. 4, дорожка 1).

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ дрожжей Saccharomyces. Мы провели секвенирование генов PGU у 24 штаммов Saccharomyces разной видовой принадлежности, которые выделены из различных источников и отличаются по пектинолитической активности. Полученные нуклеотидные последовательности имели длину 1077 нуклеотида, что покрывает большую часть кодирующей области генов PGU. По полученным нуклеотидным последовательностям генов PGU дрожжей Saccharomyces были определены аминокислотные последовательности соответствующих белков из 359 аминокислотных остатков. На основании анализа аминокислотных последовательностей было построено филогенетическое древо (рис. 5).

В качестве внешней группы использовали эндополигалактуроназу Epg1 дрожжей *Kluyveromyces marxianus*.

Все изученные эндо-полигалактуроназы дрожжей Saccharomyces разделились на два основных кластера. Внутри первого кластера со 100%-ной статистической достоверностью выделяются три подкластера. Первый включает штаммы S. cerevisiae (99.2-100% сходства), а также дрожжи S. paradoxus и S. cariocanus, эндо-полигалактуроназы которых идентичны на 96.4-100% (рис. 5). Североамериканские штаммы S. paradoxus и дрожжи S. cariocanus имеют идентичные последовательности, которые сходны с эндо-полигалуктороназами штаммов S. paradoxus, выделенных на Гавайях, Дальнем Востоке и в Европе, соответственно, на 98.3, 98.6 и 98.1-98.3%. Белки Pgu1p дальневосточных и европейских штаммов идентичны на 99.4-99.7%, а их сходство с эндо-полигалактуроназами гавайских штаммов не превышало 97%. Сходство эндо-полигалактуроназ дрожжей S. cer-

evisiae и S. paradoxus/S. cariocanus составило 95.6-96.8%. Второй подкластер объединяет дрожжи S. mikatae и S. jurei, эндо-полигалактуроназы которых сходны на 95.0-96.4%. Белки Рgu1m (хромосома X) дрожжей S. mikatae идентичны на 97.2-100%, тогда как белки Pgu2m (хр. VIII) сходны на 96.7–99.7%. Сходство Рди1т и Рди2т составляет 95.8-98.6%. Интересно отметить, что по последовательностям Pgu штаммы S. mikatae разделились на две группы: NBRC 1815, NBRC 1816, NBRC 11000 и NBRC 10992, NBRC 10994 (рис. 5). Ранее нами было обнаружено аналогичное деление на две группы штаммов S. mikatae по ITS-последовательностям рДНК (Наумова и соавт., 2011). В третий подкластер вошли белки Pgu1k дрожжей S. kusriavzevii, которые илентичны на 98.3-100%. Последовательности Pguk европейских и дальневосточных штаммов сходны на 98.3-98.9%, тогда как эндо-полигалактуроназы последних штаммов практически идентичны: 99.2-99.7%. Сходство эндо-полигалактуроназ трех подкластеров составило 87.7-91.9%. К первому кластеру примыкает белок Pgu1a дрожжей S. arboricola, сходство которого с соответствующими белками дрожжей S. cerevisiae, S. cariocanus, S. jurei, S. kudriavzevii, S. mi*katae* и *S. paradoxus* составило 85.5-87.7%.

Второй кластер включает белки Рgu дрожжей *S. bayanus*, которые сходны на 88.6–100% (рис. 5). У всех проанализированных штаммов последовательности Pgu1b были идентичными, а их сходство с белками PGU2b и PGU3b составило, соответственно, 88.6–90.8 и 90.0–90.5%. Последние два белка идентичны на 96.7–97.5%. Следует отметить, что сходство последовательностей Pgu2b и Pgu3b разных штаммов *S. bayanus* составило, соответственно, 96.7–100% и 99.4–100%. Уровень сходства эндо-полигалактуроназ дрожжей *S. bayanus* и остальных семи видов рода *Saccharomyces* значительно ниже: 83.6–88.6%. При этом наибольшее сходство имел белок Pgu1b (85.5–88.6%), тогда как сходство Pgu2b и Pgu3b не превышало 87%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о значительном полиморфизме нуклеотидных и аминокислотных последовательней генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Согласно проведенному филогенетическому анализу, наибольшее сходство эндо-полигалуктороназ (>95%) отмечено для видов *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, а также *S. mikatae* и *S. jurei*. Сходство белков Pgu остальных видов *Saccharomyces* было ниже 92%. Наиболее дивергентными являются эндо-полигалактуроназы дрожжей *S. arboricola* и *S. bayanus*, уровень сходства которых между собой и с белками PGU остальных видов не превышал 89%. По многим молекулярным маркерам указанные виды является наиболее дивергентными в

роде Saccharomyces (Naumov et al., 2010; Naseb et al., 2017; Боровкова и соавт., 2020). Обратим внимание на внутривидовой полиморфизм эндо-полигалуктороназ дрожжей S. kudriavzevii и S. paradoxus, связанный с географическим происхождением штаммов (рис. 5, табл. 1). Так, в третьем подкластере, образованном дрожжами S. kudriavzevii, выделяются две группы: европейские и дальневосточные штаммы. Штаммы двух популяций различаются и по другим молекулярным маркерам, например, по галактозным генам (Hittinger et al., 2004). В отличие от европейских штаммов, способных ферментировать галактозу, дальневосточные штаммы не способны усваивать галактозу из-за обширных повреждений галактозных генов. Более того, межпопуляционные гибриды имеют пониженную фертильность, что указывает на частичную генетическую изоляцию штаммов S. kudriavzevii различного географического происхождения (Hayмов, 2016). Известно, что вид *S. paradoxus* включает четыре частично-генетически изолированные географические популяции (европейскую, дальневосточную, североамериканскую и гавайскую), которые различаются по ряду молекулярных маркеров (Naumov et al., 1998; Liti et al., 2009). Изученные нами штаммы S. paradoxus из четырех указанных популяций также отличались по последовательностям эндо-полигалактуроназ (рис. 5). В целом, полученные результаты свидетельствуют о видоспецифичности генов PGU дрожжей рода Saccharomyces. Исключением является ген PGU1c дрожжей S. cariocanus, нуклеотидная последовательность которого идентична последовательности гена PGU1p североамериканских штаммов S. paradoxus. Это неудивительно, поскольку по многим молекулярным маркерам дрожжи S. cariocanus не отличаются от штаммов S. paradoxus из североамериканской популяции (Liti et al., 2005, 2006). В то же время, дрожжи S. cariocanus характеризуются специфичным молекулярным кариотипом и обладают уникальной нуклеотидной заменой в 191 позиции консервативного гена 18S рРНК, отсутствующей у остальных видов Saccharomyces (Naumov et al., 2010; Боровкова и соавт., 2020). Более того, при скрещивании дрожжей S. cario*canus* со штаммами *S. paradoxus* различного географического происхождения, включая североамериканские, образующиеся гибриды были стерильны (Naumov et al., 2000a).

Согласно проведенному нами молекулярному кариотипировнию и Саузерн-гибридизации, дрожжи *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* и *S. paradoxus* обладают только одним геном *PGU*, тогда как у остальных трех видов обнаружено несколько полимерных генов *PGU*: по два у *S. mikatae* и *S. jurei*, а также три у *S. bayanus*. Ген *PGU1* штамма *S. cerevisiae* S288C расположен в теломерном районе хромосомы X (http://www.yeastgenome.org). Такую же хромосомную

локализацию имеют гены S. arboricola PGU1a, S. cariocanus PGU1c, S. kudriavzevii PGU1k, S. paradoxus PGU1p, а также один из генов S. jurei (PGU1j), S. mikatae (PGU1m) и S. bayanus (PGU1b). По-видимому, расположенный в хромосоме X ген PGU1 является предковым, тогда как гены PGU другой хромосомной локализации появились в геномах дрожжей S. bayanus, S. jurei и S. mikatae в ходе эволюции позднее.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о значительном внутривидовом полиморфизме секреции эндо-полигалактуроназы у дрожжей рода Saccharomyces. Штаммы с очень низкой, средней и достаточно высокой пектинолитической активностью обнаружены практически у всех видов. Исключением является вид S. bayanus, все изученные штаммы которого обладали достаточно высокой активностью (табл. 1). По-вилимому, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью этих дрожжей. Обращает на себя внимание достаточно высокая пектинолитическая активность штаммов S. paradoxus. Естественным местообитанием этих дрожжей являются сокотечения и кора широколиственных деревьев, в особенности различных видов дубов Европы, Северной Америки и Дальневосточной Азии (Наумов, 2013). Эти дрожжи также обитают в лесной подстилке и самой почве, а также выделяются из различных насекомых, которые являются векторами их распространения в природе. По-видимому, полигалактуроновая составляющая пектина является важной частью углеводного питания обитающих в природе дрожжей. Для мицелиальных грибов, например, родов Aspergillus и Sclerotinia, свойственно наличие мультигенных эндо-полигалактуроназных семейств (Bussink et al., 1992; Fraissinet-Tacher et al., 1995), что может свидетельствовать о высокой экологической значимости этого фермента.

Принимая во внимание полученные нами результаты и литературные данные (Eschstruth, Divol, 2011) о высокой пектинолитической активности дрожжей *S. paradoxus*, есть основание рекомендовать генофонд этого вида для селекционной работы с винными дрожжами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Боровкова А.Н., Михайлова Ю.В., Наумова Е.С. Молекулярно-генетические особенности биологических видов дрожжей рода *Saccharomyces* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 390–399.

Borovkova A.N., Michailova Yu.V., Naumova E.S. Molecular genetic features of biological species of the genus Saccharomyces // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 387–395.

Наумов Г.И. Эколого-биогеографические особенности дрожжей Saccharomyces paradoxus Batschinskaya и родственных видов: (I) ранние исследования // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 387–394.

Naumov G.I. Ecological and biogeographical features of *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaya yeast and related species: I. The early studies // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 397–403.

Наумов Г.И. Генетическая идентификация дрожжей Saccharomyces kudriavzevii из европейской популяции // Экологическая генетика. 2009. Т. 7. № 1. С. 9–11.

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. Т. 80. С. 723–730.

Naumov G.I., Naumova E.S., Martynenko N.N., Masneuf-Pomarède I. Taxonomy, ecology, and genetics of the yeast Saccharomyces bayanus: a new object for science and practice // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 735–742.

Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярная филогения пектиназных генов PGU дрожжей рода Saccharomyces // Микробиология. 2016а. Т. 85. Р. 703–712.

Naumov G.I., Shalamitskiy M.Y., Naumova E.S., Martynenko N.N. Molecular phylogeny of pectinase genes *PGU* in the yeast genus *Saccharomyces* // Microbiology (Moscow). 2016a. V. 85. P. 717–726.

Наумов Г.И., Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Новое семейство пектиназных генов *PGU1b–PGU3b* у пектинолитических дрожжей *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* // ДАН. 2016б. Т. 467. С. 109–111.

Naumov G.I., Shalamitskiy M.Y., Naumova E.S. New family of pectinase genes *PGU1b–PGU3b* of the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum //* Dokl. Biochem. Biophys. 2016b. V. 467. P. 89–91.

Наумова Е.С., Наумов Г.И., Корхола М. Молекулярные кариотипы различных генетических линий дрожжей Saccharomyces cerevisiae // Биотехнология. 1993. № 4. С. 2–5.

Naumova E.S., Naumov G.I., Korhola M. Molecular karyotypes of various genetic lines of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Bioteknologiya. 1993. № 4. P. 1–4.

Наумова Е.С., Серпова Е.В., Коршунова И.В., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм α-галактозидазных генов *MEL* дрожжей *Saccharomyces* // Микробиология. 2011. Т. 80. Р. 496–507.

Naumova E.S., Serpova E.V., Korshunova I.V., Naumov G.I. Molecular polymorphism of α-galactosidase *MEL* genes of

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 3 2021

Saccharomyces yeasts // Microbiology (Moscow). 2011. V. 80. P. 502–513.

Наумова Е.С., Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм пектиназных генов PGU дрожжей Saccharomyces bayanus var. uvarum // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 2. С. 30–37.

Naumova E.S., M.Yu. Shalamitskiy, Naumov G.I. Molecular polymorphism of pectinase genes *PGU* of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* yeast // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. P. 882–887.

Имшенецкий А.А., Кондратьева Т.Ф., Линькова М.А., Датунашвили Е.Н., Бурьян Н.И., Покровская С.С., Скорикова Т.К., Сонина Е.Г. Полиплоидный штамм дрожжей Saccharomyces vini, используемый для приготовления столовых вин. Патент SU 1495368.

Bon E., Neuvéglise C., Casaregola S., Artiguenave F., Wincker P., Aigle M., Durrens P. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 5. Saccharomyces bayanus var. uvarum // FEBS Lett. 2000. V. 487. P. 37–41.

Bussink H.J., Buxton F.P., Fraaye B.A., de Graaff L.H., Visser J. The polygalacturonase of Aspergillus niger are encoded by a family of diverged genes // Eur. J. Biochem. 1992. V. 208. P. 83–90.

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. 2007. V. 7. P. 1328–1339.

Eschstruth A., Divol B. Comparative characterization of endo-polygalacturonase (*Pgu I*) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under wine-making conditions // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 91. P. 623–634.

Fernández-González M., Ubeda J.F., Vasudevan T.G., Cordero Otero R.R., Briones A.I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains // FEMS Microbiol. Lett. 2004. V. 237. P. 261–266.

Fischer G., James S.A., Roberts I.N., Oliver S.G., Louis E.S. Chromosomal evolution in *Saccharomyces* // Nature. 2000. V. 405. P. 451–454.

Fraissinet-Tacher L., Reymond-Cotton P., Fevre M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum //* Curr. Genet. 1995. V. 29. P. 96–99.

Gainvors A., Karam N., Lequart C., Belarbi A. Use of *Sac-charomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices // Biotechnol. Lett. 1994. V. 16. P. 1329–1334.

Gognies S., Gainvors A., Aigle M., Belarbi A. Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (*PGL1*) // Yeast. 1999. V. 15. P. 11–22.

Hittinger C.T., Rokas A., Carroll S.B. Parallel inactivation of multiple *GAL* pathway genes and ecological diversification in yeasts // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 14144–14149.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.

Kurtzman C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharo-myces, Kluyveromyces* and other members of the *Saccharo-mycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vandervatozyma* and *Zygotorulaspora* // FEMS Yeast Res. 2003. V. 4. P. 233–245.

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 3 2021

Liti G., Peruffo A., James S.A., Roberts I.N., Louis E.J. Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces* sensu stricto complex // Yeast. 2005. V. 22. P. 177–192.

Liti G., David B., Barton H., Louis E.J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomy-ces* // Genetics. 2006. V. 174. P. 839–850.

Liti G., Carter D.M., Moses A.M., Warringer J., Parts L., James S.A., Davey R.P., Roberts I.N., Burt A., Koufopanou V., Tsai I.J., Bergman C.M., Bensasson D., O'Kelly M.J.T., van Oudenaarden A., Barton D.B.H., Bailes E., Nguyen Ba A.N., Jones M., Quail M.A., Goodhead I., Sims S., Smith F., Blomberg A., Durbin R., Louis E.J. Population genomics of domestic and wild yeasts // Nature. 2009. V. 458. P. 337– 341.

Liti G., Nguyen Ba A.N., Blythe M., Müller C.A., Bergström A., Cubillos F.A., Dafhnis-Calas F., Khoshraftar S., Malla S., Mehta N., Siow C.C., Warringer J., Moses A.M., Louis E.J., Nieduszynski C.A. High quality de novo sequencing and assembly of the Saccharomyces arboricolus genome // BMC Genomics. 2013. V. 14. P. 69.

https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-69

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. V. 125. P. 447–461.

Louw C., Young P.R., van Rensburg P., Divol B. Epigenetic regulation of *PGU1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. 2010. V. 10. P. 158–167.

Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR based applications // Biotechniques. 2011. V. 50. P. 325–328.

Naseeb S., James S.A., Alsammar H., Michaels C.J., Gini B., Nueno-Palop C., Bond C.J., McGhie H., Roberts I. N., Delneri D. Saccharomyces jurei sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 2046–2052.

Naumov G.I. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces* sensu stricto complex // J. Indust. Microbiol. 1996. V. 17. P. 295–302.

Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S., Louis E.J., Roberts I.N. Three new species in the *Saccharomyces* sensu stricto complex: *Saccharomyces cariocanus, Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* // Int. J. Evol. Microbiol. 2000a. V. 50. P. 1931–1942.

Naumov G.I., Masneuf-Pomarède I., Naumova E.S., Aigle M., Dubourdieu D. Association of *S. bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations // Res. Microbiol. 2000b. V. 151. P. 683–691.

Naumov G.I., Naumova E.S., Aigle M., Masneuf-Pomarede I., Belarbi A. Genetic reidentification of the pectinolytic yeast strain SCPP as *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum //* Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001a. V. 55. P. 108–111.

Naumov G.I., Naumova E.S., Antunovics A., Sipiczki M. Saccharomyces bayanus var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary // Appl. Microbiol. Bitechnol. 2002. V. 59. P. 727–730.

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. V. 16. P. 274–279.

НАУМОВА и др.

Naumov G.I., Naumova E.S., Masneuf-Pomarède I. Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai // Antonie van Leeuwenhoek. 2010. V. 98. P. 1–7.

Naumov G.I., Naumova E.S., Sniegowski P.D. Differentiation of European and Far East Asian populations of *Saccharomyces paradoxus* by allozyme analysis // Int. J. System. Bacteriol. 1997a. V. 47. P. 341–344.

Naumov G.I., Nguyen H.-V., Naumova E.S., Michel A., Aigle M., Gaillardin C. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast // Int. J. Food Microbiol. 2001b. V. 65. P. 163–171.

Naumova E.S., Naumov G.I., Masneuf-Pomarède I., Aigle M., Dubourdieu D. Molecular genetic study of introgression between Saccharomyces bayanus and S. cerevisiae // Yeast. 2005. V. 22. P. 1099–1115.

Panon G., Massiot P., Drilleau J.-F. Production d'enzymes pectinolytiques par les levures d'intérêt cidricole // Sciences des Aliments. 1995. V. 15. P. 31–42.

Pérez-Torrado R., Barrio E., Querol A. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces* non-*cerevisiae* and its hybrids // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2018. V. 58. P. 1780–1790.

Rementeria A., Rodriguez J.A., Cadaval A., Amenabar R., Muguruza J.R., Hernando F.L., Sevilla M.J. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from "Txakoli de Bizkaia" region (Basque Country, North Spain) // Ind. J. Food. Microbiol. 2003. V. 86. P. 201–207.

Torriani S., Zapparoli G., Suzzi G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces* sensu stricto strains isolated from Amarone wine // Antonie van Leeuwenhoek. 1999. V. 5. P. 207–215.

Van Rensburg P., Pretorius I.S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations // S. Afr. J. Enol. Viticult. 2000. V. 21. P. 52–73.

Vaughan-Martini A., Martini A. Saccharomyces Meyen ex Reess (1870) // The Yeast, a Taxonomic Study / Eds. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. V. 2. P. 733–746.

Wang S.A., Bai F.Y. Saccharomyces arboricolus sp. nov., a yeast species from tree bark // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 510–514.

Natural Polymorphism of Pectinase PGU Genes in the Saccharomyces Yeasts

E. S. Naumova^{1, *}, A. N. Borovkova^{1, 2}, M. Yu. Shalamitskiy³, and G. I. Naumov^{1, †}

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC "Kurchatov Institute", Moscow, 117519 Russia

²Department of Mycology and Algology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Magarach All-Russian National Institute for Vine and Winemaking, Russian Academy of Sciences, Yalta, 298600 Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Received December 11, 2020; revised January 12, 2021; accepted January 22, 2021

Abstract—The distribution and properties of the pectinase *PGU* genes in *Saccharomyces* yeasts of different species was studied. Application of molecular karyotyping and Southern hybridization revealed that *S. arboricola, S. cariocanus, S. cerevisiae, S. kudriavzevii*, and *S. paradoxus* species had a single *PGU* gene located on the X chromosome. The other three species had polymeric *PGU* genes of different chromosomal localization: *S. mikatae* and *S. jurei* (chromosomes X and VIII), *S. bayanus* (X, I, and XIV). This is the first report on comparative analysis of the nucleotide and amino acid sequences of the *PGU* genes was carried out in all eight species of the genus *Saccharomyces*. Species-specificity of the *PGU* genes was revealed, as well as their intraspecific polymorphism in *S. kudriavzevii* and *S. paradoxus*, associated with the geographical origin of the strains. The most divergent proteins were Pgu1a (*S. arboricola*) and Pgu1b, Pgu2b, Pgu3b (*S. bayanus*), for which the level of similarity to the Pgu proteins of other *Saccharomyces* species did not exceed 89%. The highest similarity (>95%) was noted for the Pgu proteins of *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, and *S. cariocanus*, as well as *S. mikatae* and *S. jurei*. Significant intraspecific polymorphism of endo-polygalacturonase secretion was observed in the studied *Saccharomyces* species, except for the species *S. bayanus*, all studied strains of which had a relatively high activity. The ability to secrete active endo-polygalacturonase is probably a specific feature of this species.

Keywords: *Saccharomycs* yeasts, *PGU* genes, pectinase, endo-polygalacturonase, pectin, phylogenetic analysis, molecular karyotyping