

А.В. Кантерова, С.И. Леонович, А.В. Савчик, Е.И. Ладутько, Г.И. Новик

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ КАРОТИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ

Аннотация. Из природных источников изолированы штаммы каротинсинтезирующих дрожжевых грибов. На основании исследования морфологии колоний и клеток дрожжей, а также анализа нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК штаммы отнесены к родам *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces*, *Rhodosporidiobolus*. В фонд Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов введены два новых рода дрожжевых грибов: *Cystofilobasidium*, *Rhodosporidiobolus* и три новых вида дрожжевых грибов: *Rhodosporidium azoricum*, *Rhodosporidium kratochvilovae*, *Rhodotorula graminis*. Отобранные штаммы в перспективе могут быть использованы в биотехнологическом производстве пищевых и кормовых каротинсодержащих добавок.

Ключевые слова: дрожжи, молекулярно-генетическая идентификация, пищевые каротинсодержащие добавки

A.V. Kanterova, S.I. Leanovich, A.V. Savchik, A.I. Ladutska, G.I. Novik

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Minsk, Republic of Belarus

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION OF CAROTENESYNTHESISING YEAST-LIKE FUNGI

Abstract. Strains of yeast-like fungi – sources of carotenoids were isolated from natural sources. Based on morphological examination of yeast colonies and cells and nucleotide sequence analysis of 18S rRNA genes strains were referred to genera *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces*, *Rhodosporidiobolus*. Two new genera of yeast-like fungi (*Cystofilobasidium*, *Rhodosporidiobolus*) and three new species (*Rhodosporidium azoricum*, *Rhodosporidium kratochvilovae*, *Rhodotorula graminis*) were entered in to the stock of Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms. Selected strains may be potentially used in biotechnological manufacturing of carotene-containing food and feed additives.

Keywords: yeast, molecular genetic identification, food carotene-containing additives

Введение. Дрожжевые грибы служат объектами различных биотехнологических процессов. Например, представители рода *Rhodotorula* синтезируют экзополисахариды, содержащие до 92,8 % применяемого в пищевой промышленности маннана [1], используются для получения возобновляемого вида топлива – биодизеля [2]. Штаммы каротинсинтезирующих дрожжевых грибов применяются в производстве лечебно-профилактических препаратов, пищевых и кормовых добавок, а также в комплексных процессах очистки сточных вод [3]. Отличительной особенностью красных дрожжей является образование в стационарной фазе роста большого количества каротиноидов [3]. В перечень основных каротиноидов, синтезируемых дрожжевыми грибами, входят: -каротин, торулен и торулародин. Каротиноиды являются источником провитамина А, кроме того, каротиноиды могут использоваться в качестве пищевых красителей, антиоксидантов и противораковых агентов [4].

Цель исследования – изучение морфологии колоний и клеток вновь выделенных из природных источников каротинсинтезирующих дрожжей, молекулярно-генетическая идентификация культур, пополнение фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (БКМ) физиологически активными штаммами дрожжевых грибов, перспективными для использования в производстве микробных каротиноидов.

Материалы и методы. Объектами исследований служили штаммы дрожжевых грибов, изолированные нами из образцов природных материалов (цветов примулы, флокса, астры, клевера, бархатцев,

листьев сныти и ягод малины). Для выделения дрожжевых грибов проводили посев смывов с образцов растительных материалов методом истощающего штриха на среду сусло-агар и инкубировали при температуре 25 °С.

Проверку способности дрожжей к сбраживанию источников углерода (сахароза, глюкоза, галактоза, раффиноза, мальтоза, крахмал, инулин, лактоза) проводили с использованием трубок Дунбара [5]. Для получения 2 % концентрации (для раффинозы – 6 %) источники углерода растворяли в 0,5 %-ном растворе дрожжевого экстракта. Растворы разливали по трубкам Дунбара. Посев производили культурами, выращенными на сусло-агаре. Тест проводили в трёх кратной повторности. Инкубация длилась 5–7 сут. О способности к сбраживанию сахара свидетельствовало образование газа в закрытом колене трубки.

Для определения видовой принадлежности дрожжей проводилось секвенирование по Сэнгеру [6]. Данный метод требовал выделения ДНК исследуемых штаммов, накопления объема выделенной нуклеиновой кислоты при помощи ПЦР-реакции, а также очистки образца ДНК перед секвенированием. Таким образом, вся работа включала следующие этапы: выделение геномной ДНК дрожжей, проведение ПЦР, проведение электрофореза, очистка выделенной ДНК, измерение концентрации образца ДНК, секвенирование по Сэнгеру, обработка полученных данных с использованием международной базы данных GenBank и программы BLAST. Для амплификации нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК использовали праймеры NS1 (5'-gtagcatatgctgtctc-3') и NS4 (5'-cttcgctcaattccttaag-3'). Амплификацию проводили с использованием активного точного режима регулирования и следующего температурно-временного профиля: денатурация – 3 мин при 95 °С; 35 циклов элонгации – 95 °С – 30 сек, 57 °С – 30 сек, 72 °С – 30 сек, достройка цепи – 5 мин при 72 °С; охлаждение до 4 °С. В работе использовали праймеры и реагенты производства «ThermoScientific» и «Праймтех». Реакционная смесь содержала 1ЧАМ-буфер для *Taq*-полимеразы, 200 мкМ каждого дНТФ, 2,5 ед. *Taq*-полимеразы, 10 пмол каждого праймера, 10–20 нг (зависело от концентрации выделенной ДНК у каждого исследуемого штамма) геномной ДНК. Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере Eppendorf Mastercycler epgradientS (Германия) с использованием активного точного режима регулирования температуры. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле (AppliChem) с использованием 1Чтрис-ацетатного буфера при напряженности электрического поля 5 В/см. Для визуализации ДНК гель окрашивали раствором бромистого этидия (AppliChem) в концентрации 0,05 мкг/мл. В качестве стандартов для определения размера продуктов ПЦР применяли маркер молекулярной массы фрагментов ДНК GeneRuler DNA Ladder 1Kb Plus (ThermoScientific). Условия проведения электрофореза: 120V, 80 mA, 40 мин. Перед секвенированием проводили очистку амплифицированных фрагментов генов с использованием набора PCR Purification kit (Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Измерение концентрации образца ДНК проводили при помощи флуориметра Quantus. Реакцию секвенирования осуществляли по методу Сэнгера с использованием набора реагентов для секвенирования Jena Cycle Sequencing Kit (JenaBiosciences) согласно инструкции производителя. Разделение и анализ продуктов секвенирования проводили с помощью анализатора Li-COR 4300 DNA Analyzer. Компьютерную обработку результатов секвенирования, их редактирование и предоставление в форматах FASTA, Genbank, Plain text осуществляли с помощью программы e-Seq™ Software. Сравнительный анализ гомологии секвенированной нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК и референтных последовательностей проводили с использованием международной базы данных GenBank и программы BLAST. Принадлежность исследуемого микроорганизма к определенному виду устанавливали при уровне гомологии его нуклеотидной последовательности референтным нуклеотидным последовательностям микроорганизмов данного вида от 96 % и более.

Результаты и обсуждение. С поверхности листьев, ягод и цветов декоративных, лекарственных и плодово-ягодных культур изолированы штаммы дрожжевых грибов. Морфологическая характеристика вновь выделенных дрожжевых культур дана на основании изучения макроморфологии колоний (при поверхностном культивировании на сусловом агаре) и микроморфологии – с использованием метода световой микроскопии нативных препаратов клеток (при увеличении Ч600). Детальное морфологическое описание макроколоний и микропрепаратов клеток дрожжевых грибов приведено в табл. 1 и на рис. 1.

Для установления способности выделенных штаммов дрожжей к сбраживанию сахаров применяли классический метод с использованием трубок Дунбара. Отобранные культуры дрожжевых грибов проверены на способность сбраживать следующие сахара: глюкозу, галактозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, раффинозу, инулин и крахмал. Экспериментально установленное отсутствие способности исследуемых штаммов дрожжей к сбраживанию углеводных субстратов является важным таксономическим признаком и подтверждает их принадлежность к каротинсинтезирующим дрожжам [7, 8].

Для вновь выделенных из природных источников культур дрожжевых грибов, способных накапливать каротиноиды, изучен уровень продукции биомассы в динамике развития популяции. На рис.

2, в качестве примера, представлены кривые роста, иллюстрирующие накопление биомассы у культур дрожжевых грибов на жидкой питательной среде на основе пивного сусле.

Т а б л и ц а 1. Морфологическая характеристика выделенных дрожжевых культур
Table 1. Morphological characteristics of isolated yeast cultures

Изоляты дрожжей	Источник выделения	Морфология колоний (в возрасте 3 суток) и клеток дрожжей
Пж4	Поверхность цветов примулы	Дрожжи формируют колонии диаметром до 2–3 мм, округлой формы, край колонии ровный, поверхность блестящая, реверзум не окрашен. Цвет ярко-красный. Клетки дрожжей округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается многостороннее почкование клеток.
Ф2	Поверхность цветов флокса	Дрожжи формируют колонии диаметром 1 мм, правильной округлой формы, край колонии волнистый, поверхность матовая, реверзум не окрашен. Цвет красный с оранжевым оттенком. Клетки дрожжей округлой формы, однотипные, располагаются одиночно.
Фб1	Поверхность цветов флокса	Дрожжи формируют колонии диаметром до 3 мм, правильной округлой формы, край колонии ровный, поверхность блестящая, реверзум не окрашен. Цвет колоний оранжевый. Клетки дрожжей округлой и овальной формы, наблюдается почкование.
А1	Поверхность цветов астры	Дрожжи формируют розовые слизистые колонии до 5 мм в диаметре, образуют «зеркало» из конидий на крышке чашки Петри, что свидетельствует об образовании баллистоспор на стеригмах. Клетки дрожжей округлой и овальной формы, наблюдается почкование.
Кк1	Поверхность цветов клевера красного	Дрожжи формируют розовые, слизистые колонии 2–3 мм в диаметре, колонии образуют «зеркало» из конидий на крышке чашки Петри, что свидетельствует об образовании баллистоспор на стеригмах. Клетки дрожжей округлой и овальной формы, наблюдается почкование.
М2	Поверхность ягод малины	Дрожжи формируют колонии диаметром 2 мм, колонии блестящие, с ровным краем, розового оттенка. Реверзум колонии не окрашен. Клетки дрожжей округлой и овальной формы, располагаются одиночно, наблюдается почкование клеток культуры.
Б3	Поверхность цветов бархатцев	Дрожжи формируют колонии диаметром 2–3 мм, правильной округлой формы, край колонии ровный, слизистые, блестящие, реверзум не окрашен. Цвет розово-красный. Клетки дрожжей округлой формы, наблюдается почкование.
Пф2	Поверхность цветов примулы	Дрожжи формируют колонии диаметром 2–3 мм, правильной округлой формы, образуют «зеркало» из конидий на крышке чашки Петри, что свидетельствует об образовании баллистоспор на стеригмах. Край колонии ровный, колонии слизистые, блестящие, реверзум не окрашен. Цвет красный. Клетки дрожжей округлой формы, наблюдается почкование.
Пж2	Поверхность цветов примулы	Дрожжи формируют колонии диаметром до 3 мм, правильной округлой формы, край колонии ровный, колонии слизистые, реверзум не окрашен. Цвет красный. Клетки дрожжей округлой и продолговатой формы.
Сн1	Поверхность листьев сныти	Дрожжи формируют колонии диаметром до 4 мм, правильной округлой формы, край колонии ровный, колонии слизистые, реверзум не окрашен. Цвет красный. Клетки дрожжей округлой и продолговатой формы.

Результаты измерения оптической плотности культуральной жидкости дрожжевых грибов в динамике развития популяции показали, что исследуемые культуры дрожжей активно накапливают биомассу в течение первых 48–72 ч глубинного культивирования. Далее увеличение биомассы происходило менее интенсивно и зависело от индивидуальных особенностей исследованной культуры дрожжей.

Для штаммов дрожжей выделена геномная ДНК, осуществлена амплификация генов 18S рРНК, проведена очистка и подготовка к секвенированию продуктов ПЦР, выполнено секвенирование, определена видовая принадлежность, а также подготовлены заключения о молекулярно-генетической идентификации культур (табл. 2).

Осуществлено депонирование культур дрожжевых грибов, выделенных из природных источников, по форме «гарантийное хранение» в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов (БКМ) (табл. 3). Оформлены паспорта на штаммы дрожжевых грибов, согласно стандартным правилам, принятым в крупнейших мировых коллекциях микроорганизмов. Обеспечено длительное хранение культур дрожжей с использованием низкотемпературной консервации и лиофилизации.

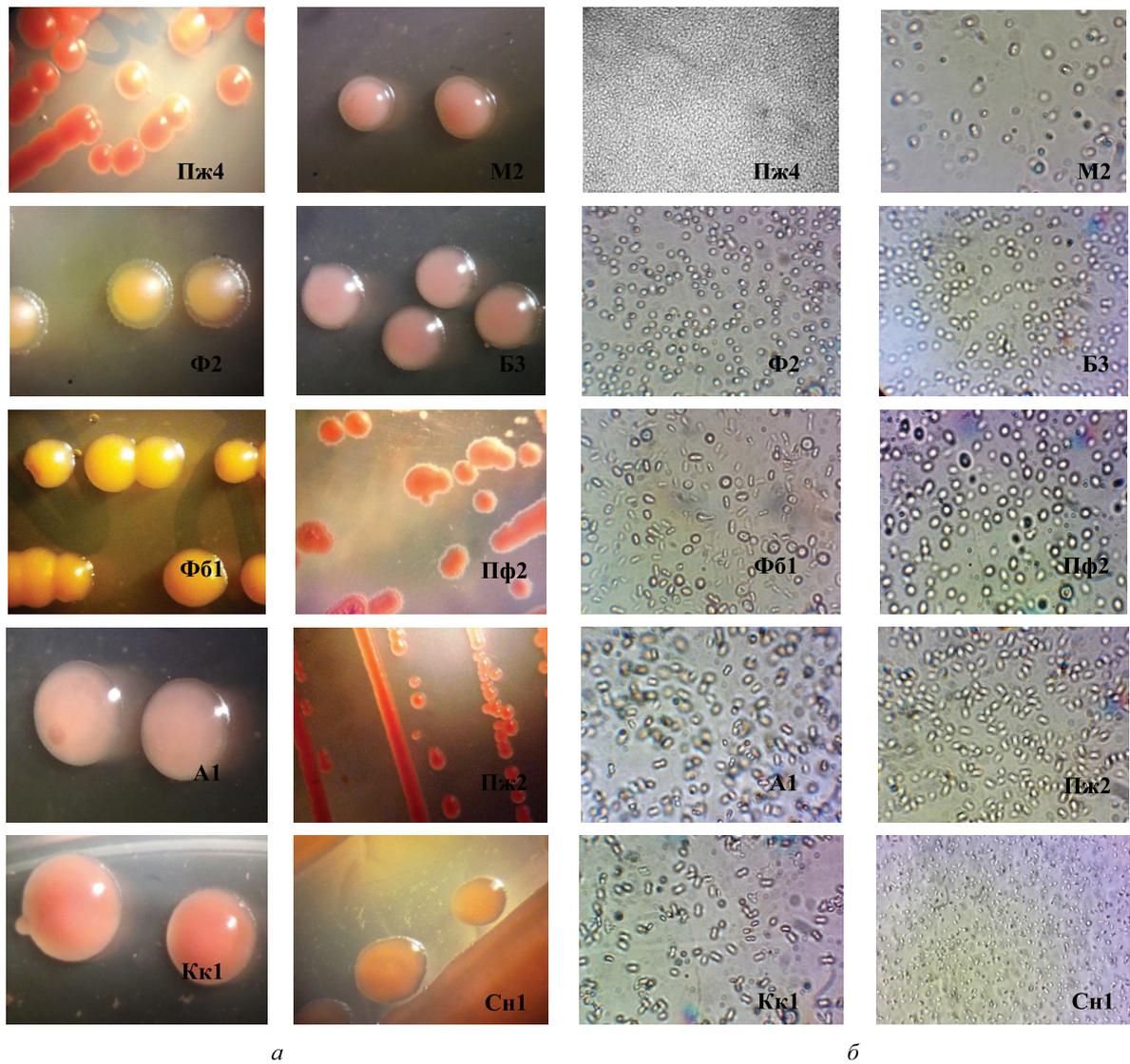


Рис. 1. Морфология колоний и клеток дрожжей, выделенных из природных источников:
а – колонии; б – клетки

Fig. 1. Morphology of colonies and yeast cells isolated from natural sources: a – colonies; б – cells

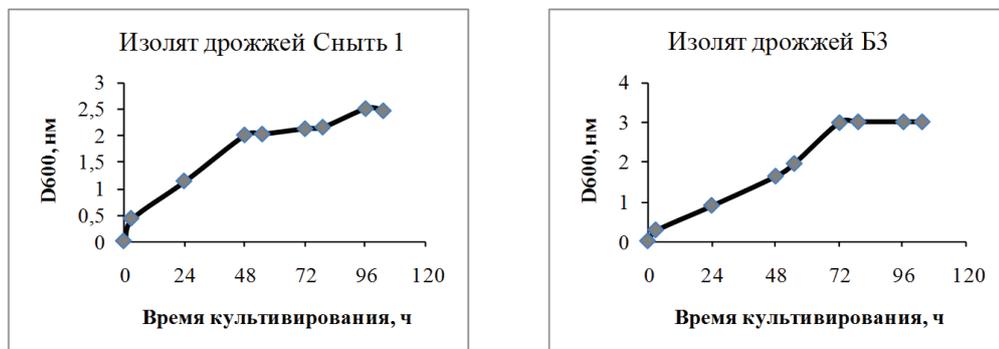


Рис. 2. Изменение значений оптической плотности культуральной жидкости при культивировании дрожжевых культур на жидкой питательной среде на основе пивного сусла

Fig. 2. The change in the optical density of the culture fluid during the cultivation of yeast cultures in a liquid nutrient medium based on beer wort

Таблица 2. Результаты молекулярно-генетической идентификации вновь выделенных штаммов дрожжей
Table 2. Molecular genetic identification results again isolated yeast strains

№ п/п	Штамм дрожжей	Гомология по гену 18S рРНК
1.	Пж 4	<i>Rhodospordium azoricum</i> , 99 %
2.	Ф 2	<i>Rhodospordium kratochvilovae</i> , 99 %
3.	Фб 1	<i>Cystofilobasidium</i> sp., 99 %
4.	А1	<i>Sporobolomyces roseus</i> , 99 %
5.	Кк1	<i>Sporobolomyces roseus</i> , 99 %
6.	Б 3	<i>Rhodotorula</i> sp., 100 %
7.	Пф 2	<i>Sporobolomyces roseus</i> , 99 %
8.	Сн 1	<i>Rhodotorula glutinis</i> , 99 %
9.	М 2	<i>Rhodotorula graminis</i> , 99 %
10.	Пж 2	<i>Rhodospordiobolus colostri</i> , 99 %

Таблица 3. Выделенные из природных источников штаммы дрожжевых грибов
Table 3. Yeast strains isolated from natural sources

№ п/п	Авторское название	№ БИМ	Род	Вид
1.	Пж 4	Y- 301 Г	<i>Rhodospordium</i>	<i>azoricum</i>
2.	Ф 2	Y- 302 Г	<i>Rhodospordium</i>	<i>kratochvilovae</i>
3.	Фб 1	Y- 303 Г	<i>Cystofilobasidium</i>	sp.
4.	А1	Y- 304 Г	<i>Sporobolomyces</i>	<i>roseus</i>
5.	Кк1	Y- 305 Г	<i>Sporobolomyces</i>	<i>roseus</i>
6.	Б 3	Y- 309 Г	<i>Rhodotorula</i>	sp.
7.	Пф 2	Y- 310 Г	<i>Sporobolomyces</i>	<i>roseus</i>
8.	Сн 1	Y- 313 Г	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>
9.	М 2	Y- 314 Г	<i>Rhodotorula</i>	<i>graminis</i>
10.	Пж 2	Y- 316 Г	<i>Rhodospordiobolus</i>	<i>colostri</i>

Заключение. С поверхности листьев, ягод и цветов декоративных, лекарственных и плодово-ягодных культур изолированы новые штаммы каротинсинтезирующих дрожжевых грибов. По результатам исследования морфологии колоний и клеток дрожжей, а также молекулярно-генетической идентификации культуры отнесены к родам *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Rhodospordium*, *Sporobolomyces*, *Rhodospordiobolus*. Впервые в фонд Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов введены два новых рода дрожжевых грибов: *Cystofilobasidium*, *Rhodospordiobolus* и три новых вида дрожжевых грибов: *Rhodospordium azoricum*, *Rhodospordium kratochvilovae*, *Rhodotorula graminis*. Отобранные штаммы в перспективе могут быть использованы в биотехнологическом производстве.

Список использованных источников

1. Satyanarayana, T. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications / T. Satyanarayana, G. Kunze. – Springer Sci.+Business Media B.V. 2009 – 744 p.
2. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity / Dai C, et all. – Afr. J Biotechnol., 2007. – Vol. 6, №18. – P. 2130–2134.
3. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry / Hernandez-Almanza A. et all.; Food Biosci., 2014. – Vol. 5. – P. 64–72.
4. Frengova, G.I. Improvement of carotenoid-synthesizing yeast *Rhodotorula rubra* by chemical mutagenesis / G.I. Frengova, E.D. Simova, D.M. Beshkova. – Z Naturforsch C. 2004. – Vol. 59. – № 1. – P. 99–103.
5. Бабьева, И.П. Методы выделения и идентификации дрожжей. Справочное пособие. / И.П. Бабьева, В.И. Голубев. – М. : Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
6. Lxoke, M. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR – based applications. / M. Lxoke, K. Kristjuhan, A. Kristjuhan - Biotechniques. – 2011. – Vol. 50, №5. – P. 325–328.
7. Barnett, J.A. A new key to the yeasts / J.A. Barnett, R.J. Pankhurst. – Amsterdam: North – Holland Publishing Company, 1974. – 273 p.
8. The yeasts. A taxonomic study. Second and enlarged edition. / Ed.: J. Lodder. – Amsterdam: North – Holland Publishing Company, 1970. – 1385 p.

References

1. Satyanarayana T, Kunze G. (eds). *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Sci.+Business Media B.V. 2009, 744 p.
2. Dai C, Tao J, Xie F, Dai Y, Zhao M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr. J Biotechnol.* 2007, 6, no18, pp. 2130–2134.
3. Hernandez-Almanza A., Montaneza J.C., Aguilar-Gonzalez M.A. et al. *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Biosci.* 2014, 5, pp. 64–72.
4. Frengova GI, Simova ED, Beshkova DM. Improvement of carotenoid-synthesizing yeast *Rhodotorula rubra* by chemical mutagenesis. *Z Naturforsch C.* 2004; 59, no.1, pp. 99–103.
5. Bab'yeva, I.P. *Metody vydeleniya i identifikatsii drozhzhey. Spravochnoye posobiye. [Methods of isolation and identification of yeast. Reference manual]*. M.: «Pishchevaya promyshlennost'», 1979, 120 p. (in Russian).
6. Lxoke, M. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR – based applications. *Biotechniques.* 2011, 50, no.5, pp. 325–328.
7. Barnett, J.A. *A new key to the yeasts* / J.A. Barnett, R.J. Pankhurst, Amsterdam: North – Holland Publishing Company, 1974, 273 p.
8. *The yeasts. A taxonomic study. Second and enlarged edition.* Ed.: J. Lodder., Amsterdam: North – Holland Publishing Company, 1970, 1385 p.

Информация об авторах

Кантерова Анна Валерьевна – научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: microbiol@tut.by

Леонovich Светлана Игоревна – младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mnemozina176@gmail.com

Савчик Анастасия Вячеславовна – младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastya.savchik@mail.ru

Ладутько Елена Ивановна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ladutko_elena@mail.ru

Новик Галина Ивановна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией «Коллекция микроорганизмов», Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. им. академика В.Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by

Information about authors

Kanterova Anna V. – The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: microbiol@tut.by

Leanovich Svetlana I. – The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mnemozina176@gmail.com

Savchik Anastasia V. – The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastya.savchik@mail.ru

Ladutskaya Alena I. – Ph.D. (Biological). The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ladutko_elena@mail.ru

Novik Galina I. – Ph.D. (Biological). The Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: galina_novik@mbio.bas-net.by