МИКРОБИОЛОГИЯ, 2023, том 92, № 2, с. 219–232

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПЕКТИНОЛИТИЧЕСКИЕ ДРОЖЖИ *SACCHAROMYCES PARADOXUS* – НОВЫЙ ГЕНОФОНД ДЛЯ ВИНОДЕЛИЯ

© 2023 г. А. Н. Боровкова[a, b], М. Ю. Шаламитский[c], Е. С. Наумова[a, *]

[a] *Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" "Курчатовский комплекс генетических исследований", Москва, 123098 Россия*

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

[c] *Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия "Магарач" Российской академии наук, Ялта, 298600 Россия*

**e-mail: lena_naumova@yahoo.com*

Поступила в редакцию 03.10.2022 г.
После доработки 26.10.2022 г.
Принята к публикации 31.10.2022 г.

Проведен масштабный скрининг пектинолитической активности у дрожжей *Saccharomyces paradoxus*, выделенных из различных природных источников в Европе, Азии, Северной Америке и на Гавайских островах. Из 98 изученных штаммов пектинолитическая активность отсутствовала только у пяти гавайских и двух европейских. Большинство штаммов были способны в той или иной степени секретировать активную эндо-полигалактуроназу. Североамериканские штаммы UCDFST 52-225, UCDFST 61-359, UCDFST 61-220, 95-3 и UCDFST 62-186 обладают очень высокой пектинолитической активностью, сопоставимой или даже превышающей таковую экспериментально полученного тетраплоидного штамма *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718. Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей пектиназных генов показал, что североамериканская и дальневосточная популяции *S. paradoxus* отличаются более высоким генетическим разнообразием, чем европейская и гавайская. Филогенетический анализ подтвердил видоспецифичность генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Из восьми видов *Saccharomyces* высокая пектинолитическая активность характерна для *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Пять североамериканских штаммов с наибольшей пектинолитической активностью представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных работ с винными дрожжами. Обсуждается экологическая роль эндо-полигалактуроназы.

Ключевые слова: *Saccharomyces paradoxus*, генетические популяции, гены *PGU*, пектиназа, эндо-полигалактуроназа, филогенетический анализ

DOI: 10.31857/S0026365622600729, **EDN:** AUJDPZ

Род *Saccharomyces* включает восемь биологических видов: *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* (Naumov et al., 2000; Kurtzman, 2003; Wang, Bai, 2008; Vaughan-Martini, Martini, 2011; Naseeb et al., 2017). Дрожжи *S. bayanus*, *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* встречаются в разных регионах мира, тогда как *S. arboricola* и *S. mikatae* характерны только для Дальневосточной Азии. Штаммы дрожжей *S. kudriavzevii* были выделены в Европе и Дальневосточной Азии (Naumov et al., 2000; Sampaio, Gonçalves, 2008). Известны единичные штаммы видов *S. cariocanus* и *S. jurei*, выделенные, соответственно, в Бразилии и Европе (Naumov et al., 2000; Naseeb et al., 2017; Hutzler et al., 2021).

В виноделии традиционно используются дрожжи *S. cerevisiae*. Большое значение также имеют холодоустойчивые дрожжи *S. bayanus*. Этот вид представлен двумя разновидностями (Наумов, 2000; Vaughan-Martini, Martini, 2011). Специфической экологической нишей *S. bayanus* var. *uvarum* является виноделие и виноградарство при пониженных температурах: эти дрожжи ассоциированы с производством белых, сладких и игристых вин, а также сидра (Naumov et al., 1993; Torriani et al., 1999; Rementeria et al., 2003; Наумов и соавт., 2011). Штаммы *S. bayanus* var. *bayanus*, включая типовую культуру CBS 380, выделяются, в основном, в условиях пивоварения (Naumov et al., 2005; Pérez-Través et al., 2014). Родственные дрожжи *S. eubayanus* обитают в различных природных субстратах в Аргентине, Китае, США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии (Libkind et al., 2011; Nespolo et al., 2020). В Европе геном *S. eubayanus* обнаружен только у гибридных пивных дрожжей низового брожения *S. pastorianus* (Hebly et al.,

2015). Согласно гибридологическому анализу *S. eubayanus* не является самостоятельным биологическим видом и представляет собой третью разновидность *S. bayanus* (Наумов, 2017).

В последние годы проводятся многочисленные исследования по использованию в различных производственных ферментациях, включая виноделие, других видов *Saccharomyces*. Показана перспективность применения в пивоварении дрожжей *S. arboricola*, *S. jurei* и *S. mikatae* или их гибридов с *S. cerevisiae* (Nikulin et al., 2018; Hutzler et al., 2021). Естественные межвидовые гибриды *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* × × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* обнаружены среди коммерческих винных, пекарских и пивных дрожжей, используемых во Франции, Испании, Австрии, Швейцарии и Австралии (Peris et al., 2018; Morard et al., 2020; Bendixsen et al., 2022).

Для винных дрожжей важным свойством является способность расщеплять содержащийся в ягодах винограда пектин. В зависимости от сорта содержание пектиновых веществ в ягодах винограда составляет от 0.5 до 5 г/л. Высокое содержание пектиновых веществ затрудняет процесс отделения и осветления виноградного сусла и может снижать органолептические показатели вина, а также приводить к появлению коллоидных помутнений и засорению фильтров (Van Rensburg, Pretorious, 2000). Пектин – полисахарид растительного происхождения, состоящий из соединенных между собой α-(1–4)-гликозидной связью остатков галактуроновой кислоты, присутствующих в виде метилового эфира. Расщепление высокомолекулярных пектиновых веществ – сложный процесс с участием нескольких ферментов, включая пектин-эстеразу, пектиназу (эндо-полигалактуроназу) и пектин-лиазу. Основным ферментом гидролиза пектиновых полисахаридов является пектиназа (эндо-полигалактуроназа, К.Ф. 3.2.1.15). Применяемые в виноделии коммерческие препараты пектиназ грибного происхождения, помимо эндо-полигалактуроназы, содержат примеси и ферменты с нежелательной пектинэстеразной активностью, которая приводит к повышенному содержанию токсичного метанола в вине (Louw et al., 2006). В отличие от мицелиальных грибов, дрожжи обычно не секретируют пектинэстеразу, поэтому их пектиназы безопасны для виноделия (Fernández-González et al., 2004; da Silva et al., 2005).

Дрожжи *S. cerevisiae*, включая винные штаммы, как правило, не способны расщеплять пектин, или обладают очень низкой пектинолитической активностью, что может быть связано с мутациями в кодирующем эндо-полигалактуроназу структурном гене *PGU1* (псевдоген), с его полным отсутствием или с мутациями в регуляторных генах (Fernández-González et al., 2004; Divol, Rensburg, 2007; Louw et al., 2010). Недавно нами проведено изучение распространения и особенностей пектиназных генов *PGU* у дрожжей *Saccharomyces* разной видовой принадлежности (Наумова и соавт., 2021; Боровкова и соавт., 2022). Показано, что виды *S. arboricola*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* обладают низкой пектинолитической активностью, тогда как среди дрожжей *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. paradoxus* и *S. jurei* обнаружены штаммы, способные активно расщеплять пектиновые соединения. Показано, что способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью дрожжей *S. bayanus* (Боровкова и соавт., 2022).

На начальных этапах формирования вина, сбраживание виноградного сусла осуществляется гетерогенным консорциумом обитающих на виноградниках и оборудовании винных заводов дрожжей, среди которых встречаются виды, обладающие пектинолитической активностью: *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia fructicola*, *Kluyveromyces marxianus* (Belda et al., 2016; Rollero et al., 2018; Tufariello et al., 2021). Показано, что применение в виноделии комбинированных стартерных культур (*Saccharomyces* в сочетании с несахаромицетными дрожжами) позволяет улучшать качество вина, положительно влияет на такие параметры вина как содержание алкоголя и кислотность, а также уменьшает риск недобродов (Belda et al., 2017; Berbegal et al., 2020). Использование штаммов *Saccharomyces* в сочетании с пектинолитическими (*Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia* spp., *Kluyveromyces marxianus*) и непектинолитическими (*Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora* spp., *Lachancea thermotolerans*, *Pichia* spp. и др.) дрожжами в ряде случаев давали лучшие результаты, чем применение коммерческих ферментных препаратов (Belde at al., 2016; Rollero et al., 2018; Tufariello et al., 2021). Однако необходимо тщательно подбирать несахаромицетные штаммы, чтобы избежать образования посторонних привкусов и ароматов в вине, а также повышенного образования этилацетата и порчи вина. Следует отметить, что несахаромицетные дрожжи доминируют только на первых этапах спиртового брожения, и при повышении уровня спирта они полностью вытесняются истинно винными дрожжами *Saccharomyces* (Pretorius, 2020). Наличие пектинолитической активности у штаммов *Saccharomyces* не только улучшает процесс осветления виноградного сусла и его фильтруемость, но также существенно влияет на формирование органолептических показателей виноматериалов. Это важно для получения высококачественных вин с узнаваемой сортовой индивидуальностью, особенно для вин из ароматических (например, Мускат) и полу-ароматических (Рислинг) сортов винограда. В этой связи актуальным является поиск штаммов-сахаромицетов, способных секретировать активную эндо-полигалактуроназу.

Дрожжи *S. paradoxus* встречаются повсеместно и выделяются из различных природных источников: сокотечений широколиственных деревьев, насекомых, неокультуренных почв, листьев растений, а также с различных ягод, включая виноград (Наумов, 2013). С виноградников в Хорватии был выделен штамм *S. paradoxus* RO88, обладающий высокой пектинолитической активностью и другими важными для виноделия характеристиками (Redžepović et al., 2003; Eschstruth, Divol, 2011). В нашем распоряжении имеется большая коллекция штаммов *S. paradoxus*, выделенных из различных природных источников в разных регионах мира.

Целью настоящего исследования является изучение молекулярно-генетических особенностей пектиназных генов *PGU* вида *S. paradoxus* 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 (бакто-агар – 20, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10 и пептон – 20; г/л).

Видовая идентификация штаммов. Идентификацию штаммов проводили с помощью ПДРФ-анализа ПЦР-амплифицированного 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S рДНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2. Дрожжевую ДНК выделяли согласно Lõoke et al. (2011). Амплификацию и рестрикцию 5.8S-ITS-фрагментов проводили как описано ранее (Серпова и соавт., 2011). В качестве контролей использовали референтные штаммы дрожжей *S. cerevisiae* S288C и *S. paradoxus* CBS 432.

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”, США) – 20, Na_2HPO_4, – 6.8 (pH 4.0). Культивировали при 28°C 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 IC 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.

Секвенирование и филогенетический анализ. Полимеразную цепную реакцию осуществляли на ДНК-амплификаторе ”Bio-Rad” (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* дрожжей *S. paradoxus* использовали следующие пары праймеров: PGU11 (5'-CACATTGATGGACAAACGCA-3')/PGU12(5'-AGGATTAACAGCTTGCACCA-3') и PGU21 (5'-TTTGTGCGCTTTTGCTGTCG-3')/PGU23 (5'-AAATTGACACCCCGGACCAC-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ $MgCl_2$, 0.1 мМ каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 20–200 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 5 мин; затем 30 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при 56°C – 30 с, синтез ДНК при 72°C – 60 с; конечная достройка при 72°C – 10 мин. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5× TBE 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). ПЦР-фрагменты элюировали из геля с помощью набора Silica Beads DNA Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), согласно протоколу фирмы-изготовителя. Нуклеотидные последовательности гена *PGU* определяли по двум цепям с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США). Полученные в данной работе нуклеотидные последовательности заложены в GenBank под регистрационными номерами: OP700018–OP700045.

Поиск сходства с известными нуклеотидными последовательностями *PGU* дрожжей *Saccharomyces* 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). Фило-

Таблица 1. Происхождение и пектинолитическая активность изученных штаммов дрожжей *Saccharomyces paradoxus*

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
	Saccharomyces paradoxus		
	Европейская популяция		
CBS 7400	Испорченный майонез, Европа	11.8	1
HA 220	*Hypericum perforatum*, Австрия	13.3	1
BKM Y-1708	Полукультурный виноград, Армения	14.0	1
BKM Y-506	Поверхность свеклы, Московская область, Россия	12.2	1
M2	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.8	1
M22	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.2	1
M29	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	14.5	1
M10	Зеленые листья одуванчика *Taraxacum officinale*, луг, Лосиный остров, Москва, Россия	14.4	1
M11	Липа, лесная подстилка, Лосиный остров, Москва, Россия	12.6	1
M12	Береза *Betula verrucosa*, лесная подстилка, Лосиный остров, Москва, Россия	13.8	1
M16	Зеленая хвоя лиственницы, Лосиный остров, Москва, Россия	13.4	1
M18	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	13.1	1
M36	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	12.0	1
M42	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	11.5	1
N16	Сокотечения *Quercus robur*, Москва, Россия	12.2	1
N13	Сокотечения *Q. robur*, Московская область, Россия	11.0	1
N7	Сокотечения *Q. robur*, Санкт-Петербург, Россия	14.0	1
N35	Сокотечения *Q. robur*, Воронеж, Россия	14.7	1
N34	Сокотечения *Q. robur*, Воронеж, Россия	11.5	1
N11	Сокотечения *Q. robur*, Новгородская область, Россия	14.3	1
N14	Сокотечения *Quercus* sp., Азербайджан	11.8	1
N18	Сокотечения *Q. robur*, Ефремов, Россия	11.9	1
N17	Сокотечение дуба *Q. robur*, Татарстан, Россия	13.1	1
N29	Сокотечение дуба *Q. robur*, Татарстан, Россия	12.9	1
N26	Сокотечения *Q. robur*, Эстония	12.2	1
N25	Сокотечения *Q. robur*, Эстония	12.5	1
N27	Сокотечения *Q. robur*, Эстония	12.2	1
D1	Кора дуба, Новосибирск, Россия	13.4	1
CBS 432(T)	Кора дуба *Quercus* sp., Россия	16.2	2
CBS 406	Сокотечение *Quercus* sp., Нидерланды	18.4	2
CBS 5829	Лесная почва, Дания	16.8	2
HA 219	*Hypericum perforatum*, Австрия	15.1	2
ZP 506	Кора *Quercus faginea,* Португалия	17.3	2
BKM Y-1707	Дикий виноград, Армения	15.1	2
M6	Зеленые листья живучки *Ajuga reptans*, лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.3	2
M7	Зеленые листья живучки *Ajuga reptans*, лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.0	2

Таблица 1. Продолжение

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
M17	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	16.0	2
M19	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	2
M21	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.6	2
M23	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	2
M25	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	18.0	2
M26	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.4	2
M27	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.2	2
M28	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.4	2
M30	Зеленые листья брусники *Vaccinium vitis-doea*, болото, Лосиный остров, Москва, Россия	15.1	2
M31	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.5	2
M32	Зеленая хвоя ели, Лосиный остров, Москва, Россия	15.6	2
M40	Зеленые листья живучки *Ajuga reptans*, лес, Лосиный остров, Москва, Россия	15.0	2
M37	Зеленая хвоя лиственницы, Лосиный остров, Москва, Россия	17.8	2
N8	Сокотечения *Q. robur*, Московская область, Россия	15.6	2
N9	Узбекистан	16.7	2
N12	Сокотечения *Quercus* sp., Азербайджан	16.7	2
N15	Сокотечения *Quercus robur*, Москва, Россия	17.8	2
N20	Сокотечения *Quercus robur*, Москва, Россия	16.9	2
N41	Сокотечения *Quercus* sp., Ялта, Крым, Россия	17.1	2
N40	Сокотечения *Quercus* sp., Ялта, Крым, Россия	17.3	2
ATCC 96968	Экссудат *Quercus* sp., Финляндия	0	4
ATCC 96971	Экссудат *Quercus* sp., Финляндия	0	4
RO88	Виноградник, Хорватия	Нд	Нд
	Дальневосточная популяция		
BKM Y-505	Виноград, Дальний Восток, Россия	14.6	1
BKM Y-1704	Сок амурского винограда, Дальний Восток, Россия	13.1	1
N43	Сокотечение *Q. mongolica*, Дальний Восток, Россия	12.7	1
N44	Сокотечение *Q. mongolica*, Дальний Восток, Россия	12.5	1
N46	Сокотечение *Q. mongolica*, Сихотэ-Алинский заповедник, Россия	14.2	1
N48	Сокотечение *Q. mongolica*, Хасанский район, Россия	13.5	1
N49	Сокотечение *Q. mongolica*, Хасанский район, Россия	12.2	1
N50	Экссудат *Quercus mongolica*, Владивосток, Россия	13.0	1
61.02	Сокотечение осины *Populus davidiana*, Приморский край, Россия	13.9	1
NBRC 1804	Кора, Япония	11.8	1
UCDFST 67-570	Экссудат растений, Япония	12.9	1
N45	Сокотечение *Q. mongolica*, Дальний Восток, Россия	17.8	2
N47	Сокотечение *Q. mongolica*, Алинский заповедник, Россия	17.3	2
BKM Y-1697	Сок лесной малины, Дальний Восток	17.4	2

Таблица 1. Продолжение

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
NBRC 1805	Кора, Япония	15.2	2
RS9	Силос, Япония	Нд	Нд
SN-ZZ18-9	*Q. aliena*, Китай	Нд	Нд
HB-XS1-1	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
HB-SNJ10a	Кора *Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
SN-TB12-1	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
HB-MY10-3	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
HB-XXY4-1	*Cyclobalanopsis myrsinifolia,* Китай	Нд	Нд
BJ-DLS32-27	*Q. liaotungensis*, Китай	Нд	Нд
SN-HZZ6-2	*Quercus cocciferoides*, Китай	Нд	Нд
SN-HZZ24-1	*Cyclobalanopsis jenseniana*, Китай	Нд	Нд
SN-ZZ59-1	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
JL-CB5-1	*Q. liaotungensis*, Китай	Нд	Нд
HB-SNJ2a	Кора *Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
SN-TTH1-1	*Q. cocciferoides*, Китай	Нд	Нд
HB-XS18-1	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
SN-ZZ32-3	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
JL-WQ14-1	*Q. liaotungensis*, Китай	Нд	Нд
JL-CB13-1	Гнилое дерево, Китай	Нд	Нд
SN-TTS3-10	*Cyclobalanopsis jenseniana*, Китай	Нд	Нд
HB-XS3-1	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
HB-XS21-2	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
BJ-DLS2-1	*Corylus heterophylla*, Китай	Нд	Нд
BJ-DLS32-26	*Q. liaotungensis*, Китай	Нд	Нд
SN-QL4-2	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
HB-MY15-2	*Quercus* sp., Китай	Нд	Нд
BJ-DLS60-3	*Q. liaotungensis*, Китай	Нд	Нд
SN-HZZ1-1	*Corylus mandshurica* Maxim., Китай	Нд	Нд
XZ-98-1-1	*Juglans cathayensis*, Тибет, Китай	Нд	Нд
	Североамериканская популяция		
95-1	Сокотечение *Quercus* sp., Мичиган, США	13.5	1
95-4	Дуб *Q. rubra*, Мичиган, США	11.9	1
95-7	Дуб *Q. rubra*, Мичиган, США	13.8	1
UCDFST 61-196	*Drosophila pseudoobscura*, Калифорния, США	14.3	1
UCDFST 79-128	Черемуха *Prunus virginiana*, Онтарио, Канада	13.5	1
UCDFST 79-140	Яблоня *Malus pumila*, Онтарио, Канада	11.0	1
UCDFST 69-1006	Ива (*Salix* sp.), Калифорния, США	15.2	2
UCDFST 61-248	*Drosophila pseudoobscura*, Калифорния, США	18.8	2
UCDFST 51-186	*Drosophila pseudoobscura*, Калифорния, США	17.7	2
UCDFST 51-137	*Drosophila azteca*, Калифорния, США	15.9	2
UCDFST 52-153	*Drosophila* sp., Калифорния, США	17.4	2
UCDFST 61-232	*Drosophila viridis*, Калифорния, США	16.1	2
UCDFST 72-129	Сокотечения *Q. gambelii*, Аризона, США	15.0	2
UCDFST 52-225	Насекомые *Aulacigaster* sp., Калифорния, США	20.2	3

Таблица 1. Окончание

Штамм	Источник и место выделения	Диаметр, мм*	Номер группы
UCDFST 61-359	Сокотечения *Ulmus carpinifolia*, Калифорния, США	22.4	3
95-3	Дуб *Q. alba,* Мичиган, США	22.9	3
UCDFST 61-220	Насекомые *Aulacigaster* sp., Калифорния, США	25.4	3
UCDFST 62-186	Осиное гнездо, Канада	27.4	3
	Гавайская популяция		
UCDFST 72-145	Экссудат *Myoporum* sp., Гавайи, США	13.8	1
UCDFST 73-538.2	Экссудат растений, Гавайи, США	14.6	1
UCDFST 72-140	Экссудат *Myoporum sandwicense* с личинками *Drosophila heidi*, Гавайи, США	0	4
UCDFST 71-101	Экссудат *Myoporum sandwicense,* Гавайи, США	0	4
UCDFST 72-143	Экссудат *Myoporum sandwicense,* Гавайи, США	0	4
UCDFST 72-149	Течь *Myoporum sandwicense*, Гавайи, США	0	4
UWO (PS) 91-917.1	Течь *Myoporum sandwicense*, Гавайи, США	0	4
	S. arboricola		
CBS 10644(T)	Кора дуба *Quercus fabric*, Китай	3.5	1
	S. bayanus		
CBS 7001	Ручейник *Mesophylax adopersus*, Испания	15.5	2
	S. cariocanus		
NCYC 2890	*Drosophila* sp., Бразилия	11.8	1
	S. cerevisiae		
S288C	Генетическая линия	0	4
ВКПМ Y-718	Полиплоидный мутант штамма Кокур-3, сухое белое вино, Крым, Россия	27.0	3
	S. jurei		
NCYC 3947	Кора дуба *Quercus robur*, Франция	17.2	2
	S. kudriavzevii		
NBRC 1802	Гниющие листья, Япония	5.0	1
	S. mikatae		
NBRC 1815	Почва, Япония	5.0	1
	Kluyveromyces marxianus		
CBS 6556	Ферментированное кукурузное тесто, Мексика	Нд	Нд

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов (Пущино, Россия); ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Москва, Россия); CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Утрехт, Нидерланды); NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation (Токио, Япония); NCYC – National Collection of Yeast Cultures (Норидж, Великобритания); PYCC – Portuguese Yeast Culture Collection (Лиссабон, Португалия); 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). 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, ATCC 96968 = ALKO 2638, ATCC 96971 = ALKO 2639.

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

** Нд – нет данных.

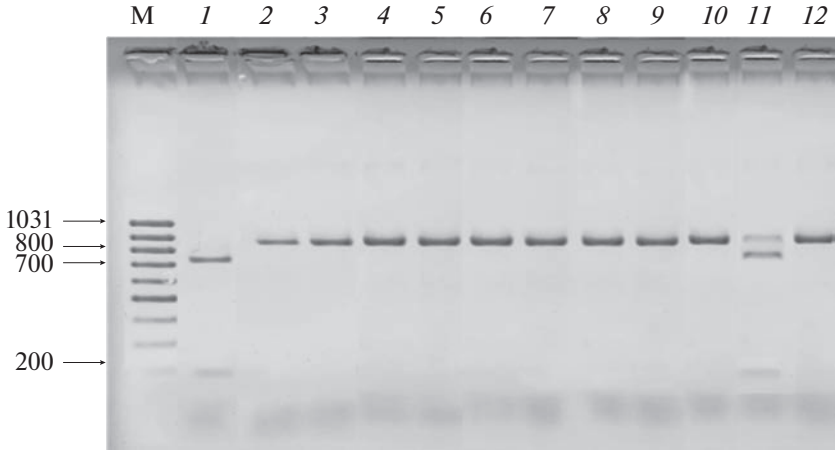

Рис. 1. Рестрикционный анализ амплифицированных 5.8-ITS-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеазы *Hpa*II. Дорожки: *3* – UCDFST 51-137, *4* – UCDFST 52-225, *5* – UCDFST 61-196, *6* – UCDFST 61-220, *7* – UCDFST 61-232, *8* – UCDFST 62-186, *9* – UCDFST 67-570, *10* – UCDFST 69-1006, *11* – UCDFST 73-538.2, *12* – UCDFST 72-129. В качестве контроля использовали штаммы *S. cerevisiae* S288C (дорожка *1*) и *S. paradoxus* CBS 432 (дорожка *2*). M – маркер молекулярных весов (п.н.). "100bp DNA Ladder" ("Fermentas", Литва).

генетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). В качестве внешней группы использовали эндо-полигалактуроназный ген *EPG1* дрожжей *Kluyveromyces marxianus* CBS 6566 (=KCTC17555), выделенных из ферментированного кукурузного теста (Мексика).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Видовая идентификация штаммов. Сначала мы провели идентификацию 10 штаммов дрожжей *Saccharomyces* из коллекции микроорганизмов UCDFST (Phaff Yeast Culture Collection, Department of Food Science and Technology, University of California, Дэвис, США): UCDFST 51-137, UCDFST 52-225, UCDFST 61-196, UCDFST 61-220, UCDFST 61-232, UCDFST 62-186, UCDFST 67-570, UCDFST 69-1006, UCDFST 72-129 и UCDFST 73-538.2 (табл. 1). Штаммы выделены из различных природных источников в Северной Америке, за исключением японского штамма UCDFST 67-570. Идентификацию штаммов проводили на основании ПЦР-ПДРФ-анализа 5.8S-ITS фрагментов, включающих ген 5.8S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2.

С помощью ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеаз *Hae*III и *Hpa*II можно различить дрожжи *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. bayanus* (Серпова и соавт., 2011). Характерной особенностью дрожжей *S. bayanus* является способность ферментировать мелибиозу, тогда как штаммы *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*, как правило, не способны утилизировать этот сахар. Принимая во внимание, что все 10 изученных штаммов из UCDFST-коллекции не сбраживали мелибиозу, они, по-видимому, относятся к *S. cerevisiae* или *S. paradoxus*. В качестве контролей использовали видовые тестеры *S. cerevisiae* S288C и *S. paradoxus* CBS 432. У всех изученных и контрольных штаммов размер амплифицированных фрагментов был одинаковым и составлял примерно 850 п.н., что характерно для дрожжей рода *Saccharomyces*. Амплифицированные 5.8S-ITS фрагменты анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазами *Hae*III и *Hpa*II. На рис. 1 представлены *Hpa*II-профили анализируемых и контрольных штаммов. Типовая культура *S. paradoxus* CBS 432 и 9 изученных штаммов (UCDFST 51-137, UCDFST 52-225, UCDFST 61-196, UCDFST 61-220, UCDFST 61-232, UCDFST 62-186, UCDFST 67-570, UCDFST 69-1006, UCDFST 72-129) не имеют *Hpa*II-сайта рестрикции (рис. 1, дорожки *2*, *3*–*10* и *12*). Два *Hpa*II-фрагмента размером 730 и 120 п.н. имеются у контрольного штамма *S. cerevisiae* S288c (рис. 1, дорожка *1*). У штамма UCDFST 73-538.2 обнаружен комбинированный профиль, объединяющий фрагменты *S. cerevisiae*-типа и *S. paradoxus*-типа (дорожка *11*).

Таким образом, UCDFST 73-538.2 является гибридом дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*, а остальные 9 изученных штаммов относятся к *S. paradoxus*.

Пектинолитическая активность была определена у 98 штаммов *Saccharomyces paradoxus*, относящихся к четырем географическим популяциям: европейской, дальневосточной, североамериканской и гавайской (табл. 1). Почти все изученные штаммы в той или иной степени были способны секретировать активную эндо-полигалактуроназу (табл. 1, рис. 2.). Пектинолитическую активность оценивали по размеру зон гидролиза полигалак-

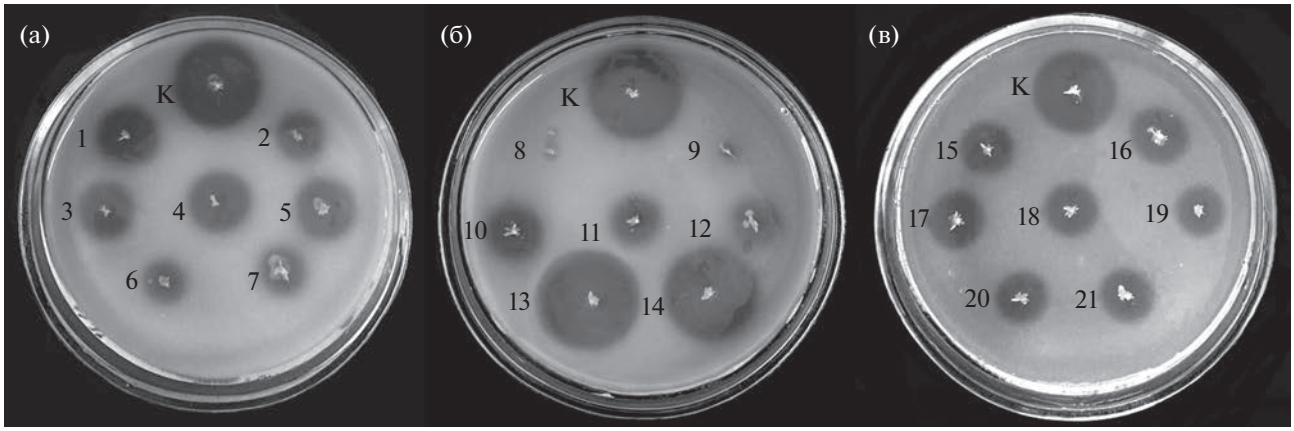

Рис. 2. Скрининг штаммов *Saccharomyces paradoxus* на наличие пектинолитической активности на PG-среде: (а): 1 – N20; 2 – N29; 3 – N35; 4 – ZP 506; 5 – N9; 6 – N14; 7 – N26; (б): 8 – ATCC 96968; 9 – UCDFST 71-101; 10 – UCDFST 73-538.2; 11 – UCDFST 72-145; 12 – UCDFST 67-570; 13 – UCDFST 62-186; 14 – UCDFST 61-220; (в): 15 – M2; 16 – M6; 17 – M7; 18 – M10; 19 – N43; 20 – 61.02; 21 – N48; K – контрольный штамм *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718.

туроновой кислоты вокруг колоний дрожжей. В зависимости от диаметра образующихся ореолов изученные штаммы были разделены на четыре группы: 1) до 15 мм; 2) 15–20 мм; 3) более 20 мм. В четвертую группу были отнесены штаммы, не имеющие активности на PG-среде.

По пектинолитической активности 58 штаммов европейской популяция *S. paradoxus* разделились на две равные группы. К первой группе (диаметр зоны лизиса до 15 мм) были отнесены 28 штаммов, преимущественно выделенных из сокотечений дуба *Quercus robur* (табл. 1, рис. 2а, 2в). Среди 28 штаммов второй группы (d = 15–20 мм) большинство изолировано с зеленой хвои ели, зеленых листьев брусники и сокотечений широколиственных деревьев в европейской части России (Naumov, 1987; Глушакова и соавт., 2007). Штаммы ATCC 96968 и ATCC 96971, выделенные из экссудата *Quercus* sp. в Финляндии, не имели активность и были отнесены к 4 группе (рис. 2б).

Одиннадцать штаммов дальневосточной популяции попали в первую группу (табл. 1, рис. 2б, 2в). Ко второй группе были отнесены выделенные на Дальнем Востоке России штаммы N45, N47 (сокотечение *Q. mongolica*) и BKM Y-1697 (сок амурского винограда), а также японский штамм NBRC 1805.

Из 18 штаммов североамериканской популяции шесть (95-1, 95-4, 95-7, UCDFST 79-128, UCDFST 79-140 и UCDFST 61-196) характеризовались диаметром зоны гидролиза менее 15 мм. Штаммы UCDFST 69-1006, UCDFST 61-248, UCDFST 51-186, UCDFST 51-137, UCDFST 52-153, UCDFST61-232, UCDFST 72-129 попали во вторую группу. Пять штаммов имели зоны гидролиза полигалактуроновой кислоты более 20 мм: UCDFST 52-225 (20.2 мм), UCDFST 61-359 (22.4 мм), 95-3 (22.9 мм), UCDFST 61-220 (25.4 мм) и UCDFST 62-186 (27.4 мм) (табл. 1, рис. 2б). Следует отметить, что пектинолитическая активность последнего штамма была выше, чем у контрольного штамма ВКПМ Y-718 (27.0 мм). Обладающий наибольшей пектинолитической активностью штамм UCDFST 62-186 выделен из осиного гнезда в Канаде (табл. 1).

Среди 7 изученных гавайских штаммов только два имели активность: UCDFST 72-145 (13.8 мм) и UCDFST 73-538.2 (14.6 мм) (табл. 1, рис. 2б). У штаммов UCDFST 72-149, UWO(PS) 91-917.1, UCDFST 72-140, UCDFST 71-101 и UCDFST 72-143 активность не обнаружена (табл. 1, рис. 2б).

Филогенетический анализ генов *PGU* дрожжей *S. paradoxus* и кодируемых ими аминокислотных последовательностей. Мы провели секвенирование генов *PGU* у 27 штаммов *S. paradoxus*, относящихся к различным популяциям: европейской (CBS 406, BKM Y-1707, BKM Y-1708, M22, M11, M6, M12, M37, M40, N9, N40, N15, ZP 506), дальневосточной (BKM Y-505, BKM Y-1704, N47), североамериканской (95-1, UCDFST 69-1006, UCDFST 61-359, UCDFST 61-220, UCDFST 52-225, UCDFST 61-248, UCDFST 52-153, UCDFST 79-128, UCDFST 62-186) и гавайской (UCDFST 73-538.2, UCDFST 72-145). Полученные нуклеотидные последовательности имели длину 1077 нуклеотида, что покрывает большую часть кодирующей области генов *PGU*. Нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с *PGU*-последовательностями штаммов *S. paradoxus*, депонированными в GenBank (Yue et al., 2017; He et al., 2022).

Штаммы европейской популяции имели идентичные последовательности генов *PGU* или отличались 1–6 нуклеотидными заменами. Наибольшие отличия (6 нуклеотидов) обнаружены у хорватского штамма RO88, который, согласно литературным данным (Eschstruth, Divol, 2011),

обладает высокой пектинолитической активностью. По нуклеотидным последовательностям генов *PGU* дальневосточные штаммы разделились на две группы. В первую вошли штаммы, выделенные на Дальнем Востоке России, Японии и Китае, имеющие идентичные *PGU*-последовательности или отличающиеся 1–3 заменами. Вторую группу сформировали шесть дивергентных китайских штаммов (HB-SNJ10a, SN-TB12-1, BJ-DLS2-1, BJ-DLS32-26, SN-QL4-2, BJ-DLS60-3), которые имеют идентичные *PGU*-последовательности и отличаются от штаммов первой группы 21–22 заменами. Различия между штаммами европейской и дальневосточной популяций составили от 6 до 28 замен в генах *PGU*.

Североамериканская популяция оказалась наиболее гетерогенной по нуклеотидным последовательностям генов *PGU*: от 0 до 88 замен. Из 9 проанализированных североамериканских штаммов только два (UCDFST 69-1006 и UCDFST 61-220) имели идентичные последовательности. От 1 до 10 замен обнаружено в генах *PGU* штаммов 95-1, UCDFST 69-1006, UCDFST 61-220, UCDFST 52-225, UCDFST 52-153 и UCDFST 79-128. Штаммы UCDFST 61-248 и UCDFST 62-186 имели сходные последовательности пектиназных генов (2 нуклеотидные замены), которые отличались от других североамериканских штаммов 14–20 нуклеотидами. Наиболее дивергентной оказалась *PGU*-последовательность штамма UCDFST 61-359: 82–88 нуклеотидных позиций. Этот штамм выделен из сокотечения вяза *Ulmus carpinifolia* в Калифорнии (табл. 1). Пектиназные гены североамериканских и европейских штаммов отличались 32–86 заменами, а с дальневосточными штаммами различия составили 31–87 нуклеотидов.

Нуклеотидные последовательности генов *PGU* трех гавайских штаммов UCDFST 73-538.2, UCDFST 72-145 и UWO (PS) 91-917.1, отличались 5–17 заменами. Интересно отметить, что ген *PGU* гибридного штамма UCDFST 73-538.2 отличается от последовательности североамериканского штамма UCDFST 52-153 всего одной синонимичной нуклеотидной заменой. Белковые последовательности эндо-полигалактуроназ этих штаммов идентичны. Различия между пектиназными генами гавайских и европейских штаммов составили от 33 до 40 замен, обнаружено 33–38 замен с дальневосточными и 1–92 замены с североамериканскими штаммами.

По полученным нуклеотидным последовательностям генов *PGU* дрожжей *S. paradoxus* были определены аминокислотные последовательности соответствующих белков из 359 аминокислотных остатков. На основании анализа аминокислотных последовательностей построено филогенетическое древо (рис. 3). В качестве внешней группы использовали эндо-полигалактуроназу Epg1 дрожжей *Kluyveromyces marxianus*.

На филогенетическом древе выделяются три основных кластера. Внутри первого кластера выделяются два подкластера. Один образован штаммами *S. cerevisiae*, а во втором объединились штаммы *S. paradoxus* и типовая культура *S. cariocanus* NCYC 2890. Внутри последнего подкластера также выделяются две группы. Первая включает штаммы североамериканской и гавайской популяций дрожжей *S. paradoxus*, а также *S. cariocanus*: 96.4–100% сходства. К этой группе примыкают шесть китайских штаммов (HB-SNJ10a, SN-TB12-1, BJ-DLS2-1, BJ-DLS32-26, SN-QL4-2, BJ-DLS60-3), Pgu-последовательности которых отличаются 3–7 белковыми заменами: 94.2–97.6% сходства. Вторая группа образована эндо-полигалактуроназами европейских и дальневосточных штаммов *S. paradoxus*, которые идентичны на 98.2–99.4%. Отдельное положение занимает белок североамериканского штамма UCDFST 61-359, который отличается 11–19 заменами от остальных штаммов *S. paradoxus* (рис. 3).

Второй кластер объединяет дрожжи *S. mikatae* и *S. jurei*, эндо-полигалактуроназы которых идентичны на 88.0–93.5%. Сходство белков Pgu1m/Pgu2m и Pgu1j/Pgu2j с Pgu-последовательностями *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*: 79.5–84.6%.

Третий кластер образован наиболее дивергентными белками Pgu1b, Pgu2b и Pgu3b дрожжей *S. bayanus*, имеющих 81.4–82.1%. сходства. Сходство с эндо-полигалактуроназами остальных видов *Saccharomyces* значительно ниже: 68.0–78.0% (рис. 3). Отдельное положение на филогенетическом древе занимают эндо-полигалактуроназы *S. kudriavzevii* и *S. arboricola*, которые идентичны на 72.3%. Сходство с белками остальных видов *Saccharomyces* составило 72.3–80.6% у *S. kudriavzevii* и 72.3–78.2% у *S. arboricola* (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что высокая пектинолическая активность характерна для дрожжей *S. paradoxus*. Из 98 изученных штаммов неспособность секретировать активную эндо-полигалактуроназу выявлена только у 5 гавайских (UCDFST 72-140, UCDFST 71-101, UCDFST 72-143, UCDFST 72-149, UWO (PS) 91-917.1) и двух европейских (ATCC 96968 и ATCC 96971) штаммов (табл. 1). Все остальные штаммы были способны в той или иной степени секретировать активную эндо-полигалактуроназу, при этом не было обнаружено ни одного штамма с диаметром зоны лизиса <11 мм. Североамериканские штаммы UCDFST 52-225, UCDFST 61-359, UCDFST 61-220, 95-3 и UCDFST 62-186 обладают очень высокой пектинолитической активностью, сопо-

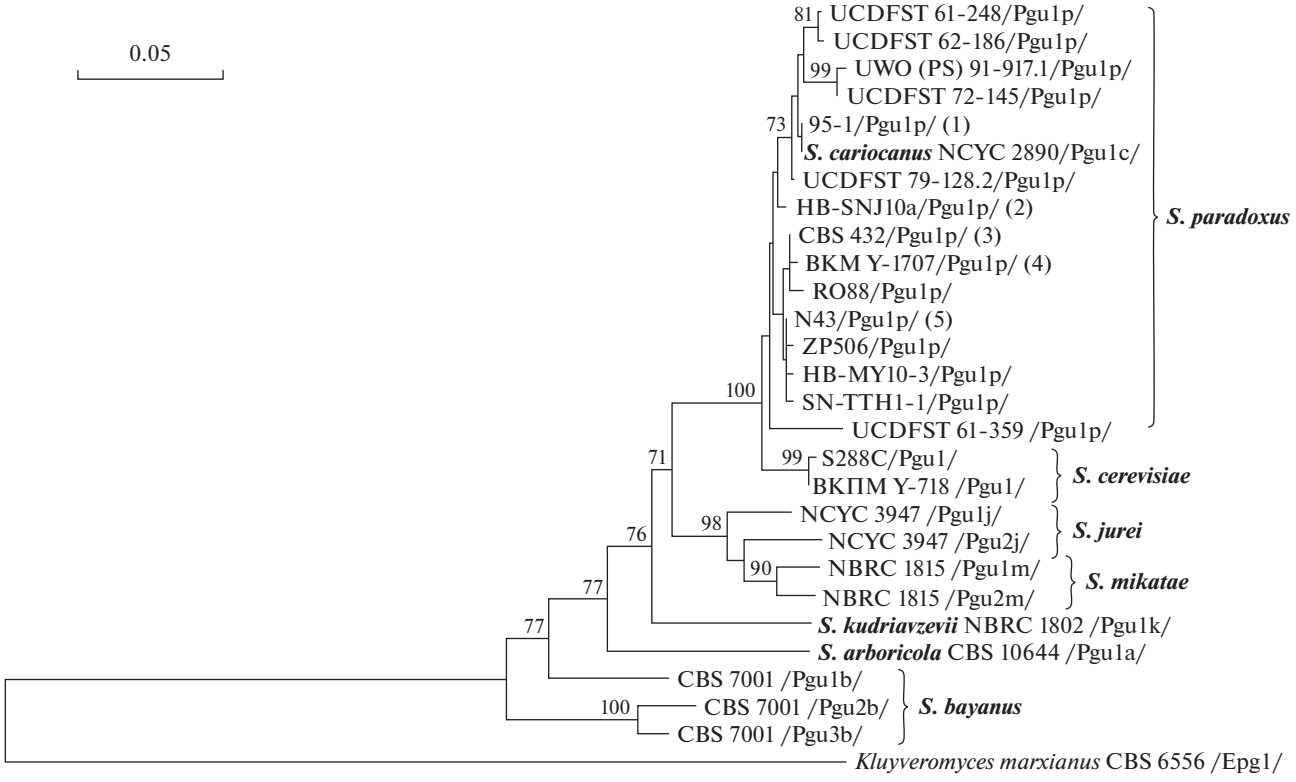

Рис. 3. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей эндо-полигалактуроназ Pgu дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована эндо-полигилактуроназа дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 50 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: (1) – UCDFST 52-153, UCDFST 69-1006, UCDFST 52-225, UCDFST 61-220, UCDFST 73-538.2; (2) – SN-TB12-1, BJ-DLS2-1, BJ-DLS32-26, SN-QL4-2, BJ-DLS60; (3) – N17, CBS 406, M22, M6, M11, M12, M37, M40, N9, N15, N40; (4) – BKM Y-1708, BKM Y-1697; (5) – N44, BKM Y-505, BKM Y-1704, N47, SN-ZZ18-9, BJ-DLS32-27, SN-HZZ6-2, XZ-98-1-1, SN-HZZ24-1, SN-ZZ59-1, HB-SNJ2a, RS9, SN-ZZ32-3, JL-WQ14-1, SN-HZZ1-1, SN-TTS3-10, JL-CB13-1, HB-XS3-1, HB-MY15-2, HB-XXY4-1, HB-XS1-1, HB-XS18-1, JL-CB5-1, HB-XS21-2.

ставимой или даже превышающей таковую экспериментально полученного тетраплоидного штамма *S. cerevisiae* ВКПМ Y-718 (табл. 1). Следует отметить, что большинство изученных нами ранее штаммов *S. cerevisiae*, а также дрожжи *S. arboricola*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* не способны расщеплять пектиновые вещества или обладают очень низкой активностью: зоны лизиса полигалактуроновой кислоты 3.5–15.6 мм (Наумова и соавт., 2021). В настоящее время известно только 4 штамма *S. jurei*, выделенных с коры дуба во Франции и Германии (Naseb et al., 2017; Hutzler et al., 2021). Ранее нами показано, что французские штаммы *S. jurei* обладают средней пектинолитической активностью: 14.7–17.2 мм (Наумова и соавт., 2021). В тоже время высокая пектинолитическая активность является видовой особенностью дрожжей *S. bayanus* (Боровкова и соавт., 2022).

Филогенетический анализ подтвердил видоспецифичность генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces*. Исключением является вид *S. cariocanus*, пектиназный ген которого не отличается по нуклеотидной последовательности от генов некоторых североамериканских штаммов *S. paradoxus*. Следует отметить, что по многим молекулярным маркерам дрожжи *S. cariocanus* не отличаются от штаммов *S. paradoxus* из североамериканской популяции (Liti et al., 2005, 2006). Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей пектиназных генов показал, что североамериканская и дальневосточная популяции *S. paradoxus* характеризуются более высоким генетическим разнообразием, чем европейская.

Из восьми известных видов *Saccharomyces* высокая пектинолитическая активность характерна для двух из них: *S. bayanus* и *S. paradoxus*. По-видимому, способность секретировать активную эндо-полигалактуроназу является видовой особенностью этих дрожжей. Экологической нишей дрожжей *S. bayanus* является виноградарство и виноделие (Наумов и соавт., 2011). С другой стороны, дрожжи *S. paradoxus* не связаны с хозяйственной деятельностью человека и встречаются

преимущественно в природных условиях (Наумов, 2013). Эти дрожжи обитают в сокотечениях и коре различных деревьев, особенно дубов, лесной подстилке и самой почве, в насекомых, на диких ягодах и др. Круглогодичное изучение эпифитных дрожжевых сообществ в Московской области показало, что в начале лета и конце зимы на живых и разлагающихся листьях некоторых видов растений существенно возрастает численность дрожжей *S. paradoxus* (Глушакова и соавт., 2007). Это может указывать на экологическую значимость эндо-полигалактуроназы. По-видимому, полигалактуроновая составляющая растительного пектина является важной частью углеводного питания обитающих в природе дрожжей *S. paradoxus*.

Обнаруженная нами (Наумова и соавт., 2021; настоящее исследование) высокая пектинолитическая активность *S. paradoxus* позволяет предложить использовать генофонд этого вида для селекционной работы с винными дрожжами. Особенно это касается штаммов, выделенных из винограда. Действительно, выделенный с виноградников штамм RO88 уже успешно используется в виноделии Хорватии (Redžepović et al., 2003; Eschstruth, Divol, 2011).

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., Шаламитский М.Ю., Наумова Е.С. Отбор штаммов *Saccharomyces bayanus* с высокой пектинолитической активностью и филогенетический анализ генов *PGU* // Биотехнология. 2022. Т. 38. № 1. С. 13–24.

Borovkova A.N., Shalamitskii M.Yu., Naumova E.S. Selection of *Saccharomyces bayanus* strains with high pectinolytic activity and phylogenetic analysis of *PGU* genes // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 9. P. 1–10.

Глушакова А.М., Иванникова Ю.В., Наумова Е.С., Чернов И.Ю., Наумов Г.И. Массовое выделение и идентификация дрожжей *Saccharomyces paradoxus* из филлосферы растений // Микробиология. 2007. Т. 76. С. 236–242.

Glushakova A.M., Ivannikova Y.V., Naumova E.S., Chernov I.Y., Naumov G.I. Massive isolation and identification of *Saccharomyces paradoxus* yeasts from plant phyllosphere // Microbiology (Moscow). 2007. V. 76. P. 205–210.

Наумов Г.И. Новая разновидность *S. bayanus* var. *uvarum*, установленная генетическим анализом // Микробиология. 2000. Т. 69. С. 410–414.

Naumov G.I. Saccharomyces bayanus var. *uvarum* comb. nov., a new variety established by genetic analysis // Microbiology (Moscow). 2000. V. 69. P. 338–342.

Наумов Г.И. Генетическое родство и биологический статус индустриально важных дрожжей *Saccharomyces eubayanus* Sampaio et al. // ДАН. 2017. Т. 473. № 5. С. 622–625.

Naumov G.I. Genetic relationship and biological status of the industrially important yeast *Saccharomyces eubayanus* Sampaio et al. // Dokl. Biol. Sciences. 2017. V. 473. P. 73–76.

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., 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.

Наумова Е.С., Боровкова А.Н., Шаламитский М.Ю., Наумов Г.И. Природный полиморфизм пектиназных генов *PGU* дрожжей рода *Saccharomyces* // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 344–356.

Naumova E.S., Borovkova A.N., Naumov G.I., Shalamitskiy M.Y. Natural polymorphism of pectinase *PGU* genes in the *Saccharomyces* yeasts // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 349–360.

Серпова Е.В., Кишковская С.А., Мартыненко Н.Н., Наумова Е.С. Молекулярно-генетическая идентификация винных дрожжей Крыма // Биотехнология. 2011. № 6. С. 47–54.

Belda I., Conchillo L.B., Ruiz J., Navascués E., Marquina D., Santos A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking // Int. J. Food Microbiol. 2016. V. 223. P. 1–8.

Belda I., Ruiz J., Esteban-Fernández A., Navascués E., Marquina D., Santos A., Moreno-Arribas M.V. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement // Molecules. 2017. V. 22. P. 189–218.

Bendixsen D.P., Frazão J.G., Stelkens R. Saccharomyces yeast hybrids on the rise // Yeast. 2022. V. 39. P. 40–54.

Berbegal C., Khomenko I., Russo P., Spano G., Fragasso M., Biasioli F., Capozzi V. PTR-ToF-MS for the online monitoring of alcoholic fermentation in wine: assessment of VOCs variability associated with different combinations of *Saccharomyces*/Non-*Saccharomyces* as a case-study // Fermentation. 2020. V. 6. P. 55–72.

da Silva E.G., de Fátima Borges M., Medina C., Hilsdorf Piccoli R., Freitas Schwan R. Pectinolytic enzymes secreted by

yeasts from tropical fruits // FEMS Yeast Res. 2005. V. 5. P. 859–865.

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 (Pgu1) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking 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.

He P.Y., Shao X.Q., Duan S.F., Han D.Y., Li K., Shi J.Y., Zhang R.P., Han P.J., Wang Q.M., Bai F.Y. Highly diverged lineages of *Saccharomyces paradoxus* in temperate to subtropical climate zones in China // Yeast. 2022. V. 39. P. 69–82.

Hebly M., Brickwedde A., Bolat I., Driessen M.R.M., de Hulster E.A.F., van den Broek M., Pronk J.T., Geertman J.-M., Daran J.-M., Daran-Lapujade P. S. cerevisiae × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. Art. fov005.

Hutzler M., Michel M., Kunz O., Kuusisto T., Magalhães F., Krogerus K., Gibson B. Unique brewing-relevant properties of a strain of *Saccharomyces jurei* isolated from ash (*Fraxinus excelsior*) // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 645271.

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 *Saccharomyces, Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae,* and the proposal of the new genera *Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma* and *Zygotorulaspora* // FEMS Yeast Res. 2003. V. 4. P. 233–245.

Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J.P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 14539–14544.

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 *Saccharomyces* // Genetics. 2006. V. 174. P. 839–850.

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

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.

Morard M., Benavent-Gil Y., Ortiz-Tovar G., Pérez-Través L., Querol A., Toft Ch., Barrio E. Genome structure reveals the diversity of mating mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids, and the genomic instability that promotes phenotypic diversity // Microb. Genom. 2020. V. 6. P. e000333.

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 basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts // Stud. Mycol. 1987. V. 30. P. 469–475.

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.

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. 2000. V. 50. P. 1931–1942.

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

Nespolo R.F., Villarroel C.A., Oporto C.I., Tapia S.M., Vega-Macaya F., Urbina K., De Chiara M., Mozzachiodi S., Mikhalev E., Thompson D., Larrondo L.F., Saenz-Agudelo P., Liti G., Cubillos F.A. An out-of-patagonia migration explains the worldwide diversity and distribution of *Saccharomyces eubayanus* lineages // PLoS Genetics. 2020. V. 16. e1008777.

Nikulin J., Krogerus K., Gibson B. Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation // Yeast. 2018. V. 35. P. 113–127.

Peris D., Pérez-Torrado R., Hittinger C.T., Barrio E., Querol A. On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids // Yeast. 2018. V. 35. P. 51–69.

Pérez-Través L., Lopes C.A., Querol A., Barrio E. On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: hybridization and potential hybrid speciation // PLoS One. 2014. V. 9. e93729.

Pretorius I.S. Tasting the terroir of wine yeast innovation // FEMS Yeast Res. 2020. V. 20. Art. foz084.

Redžepović S., Orlić S., Majdak A., Kozina B., Volschenk H., Viljoen-Bloom M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation // Int. J. Food. Microbiol. 2003. V. 83. P. 49–61.

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) // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 86. P. 201–207.

Rollero S., Zietsman A.J.J., Buffetto F., Schückel J., Ortiz-Julien A., Divol B. Kluyveromyces marxianus secretes a pectinase in shiraz grape must that impacts technological properties and aroma profile of wine // Agric. Food Chem. 2018. V. 66. P. 11739–11747.

Sampaio J.P., Gonçalves P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 2144–2152.

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.

Tufariello M., Fragasso M., Pico J., Panighel A., Castellarin S.D., Flamini R., Grieco F. Influence of Non-*Saccharomyces* on wine chemistry: a focus on aroma-related compounds // Molecules. 2021. V. 26. P. 644–666.

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 edn. 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.

Yue J.X., Li J., Aigrain L., Hallin J., Persson K., Oliver K., Bergstrom A., Coupland P., Warringer J., Lagomarsino M.C., Fischer G., Durbin R., Liti G. Contrasting evolutionary genome dynamics between domesticated and wild yeasts // Nature Genetics. 2017. V. 49. P. 913–924.

Pectinolytic Yeast *Saccharomyces paradoxus* as a New Gene Pool for Winemaking

A. N. Borovkova[1, 2], M. Yu. Shalamitskiy[3], and E. S. Naumova[1, *]

[1]*National Research Center "Kurchatov Institute", Kurchatov Complex for Genetic Research (GosNIIgenetika), Moscow, 123098 Russia*

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

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

**e-mail: lena_naumova@yahoo.com*

Received October 3, 2022; revised October 26, 2022; accepted October 31, 2022

Abstract—A large-scale screening of pectinolytic activity in the yeast *Saccharomyces paradoxus* isolated from various natural sources in Europe, Asia, North America, and the Hawaiian Islands was carried out. Of the 98 studied strains, pectinolytic activity was absent only in five Hawaiian and two European strains. Most strains were able to secrete active endo-polygalacturonase. North American strains UCDFST 52-225, UCDFST 61-359, UCDFST 61-220, 95-3, and UCDFST 62-186 had very high pectinolytic activity, comparable to or even higher than that of the experimentally obtained tetraploid strain *S. cerevisiae* VKPM Y-718. Comparative analysis of the nucleotide and amino acid sequences of pectinase genes showed that the North American and Far Eastern populations of *S. paradoxus* were more genetically diverse than the European and Hawaiian ones. Phylogenetic analysis confirmed the species specificity of the *PGU* genes of *Saccharomyces* yeasts. Of the eight *Saccharomyces* species, high pectinolytic activity is characteristic of *S. bayanus* and *S. paradoxus*. Five North American strains with the highest pectinolytic activity are of interest for further molecular genetic studies and breeding work with wine yeasts. The ecological role of endo-polygalacturonase is discussed.

Keywords: *Saccharomyces paradoxus*, genetic populations, the *PGU* genes, pectinase, endo-polygalacturonase, pectin, phylogenetic analysis