

На правах рукописи

САДЫКОВА АЙГУЛЬ ЖОМАРТОВНА

Генетические основы селекции ферментационных дрожжей

Saccharomyces и Kluyveromyces

Специальность 03.02.07 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики дрожжей (зав. лабораторией, доктор биологических наук, профессор Г.И. Наумов) Федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ФГУП «ГосНИИ генетика»).

Научный руководитель:

Наумова Елена Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник ФГУП «ГосНИИ генетика».

Научный консультант:

Мартыненко Николай Николаевич, доктор биологических наук, профессор, кафедра «Биотехнология и технология продуктов биорганического синтеза» ФГБОУВПО «Московский государственный университет пищевых производств».

Официальные оппоненты:

Шнырева Алла Викторовна, доктор биологических наук, профессор, кафедра микологии и альгологии, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Дорошенко Вера Георгиевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, "Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика" (ЗАО АГРИ)

Ведущая организация: ФГБОУВПО "Воронежский государственный университет"

Защита состоится «__» _____ 2016 г. в _____ на заседании Диссертационного совета Д217.013.01 при ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по адресу: 117545, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1. Факс: (495) 315-05-01.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГУП «ГосНИИ генетика» и на сайте <http://www.genetika.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Воюшина Татьяна Львовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Дрожжи *Saccharomyces* широко используются в хлебопечении, виноделии, пивоварении и производстве спирта. Большое практическое значение, возможность культивирования в лабораторных условиях и доступность для биохимических, молекулярных и генетических исследований сделали эти дрожжи универсальным модельным объектом. *S. cerevisiae* стали первым эукариотическим организмом, у которого была определена нуклеотидная последовательность генома (Goffeau et al. 1996).

Этиловый спирт широко используется в химической, фармакологической и пищевой промышленности. В последние годы в мире растет интерес к получению топливного этанола из возобновляемого растительного сырья как альтернативе невозобновляемым источникам энергии: нефти и газу (Dellomonaco et al. 2010). В основе биотехнологического получения этанола из крахмалсодержащего сырья (рожь, пшеница, картофель, кукуруза) и отходов сахарного производства (мелассы) лежит процесс брожения с использованием традиционных спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*. Основным дисахаридом при гидролизе крахмала является мальтоза, а основным компонентом мелассы – сахароза (до 54–63%). Кроме того, в состав мелассы входит трисахарид раффиноза, для полного гидролиза которого необходимо наличие у дрожжей двух ферментов: β -фруктозидазы и α -галактозидазы. Поэтому для спиртовых дрожжей важным признаком является способность ферментировать мальтозу, сахарозу и мелибиозу. Алкогольная ферментация дрожжами *Saccharomyces* указанных сахаров контролируется, соответственно, полимерными генами *MAL*, *SUC* и *MEL*, которые расположены в теломерных областях различных хромосом и могут накапливаться в определенных штаммах, тем самым приводя к интенсификации процесса ферментации (Hohmann 1987; Naumov et al. 1990, 1994, 1996). Изучение полиморфизма генов ферментации сахаров важно для понимания механизмов эволюционной изменчивости теломерных областей генома дрожжей и путей микроэволюции ферментативных признаков.

Современная технология производства спирта – многоэтапный процесс, включающий сахарификацию измельченного биологического сырья рекомбинантными грибными ферментами при температуре 43–50°C и последующую микробиологическую ферментацию сахаристого раствора спиртовыми дрожжами *S. cerevisiae* при оптимальной для их роста температуре 28–32°C. Объединение процессов сахарификации и ферментации является одним из способов удешевления и интенсификации получения этилового спирта, так как не требует дополнительных затрат на подогревание/охлаждение промышленных емкостей. В этой связи, актуальным является отбор и селекция штаммов *S. cerevisiae*, сочетающих термоустойчивость с хорошей ферментационной активностью.

Молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* и *Kl. marxianus*, постоянные компоненты многих кисломолочных продуктов, являются одними из немногих дрожжевых организмов, обладающих ферментом β -галактозидазой и способных утилизировать лактозу. Известно, что молоко и многие кисломолочные продукты

содержат сахар лактозу, который не усваивается у части взрослого населения из-за отсутствия соответствующего фермента, что приводит к различным расстройствам желудочно-кишечного тракта. Потребление кисломолочных продуктов, содержащих пробиотические микроорганизмы, может оказывать положительное воздействие на желудочно-кишечную экосистему, подавляя развитие патогенной микрофлоры и стимулируя иммунные механизмы слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (Wassenaar & Klein 2008; Maccaferri et al. 2012). В качестве пробиотических микроорганизмов наиболее часто используются молочнокислые бактерии, благоприятное влияние которых на здоровье человека было описано еще Мечниковым более ста лет назад (Metchnikoff 1908). Способные гидролизовать и утилизировать лактозу дрожжи *Kluyveromyces* являются перспективными в качестве пробиотических микроорганизмов. Следует отметить, что молекулярные исследования дрожжей *Kluyveromyces* проводятся, как правило, на ограниченном количестве штаммов, в основном на типовых культурах и генетических линиях одного происхождения. Практически ничего не известно о популяционно-генетических особенностях молочных дрожжей *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* в сравнении со штаммами этих видов, выделенных из природных источников.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является изучение молекулярного полиморфизма и генетических особенностей важных для биотехнологии дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* на материале штаммов различного экологического и географического происхождения.

В этой связи решались следующие задачи:

1. Сравнение геномов отечественных спиртовых штаммов *S. cerevisiae* с помощью пульс-электрофореза нативных хромосомных ДНК и Саузерн-гибридизации.
2. Изучение физиологических особенностей спиртовых дрожжей *S. cerevisiae* с целью отбора термоустойчивых штаммов, обладающих высокой ферментационной активностью. Анализ межштаммовых гибридов.
3. Определение нуклеотидной последовательности субтеломерных генов *SUC* дрожжей *S. cerevisiae* и гена *SUCa* дрожжей *S. arboricola*. Филогенетический анализ β -фруктозидаз дрожжей рода *Saccharomyces*.
4. Разработка метода молекулярной дифференциации молочных штаммов дрожжей *Kluyveromyces lactis* и *Kl. marxianus*.
5. Изучение молекулярно-генетических и физиологических особенностей молочных дрожжей *Kluyveromyces* различного происхождения.

Научная новизна и практическая значимость работы. С помощью ПЦР-ПДРФ-анализа 5.8S-ITS участков рДНК, молекулярного кариотипирования, Саузерн-гибридизации и физиологических тестов на термоустойчивость и ферментационную активность изучены особенности геномов 36 спиртовых штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, в основном отечественного происхождения. Обнаружено накопление полимерных генов *SUC* и *MAL*; отобраны штаммы, обладающие хорошей

ферментационной активностью. На основании молекулярно-генетического скрининга дрожжей *S. cerevisiae*, выделенных в странах с жарким климатом, отобраны штаммы, способные расти при повышенных температурах: 42°C и 43°C. Показано, что межштаммовая гибридизация является эффективным методом селекции спиртовых штаммов *S. cerevisiae*, сочетающих термоустойчивость и высокую ферментационную активность. Гибриды между спиртовой расой XII₇ и природными термоустойчивыми штаммами превосходили по ферментационной активности родительские культуры и были способны расти при повышенных температурах.

На большом материале штаммов *Saccharomyces* прослежена эволюция β-фруктозидазных генов. Показано, что виды *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* имеют только по одной копии гена *SUC* и не накапливают полимерные гены, как это характерно для штаммов *S. cerevisiae* из промышленных популяций. Проведен наиболее полный филогенетический анализ β-фруктозидазных генов дрожжей *Saccharomyces*. Полученные результаты указывают на видоспецифичность генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*.

Разработан экспресс-метод молекулярной идентификации фенотипически схожих молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* и *Kl. marxianus* на основе рестрикционного анализа ITS1-5.8S-ITS2–последовательности с использованием эндонуклеазы *Hind*III. На основании разработанного метода проведена кардинальная реидентификация дрожжей *Kluyveromyces*, хранящихся во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (ВКМ, Пущино). С помощью молекулярного кариотипирования и Саузерн-гибридизации изучен хромосомный полиморфизм генов ферментации лактозы *LAC* у дрожжей *Kl. marxianus*, выделенных из молочных продуктов и природных источников. Выявлен значительный полиморфизм кариотипических паттернов дрожжей *Kl. marxianus* различного происхождения. Обнаружено накопление генов *LAC* у молочных штаммов этого вида. На основании ферментационных тестов и Саузерн-гибридизации с зондами *LAC4* и *LAC12* отобрано 12 штаммов *Kl. marxianus*, способных при 37°C активно сбраживать лактозу.

Полученные результаты могут быть использованы в молекулярно-генетических исследованиях и селекционных разработках по спиртовым и молочным дрожжам. Разработанный метод молекулярной дифференциации молочных дрожжей *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* имеет большое практическое приложение в области биотехнологии и пищевой промышленности, а также для контроля правильности паспортизации штаммов *Kluyveromyces* в дрожжевых коллекциях. Работа вносит вклад в фундаментальную науку в области адаптивной эволюции ферментационных признаков, важных для науки и практики культивируемых дрожжей *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Молекулярно-генетические и физиологические особенности спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Межштаммовая гибридизация – эффективный метод селекции спиртовых штаммов *S. cerevisiae*, сочетающих термоустойчивость и высокую ферментационную активность.

2. Субтеломерные повторы β -фруктозидазных генов *SUC* могли появиться в геноме дрожжей *S. cerevisiae* под воздействием селекционного отбора в процессе их доместикации. Филогенетический анализ выявил видоспецифичность β -фруктозидазных генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*.
3. Полиморфизм молекулярных кариотипов зависит от происхождения штаммов дрожжей *Kluveromyces marxianus*. Для молочных штаммов характерно накопление генов *LAC* ферментации лактозы.

Апробация работы. Диссертационная работа была апробирована на семинаре секции «Генетика» Ученого Совета ФГУП «ГосНИИ генетика» 22 декабря 2015 года. Результаты исследований были представлены на Международном симпозиуме "Нетрадиционные дрожжи в постгеномную эру" (International Symposium "Non-Conventional Yeasts in the Postgenomic Era") (NCY-2011), Львов, Украина, 2011); на VII-ой Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, Россия, 2011) и на 38-ом Конгрессе федерации европейских биохимических обществ «Биологические механизмы» 6-11 июня 2013 г. (38th FEBS Congress, Санкт-Петербург, Россия, 2013).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них четыре статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, описание и обсуждение результатов, а также заключения, выводов и списка цитируемой литературы из 294 наименований. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 26 рисунков и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Молекулярно-генетические особенности и селекция спиртовых штаммов *Saccharomyces cerevisiae*

С помощью ПЦР–ПДРФ-анализа 5.8S-ITS-участков рДНК, молекулярного кариотипирования и Саузерн-гибридизации нами были изучены особенности геномов 36 спиртовых дрожжей *Saccharomyces*, в основном отечественного происхождения. Согласно морфологии колоний, вегетативных клеток, аскоспор и способности ферментировать глюкозу все изученные штаммы относятся к роду *Saccharomyces*. Этот род включает семь видов: *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* (Naumov et al. 2000; Kurtzman 2003; Wang & Bai 2008; Vaughan-Martini & Martini 2011). Указанные виды *Saccharomyces* можно дифференцировать на основании рестрикционного анализа 5.8S-ITS фрагментов рДНК (Fernandez-Espinar et al. 2000; Серпова и др. 2011). С помощью эндонуклеаз *Hae*III и *Hpa*II можно дифференцировать дрожжи *S. cerevisiae* от групп видов *S. paradoxus/S. cariocanus*, *S. bayanus/S. kudriavzevii* и *S. arboricola/S. mikatae*. Внутри каждой из групп виды можно различить по молекулярным кариотипам: *S. bayanus*, *S. cariocanus* и *S. mikatae* обладают видоспецифичными паттернами (Naumov et al. 2000; Wang & Bai 2008; Naumov et al. 1992; Fischer et al. 2000).

Согласно проведенному нами ПЦР–ПДРФ–анализу 5.8S-ITS–участков рДНК все 36 спиртовых штаммов относятся к виду *S. cerevisiae*. Изученные штаммы различались по способности сбраживать сахарозу, мальтозу и мелибиозу. Только 10 штаммов из 36 ферментировали мелибиозу, из них 8 сбраживали этот сахар на первые сутки: №1, №2, №4, №5, №6, ВКПМ Y-563, Г73 и К81. Штаммы Г660, Г112, ВС-2 и №148 не сбраживали мальтозу, а первые два также не сбраживали сахарозу. Через сутки на мальтозе забродили 22 штамма, а на сахарозе – 19 штаммов. Тринадцать штаммов быстро сбраживали оба сахара (№1, №2, Г73, ВКПМ Y-408, ВКПМ Y-1330, ВКПМ Y-1693, ВКПМ Y-2395, ВКМ Y-380, ВКМ Y-383, ВКМ Y-1169, ВКМ Y-382, ВКМ Y-1828 и XII₇). Все три сахара с разной скоростью ферментировали 10 штаммов: №1, №2, №4, №5, №6, ВКПМ Y-563, ВКПМ Y-564, Г67, Г73 и К81.

Молекулярный полиморфизм спиртовых штаммов *S. cerevisiae*. Кариотипический анализ подтвердил принадлежность изученных штаммов к *S. cerevisiae*. Молекулярные кариотипы некоторых штаммов представлены на рис. 1. Выявлен значительный полиморфизм размеров и количества хромосомных полос (рис. 1а). Согласно интенсивности окрашивания бромистым этидием, некоторые электрофоретические полосы содержат более одной хромосомы. Так, практически у всех штаммов хромосомы XIII и XVI мигрировали в дуплете. Двойными также были полосы, содержащие пары хромосом V/VIII, VII/XV. У 11 штаммов, например, ВКМ Y-380, ВКМ Y-381, ВКМ Y-1169, ВКМ Y-1812 и Г67 (рис. 1, дорожки 8, 9, 12, 13, 16) указанные хромосомы разделились. Восемнадцать штаммов имеют в своем кариотипе более 16 хромосомных полос. Их паттерны характеризуются наличием четырех хромосомных полос размером 245–370 т.п.н. и дополнительных хромосом размером 580–945 т.п.н. (рис. 1, дорожки 9–17, 20). Штаммы Г660 и Г112 имеют практически идентичные кариотипы с 12 хромосомными полосами размером от 245 до 2200 т.п.н. (рис. 1а, дорожки 18 и 19). Также отмечено большое сходство кариотипов китайских сухих дрожжей (№1, №2, №4–№6) (рис. 1а, дорожки 3–7). Согласно кариотипическому анализу многие спиртовые штаммы содержат дополнительные хромосомы и, по-видимому, являются анеуплоидными.

С помощью Саузерн-гибридизации мы изучили хромосомный полиморфизм генов *SUC*, *MAL* и *MEL* у 36 изученных спиртовых штаммов (рис. 1б и в). Ферментация мальтозы у дрожжей *S. cerevisiae* детерминируется пятью локусами: *MAL1–MAL4* и *MAL6*, каждый из которых состоит из трех тесно сцепленных генов, кодирующих мальтозную пермеазу (GENE1), мальтазу (GENE2) и регуляторный транскрипционный активатор (GENE3) (Chow et al. 1989). Для ферментации мальтозы необходимо наличие всех трех генов в любом локусе. У большинства изученных штаммов гибридационные профили с тремя зондами GENE1, GENE2 и GENE3 были идентичными. На рис. 1б представлены результаты гибридизации с зондом GENE2. В качестве контроля использовали штамм ВКМ Y-1830, обладающий всеми пятью известными локусами *MAL*, расположенными в теломерных районах различных хромосом: *MAL1* (хромосома VII), *MAL2* (III), *MAL3* (II), *MAL4* (XI) и *MAL6* (VIII) (рис. 1б, дорожка 2). Большинство изученных спиртовых штаммов

обладают несколькими локусами *MAL*. Локус *MAL1* присутствует у всех изученных штаммов, а 29 штаммов также обладают локусом *MAL3*. Новых локусов *MAL* у изученных штаммов нами не обнаружено.

На рис. 1в представлены результаты Саузерн-гибридизации с зондом *SUC2*. Известно девять полимерных генов *SUC*, расположенных в различных хромосомах: *SUC1* (VII), *SUC2* (IX), *SUC3* (II), *SUC4* (XIII), *SUC5* (IV), *SUC7* (VIII), *SUC8* (X), *SUC9* (XIV) и *SUC10* (XVI) (Mortimer et al. 1992; Carlson & Botstein 1983; Carlson & Celenza 1985; Наумов и Наумова 2010). Саузерн-анализ с зондом *SUC2* выявил значительный полиморфизм гибридизационных профилей: у разных штаммов обнаружено от одного до семи гибридизационных сигналов (рис. 1в). Все 36 штаммов обладают геном *SUC2*, локализованным в хромосоме IX. У 19 штаммов зонд *SUC2* гибридизовался к хр. VII, в которой расположен ген *SUC1* (рис. 1в, дорожки 8–20). Причем, штамм ВКМ Y-380 обладает дополнительной хр. VII (рис. 1в, дорожка 8). У восьми штаммов зонд *SUC2* гибридизовался к хромосомной полосе, соответствующей по размеру хр. V стандартного штамма YNN 295 (рис. 1в, дорожки 8, 9, 12, 16, 20). По-видимому, эти штаммы обладают ранее неизвестным геном *SUC*. У ряда штаммов обнаружен еще один новый ген *SUC*, локализованный в хр. VI (рис. 1в, дорожки 9, 10, 12, 13, 17, 20). Согласно Саузерн-гибридизации, все 10 сбраживающих мелибиозу спиртовых штаммов обладают только одним локализованным в хр. II геном *MEL1*.

Таким образом, обнаружено накопление полимерных генов *SUC* и *MAL* у спиртовых штаммов *S. cerevisiae*.

Физиологические особенности спиртовых штаммов *S. cerevisiae*. Все 36 спиртовых штаммов хорошо росли при температуре 37–39°C. Двадцать штаммов росли и при 40°C, однако хороший рост отмечен только у 11 из них: №1, №2, №4, №5, №6, Г67, ВКПМ Y-187, ВКПМ Y-564, ВКМ Y-380, ВКМ Y-1812 и XII₇. Указанные штаммы были проверены на способность расти при температуре 40°C после теплового шока в 46°C, а также при температурах 42°C и 44°C, после теплового шока, соответственно, в 48°C и 50°C. Все 11 штаммов имели хороший рост при 40°C и после теплового шока. Однако ни один из них не рос при более высоких температурах.

По результатам ферментационных тестов, Саузерн-анализа и тестов на термоустойчивость мы отобрали 10 штаммов, у которых была определена ферментационная активность (рис. 2). Скорость сбраживания 2%-ой глюкозы определяли по количеству выделенного углекислого газа весовым методом через 24, 48 и 72 часа. На первые сутки наиболее интенсивное брожение отмечено у штаммов №1, ВКПМ Y-564 и Г67. Через 48 часов интенсивно забродили еще четыре штамма: №5, ВКПМ Y-187, ВКМ Y-1812 и XII₇. Указанные семь штаммов показали наилучшие результаты и через 72 часа. Выделяются четыре штамма, обладающие хорошей ферментационной активностью: ВКПМ Y-187, №5, XII₇ и Г67 (рис. 2). Следует отметить, что последний штамм обладает полимерными генами *MAL* и *SUC*, а также геном *MEL1* (рис. 1б, 1в, дорожка 16). Принимая во внимание, что ни один из изученных спиртовых штаммов не способен расти при температуре выше 40°C, была поставлена задача поиска термоустойчивых штаммов *S. cerevisiae*.

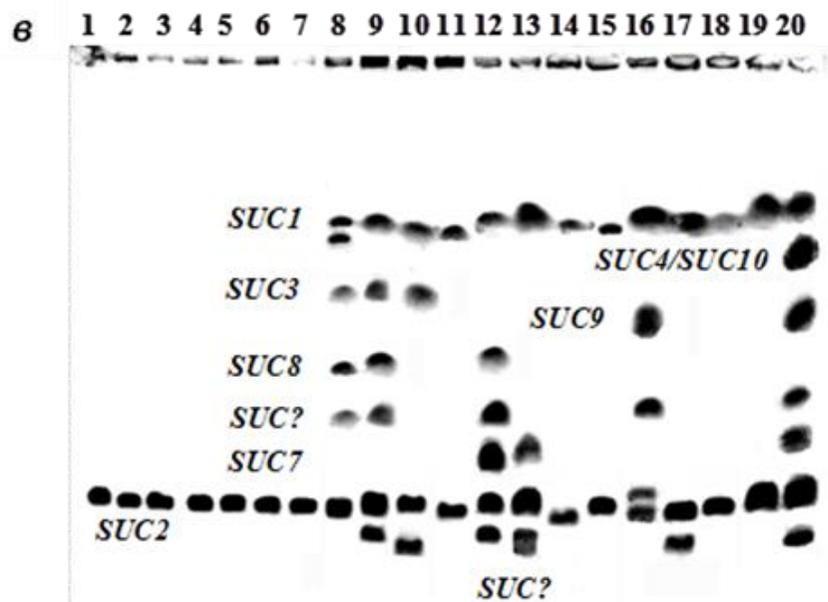
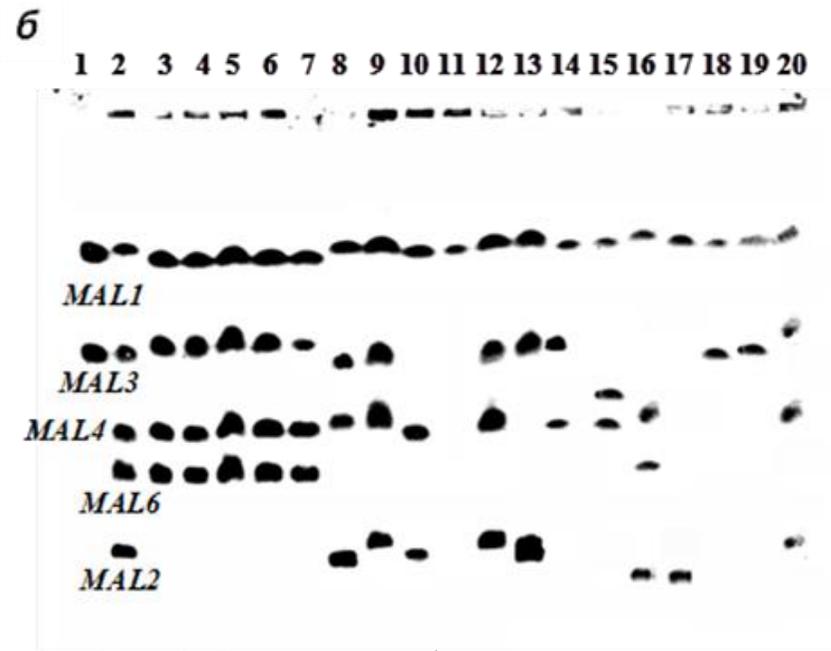
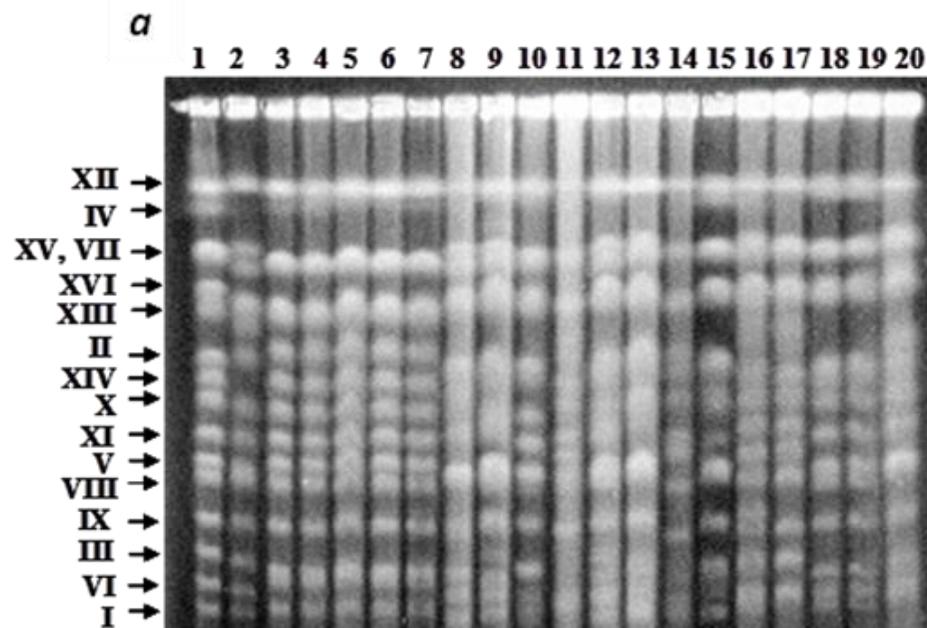


Рис. 1. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, полученных из коллекций ВКМ и ВНИИПБТ (а) и Саузерн-гибридизация с зондами *MAL62* (б) и *SUC2* (в). Дорожки: 1 – YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – ВКМ Y-1830 (б)/X2180-1A (в); 3 – №1; 4 – №2; 5 – №4; 6 – №5; 7 – №6; 8 – ВКМ Y-380; 9 – ВКМ Y-381; 10 – ВКМ Y-382; 11 – ВКМ Y-383; 12 – ВКМ Y-1169; 13 – ВКМ Y-1812; 14 – ВКМ Y-1828; 15 – В; 16 – Г67; 17 – Г73; 18 – Г660; 19 – Г112; 20 – К81. Порядок хромосом приведен согласно штамму YNN 295.

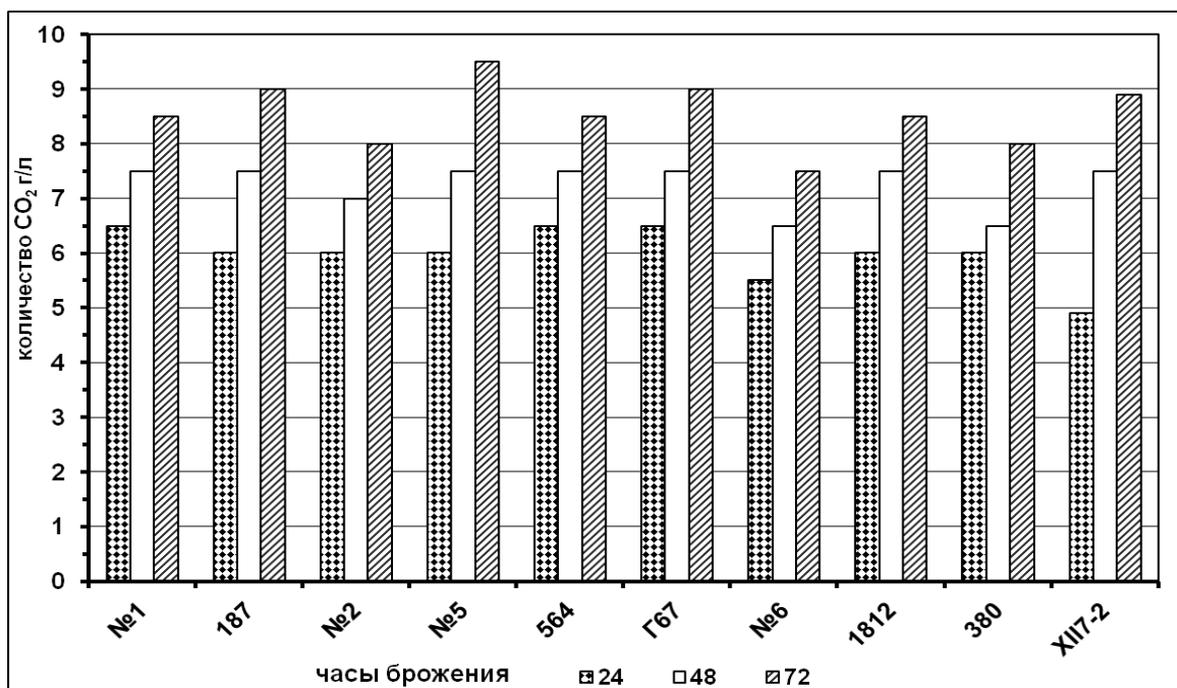
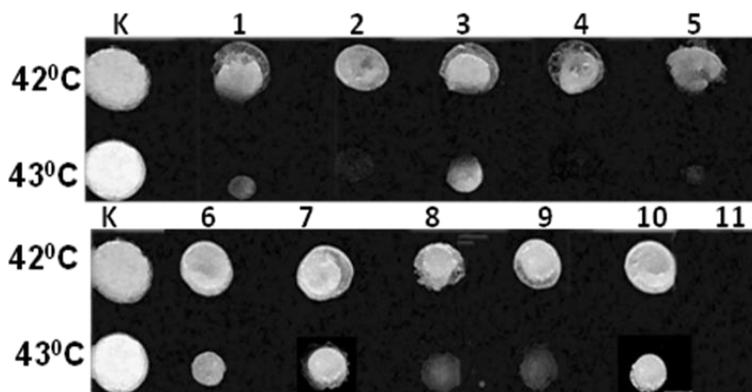


Рис. 2. Интенсивность сбраживания 2%-ной глюкозы спиртовыми штаммами *S. cerevisiae*

Селекция спиртовых штаммов дрожжей *S. cerevisiae*. С целью обнаружения термоустойчивых дрожжей мы провели молекулярно-физиологический скрининг 42 штаммов *S. cerevisiae*, выделенных в Африке, Южной Америке, Юго-Восточной и Средней Азии. Все штаммы представлены фертильными моноспоровыми культурами. Их видовая принадлежность была ранее установлена в нашей лаборатории на основании генетического анализа (Naumov et al. 2001; Наумов и Наумова 2011). Изученные штаммы были оттестированы по способности расти при повышенных температурах. Из 42 штаммов 16 хорошо росли при 42°C. Для ряда штаммов было использовано по несколько сегрегантов. Хороший рост при 42°C после теплового шока отмечен у 7961-1D, 7961-2B, 87-2421.1-2A, 83-787-3, 7962-4B, 2985-4B, 3529-7B, 52922-4-1-1A:-1C, T6-2B и T8-12B. Указанные штаммы сбраживали сахарозу через сутки, а последние шесть также сбраживали мальтозу. При 43°C после теплового шока рост отмечен только у штаммов 52922-4-1-1A:-1C и 87-2421.1-2A. Первый штамм выделен из рисового вина на Филиппинах, а второй – из кактуса на Гавайских островах. Из 10 штаммов, растущих при 42°C, наиболее интенсивное сбраживание 2%-ной глюкозы отмечено у 7962-4B, 52922-4-1-1A:-1C, 87-2421.1-2A и T8-12B.

У штаммов *S. cerevisiae*, имеющих различное экологическое и географическое происхождение, следует ожидать значительную дивергенцию на генном уровне, а их гибридизация может привести к гетерозисному селекционному эффекту. Для проведения селекционных работ необходимо иметь исходный материал в виде высокофертильных инбредных линий. По результатам физиологических тестов (термоустойчивость, ферментация сахаров и ферментационная активность) нами были отобраны четыре спиртовых (ВКПМ Y-187, №5, XII₇ и Г67) и четыре термоустойчивых (7962-4B, 3529-7B, 52922-4-1-1A:-1C и 87-2421.1-2A) штамма. Все указанные термоустойчивые штаммы характеризуются высокой выживаемостью

Рис. 3. Способность межштаммовых гибридов и родительских штаммов *S. cerevisiae* расти при температурах 42⁰С и 43⁰С. 1 – Н1-1; 2 – Н1-2; 3 – Н2-1; 4 – Н3-1; 5 – Н3-2; 6 – Н4-1; 7 – 52922-4-1-1А; 8 – 7962-4В; 9 – 3529-7В; 10 – 87-2421.1-2А; 11 – XII₇-2. К – контрольный штамм *Ogataea parapolyomorpha* 1-IR, способный расти при 48⁰С.



аскоспор. Из четырех спиртовых штаммов фертильной является только инбредная линия расы XII (XII₇-2). Следует отметить, что на основе этих дрожжей были созданы отечественные генетические линии *S. cerevisiae*, используемые в Петергофе и Гатчине (Захаров и Симаров 1966; <http://www.bio.pu.ru/faculty/collections/genetics.php>). Между термоустойчивыми штаммами и спиртовой расой в нашей лаборатории были получены следующие гибриды: 3529-7В × XII₇-2 (Н1-1, Н1-2), 87-2421.1-2А × XII₇-2 (Н2-1), 7962-4В × XII₇-2 (Н3-1, Н3-2) и 52922-4-1-1А:-1С × XII₇-2 (Н4-1). Указанные гибриды были изучены по способности расти при повышенных температурах (рис. 3).

В отличие от спиртовой расы, все гибриды давали хороший рост при температуре 42⁰С, что может указывать на доминантное наследование признака термоустойчивости у штаммов 7962-4В, 3529-7В, 52922-4-1-1А:-1С и 87-2421.1-2А (рис. 3). По-видимому, благодаря эволюционной адаптации, эти штаммы способны выживать в экстремальных условиях в регионах с жарким климатом, в которых температура может превышать 35⁰С, при которой ингибируется рост обычных штаммов *S. cerevisiae*. При 43⁰С росли гибриды Н2-1 и Н4-1. Слабый рост

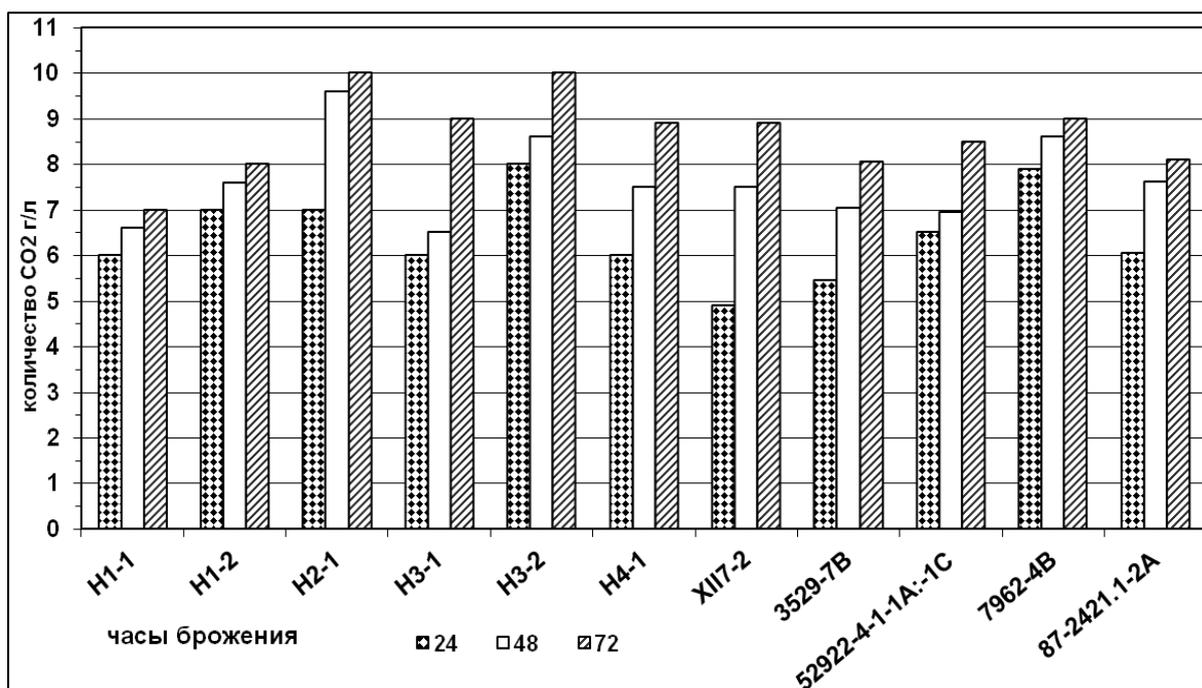


Рис. 4. Ферментационная активность межштаммовых гибридов и родительских штаммов *S. cerevisiae*.

также отмечен у гибрида Н1-1. Родительские штаммы последнего гибрида (3529-7В и XII₇-2) не способны расти при 43°C (рис. 3). На рис. 4 представлена ферментационная активность полученных гибридов и родительских штаммов. Полученные гибриды существенно различались по интенсивности ферментации глюкозы. Так, гибриды Н1-1 и Н1-2 (3529-7В × XII₇-2), бродили на первые сутки активнее, чем родительские штаммы. Однако на третьи сутки их ферментационная активность была существенно ниже, чем у спиртовых дрожжей XII₇-2. Гибрид Н4-1 имел такую же ферментационную активность, как моноспоровая культура XII₇-2 (рис. 4), при этом был способен расти при 43°C как родительский штамм 52922-4-1А (рис. 3, дорожки 6 и 7). Наибольшую ферментационную активность имеют гибриды Н2-1, Н3-2 с участием термоустойчивых штаммов, соответственно, 87-2421-2А и 7962-4В (рис. 4). Первый гибрид рос при 43°C (рис. 3, дорожка 3). Второй гибрид с участием штамма 7962-4В (Н3-1) рос при 42°C (рис. 3, дорожка 4).

Полигенный кумулятивный контроль количественных признаков и генетическая разнокачественность неблизкородственных штаммов являются генетической основой внутривидового гетерозиса. Действительно, некоторые изученные нами межштаммовые гибриды превосходили по ферментационной активности родительские штаммы и были способны расти при повышенных температурах. Полученные гибриды представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных разработок.

2. Молекулярный полиморфизм β-фруктозидазных генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*

Сахароза – естественный источник углерода для дрожжей рода *Saccharomyces*. Гидролиз этого дисахарида до глюкозы и фруктозы осуществляется с помощью фермента инвертазы (β-фруктозидазы), который кодируется полимерными генами *SUC*: *SUC1–SUC5*, *SUC7–SUC10*. За исключением *SUC2*, эти гены локализованы в мобильных субтеломерных районах хромосом (Carlson & Botstein 1983; Carlson et al. 1985; Sarokin & Carlson 1986; Mortimer et al. 1992; Наумов и Наумова 2010). Ген *SUC2*, или его нефункциональный аллель *suc2⁰*, имеются у всех изученных природных и индустриальных штаммов *S. cerevisiae* (Carlson & Botstein 1983; Naumov et al. 1992; Naumov et al. 1996; Naumova et al. 2003; Ness & Aigle 1995; Denayrolles et al. 1997). Накопление теломерных генов *SUC* наблюдается у культурных дрожжей *S. cerevisiae*, участвующих в ферментационных процессах хлебопечения, пивоварения и производства спирта (Naumov et al. 1996; Ness & Aigle 1995; Denayrolles et al. 1997).

Хромосомный полиморфизм генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*. С помощью пульс-электрофореза и последующей Саузерн-гибридизации хромосомной ДНК с зондом *SUC2* мы провели крупномасштабный скрининг β-фруктозидазных генов дрожжей *Saccharomyces* различной видовой принадлежности. У всех изученных штаммов *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* была обнаружена только одна гибридационная полоса, соответствующая по размеру хромосоме IX стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, в которой расположен ген *SUC2* (рис. 5, дорожка 1).

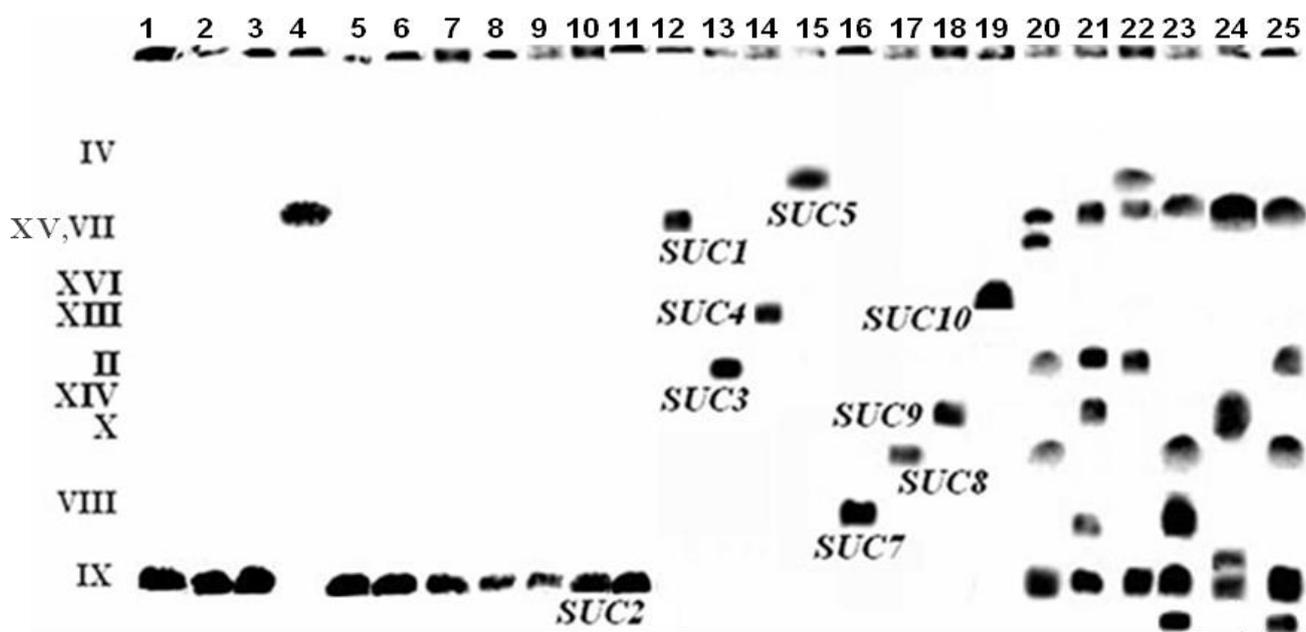


Рис. 5. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК видов рода *Saccharomyces* с зондом *SUC2* *S. cerevisiae*. Римскими цифрами указана нумерация хромосом, согласно штамму *S. cerevisiae* YNN 295 (дорожка 1). 2 – *S. cerevisiae* S288C; 3 – *S. paradoxus* CBS 432; 4 – *S. cariocanus* UFRL 50816; 5 – *S. kudriavzevii* NBRC 1802; 6 – *S. mikatae* NBRC 1815; 7 – *S. bayanus* CBS 7001; *S. arboricola*: 8 – CBS 10644; 9 – AS 2.3318; 10 – AS 2.3319; 11 – TJ14M01. *S. cerevisiae*: 12 – SH4 108-2D (*SUC1*); 13 – SH4.107-1A (*SUC3*); 14 – SH4 1.82.-2B (*SUC4*); 15 – S51-6D (*SUC5*); 16 – S22-6A (*SUC7*); 17 – S0-2A (*SUC8*); 18 – S20-6A (*SUC9*); 19 – S101-4A (*SUC10*); 20 – ВКМ Y-380; 21 – ВКПМ Y-408; 22 – ВКПМ Y-563; 23 – ВКМ Y-1169; 24 – Г67; 25 – ВКМ Y-381.

У *S. cariocanus* гибридационный сигнал расположен значительно выше, чем у остальных штаммов (рис. 5, дорожка 4) в районе хромосомы XV стандартного штамма YNN 295. Известно, что молекулярный кариотип этих дрожжей характеризуется наличием четырех реципрокных транслокаций, одна из которых затрагивает хромосомы IX и XV (Fisher et al. 2000). В отличие от природных изолятов, среди дрожжей *S. cerevisiae* из промышленных ферментаций часто встречаются штаммы, обладающие полимерными генами *SUC* различной хромосомной локализации. Сравнительный Саузерн-анализ показал, что накопление генов *SUC* наиболее характерно для спиртовых штаммов. У изученных нами спиртовых штаммов наиболее часто встречались гены *SUC1*, *SUC3*, *SUC7* и *SUC9* (рис. 5, дорожки 20–25). Результаты Саузерн-гибридизации показали, что виды *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* имеют только по одной копии гена *SUC* и не накапливают полимерные гены, как это характерно для штаммов *S. cerevisiae* из промышленных популяций. По-видимому, субтеломерные повторы β-фруктозидазных генов *SUC* появились в геноме дрожжей *S. cerevisiae* под воздействием селекционного отбора в процессе их domestikации.

Нуклеотидный полиморфизм генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*. Ген *SUC2* состоит из 1596 т.п.н. и кодирует полипептид из 532 аминокислот. Нуклеотидные последовательности генов *SUC2* видов *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. bayanus* имеются в международных компьютерных базах данных (AABY01000004, AC101000133, AABZ01000015 и AACA01000015, соответственно). Известна также последовательность гена *SUC2* дрожжей *S. cariocanus* (Коршунова и др. 2005). Нуклеотидные последовательности теломерных генов *SUC1* и *SUC4* дрожжей *S. cerevisiae* также опубликованы (Hohmann & Gozalbo 1988).

Мы определили нуклеотидные последовательности шести субтеломерных генов (*SUC3*, *SUC5*, *SUC7*, *SUC8*, *SUC9* и *SUC10*) дрожжей *S. cerevisiae* и гена *SUCa* дрожжей *S. arboricola*. Использовали сконструированные ранее (Наумов и др. 2010) стандартные штаммы *S. cerevisiae*, каждый из которых обладает только одним теломерным геном *SUC* и имеет делецию гена *SUC2* (рис.5, дорожки 12–19). Сравнение нуклеотидных последовательностей шести генов *SUC* и имеющихся в базе данных GenBank последовательностей генов *SUC1* и *SUC4* показало их большое сходство. Кодирующие области генов *SUC3*, *SUC4*, *SUC5*, *SUC7*, *SUC8*, *SUC9* и *SUC10* сходны на 99.4–100%. Идентичные нуклеотидные последовательности имеют гены *SUC3* и *SUC5*. Наиболее дивергирован ген *SUC1*, сходство которого с последовательностями остальных семи субтеломерных генов *SUC* составляет не более 94.8%. Большое сходство (более 99%) имеют также промоторные области генов *SUC3*, *SUC4*, *SUC5* и *SUC7* (Hohmann & Gozalbo 1988).

В GenBank имеются нуклеотидные последовательности генов *SUC2* штаммов *S. cerevisiae*, выделенных из промышленных ферментаций и природных источников в различных регионах мира. Гены *SUC2* из 17 штаммов *S. cerevisiae* различного происхождения сходны на 98.9–100%. Филогенетическое древо (рис. 6) включает имеющиеся в GenBank последовательности генов *SUC* штаммов *S. paradoxus*, *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* – наиболее близкородственные виды рода *Saccharomyces* (Naumov et al. 2000; Kellis et al. 2003; Liti et al. 2013). Распределение последовательностей *SUC* между двумя кластерами соответствует видовой принадлежности штаммов по другим маркерам (в основном – по рибосомным генам).

В первом кластере, включающем гены *SUC* дрожжей *S. cerevisiae*, выделяются две группы. Одна из них представлена генами *SUC2*, а вторая – восемью субтеломерными генами. Нуклеотидные последовательности генов *SUC2* различных штаммов *S. cerevisiae* и субтеломерных генов *SUC* сходны на 92.3–95.6%. Наиболее сходен с генами *SUC2* субтеломерный ген *SUC1*: 95.4–95.6%. Во втором кластере объединены гены *SUCp* дрожжей *S. paradoxus*, нуклеотидные последовательности которых сходны на 97.6–100% (рис. 6). В этом кластере выделяются две подгруппы, соответствующие географическому происхождению штаммов. Сходство генов *SUCp* штаммов *S. paradoxus*, изолированных в Дальневосточной Азии и других регионах мира, составляет 97.6–97.8%.

Нуклеотидные последовательности генов *SUCa* штаммов *S. arboricola* CBS 10644 и TJ14M01, выделенных в континентальном Китае и на Тайване, идентичны и

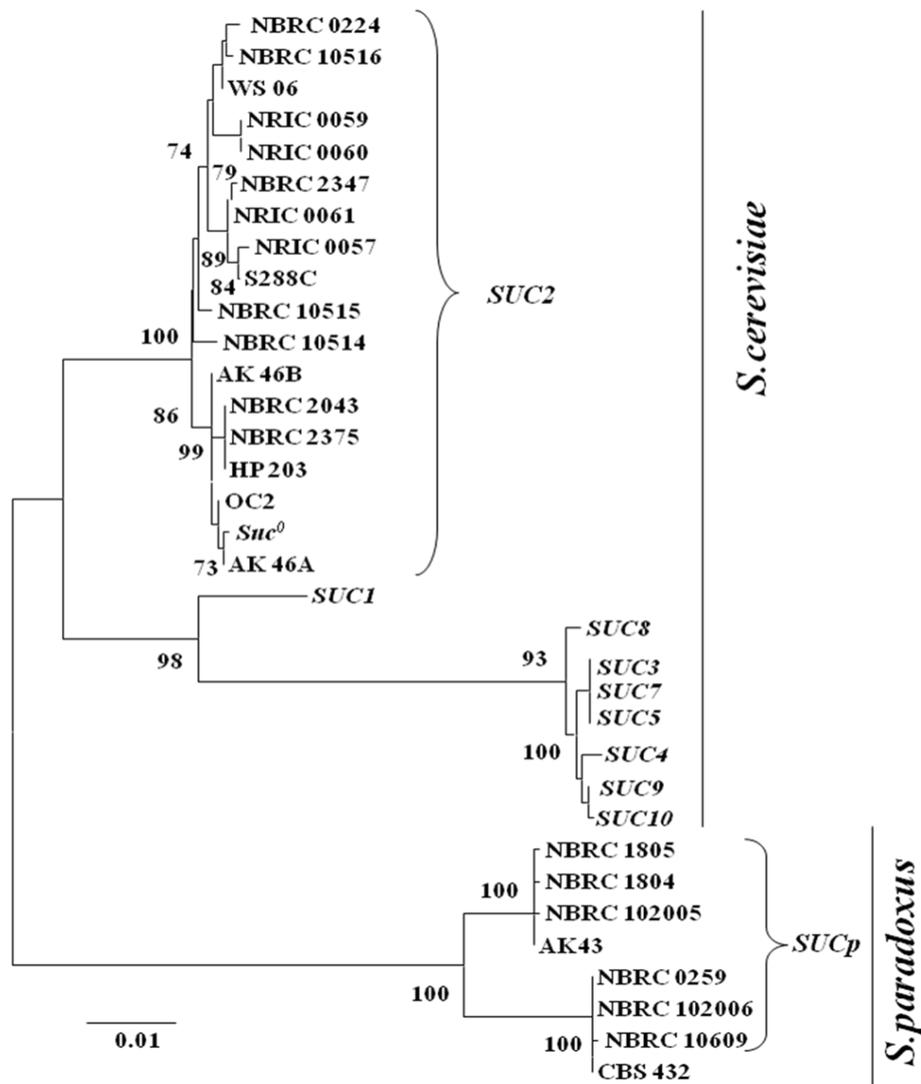


Рис. 6. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *SUC* дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 10 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. Дерево построено с использованием программного пакета MEGA5 (Tamura et al. 2011).

сходны с последовательностями генов *SUC* других видов *Saccharomyces* на 83.6–86.0%. Наименьший уровень сходства наблюдается при сравнении с субтеломерными генами *SUC* дрожжей *S. cerevisiae* (83.6–84.3%), а наибольший – с генами *SUCp* *S. paradoxus* (85.5–86.0%) и *SUCk* *S. kudriavzevii* (85.8%).

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов *SUC* во всех комбинациях выявило отсутствие делеций и вставок и показало, что транзиций больше, чем трансверсий. Наиболее часто встречаются транзиции типа С→Т, большинство из которых (80–89%) расположено в третьем положении кодона. Транзиции в третьем положении кодона, за исключением кодонов TGA→TGG и ATG→ATA, не вызывают изменения аминокислотной последовательности белка. Обнаруженный в генах *SUC* спектр нуклеотидных замен, по-видимому, обусловлен действием естественного отбора, направленного на консервацию аминокислотной последовательности β-фруктозидаз дрожжей *Saccharomyces*.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей β -фруктозидаз дрожжей *Saccharomyces*. По нуклеотидным последовательностям генов *SUCa*, *SUC3*, *SUC5*, *SUC7*, *SUC8*, *SUC9* и *SUC10* определены гипотетические аминокислотные последовательности соответствующих белков (514 а.о.), которые сравнивали с соответствующими последовательностями инвертаз дрожжей *S. bayanus* (SUCb), *S. cariocanus* (SUCc), *S. paradoxus* (SUCp), *S. cerevisiae* (SUC1, SUC2, SUC4), *S. kudriavzevii* (SUCk) и *S. mikatae* (SUCm). Все они имеют уровень сходства от 88.0 до 99.8%. Наиболее дивергированы белки SUCa и SUCb, которые сходны с остальными белками SUC на 88.00–91.6% и 89.2–92%, соответственно. По аминокислотным последовательностям построено филогенетическое древо (рис. 7), в качестве внешней группы использовали β -фруктозидазу (инулиназу) дрожжей *Kluveromyces marxianus*. Все изученные β -фруктозидазы дрожжей *Saccharomyces* образовали отдельный кластер относительно внешней группы. Внутри этого кластера выделяются три группы. В первую входят последовательности SUC2 различных штаммов *S. cerevisiae* (сходство – 98.8–100%). Вторую группу образуют белки SUC1, SUC3, SUC4, SUC5 и SUC7–SUC10 с уровнем сходства 95.2–100%, причем последние

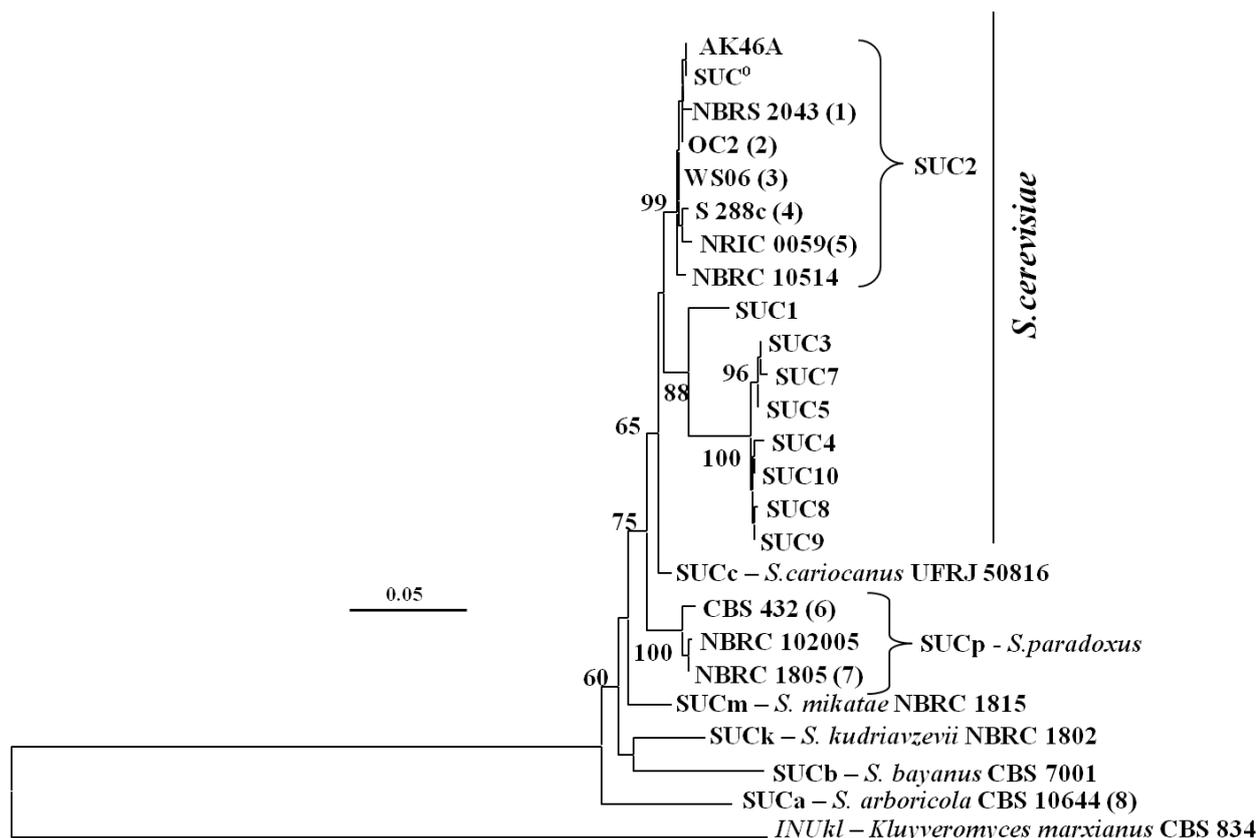


Рис. 7. Филогенетическое древо аминокислотных последовательностей β -фруктозидаз дрожжей рода *Saccharomyces*. Приводятся значения бутстрепа >60%. Шкала соответствует 50 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные аминокислотные последовательности: 1 – NBRC 2375, HP203; 2 – 46B; 3 – NBRC 0224, NRIC 0061, NBRC 2347, NBRC 10515, NBRC 10516; 4 – NRIC 0057; 5 – NRIC 0060; 6 – NBRC 0259, NBRC 10609, NBRC 102006; 7 – AK43, NBRC 1804; 8 – TJ14M01.

семь практически идентичны: 99.2–100%. К первым двум группам примыкает β -фруктозидаза SUCc дрожжей *S. cariocanus*. В третью группу входят белки SUCp *S. paradoxus*, которые практически идентичны: 99–100%. К этой группе примыкает β -фруктозидаза SUCm дрожжей *S. mikatae*. Отдельное положение на древе занимают белки SUC дрожжей *S. arboricola*, *S. bayanus* и *S. kudriavzevii*. Следует отметить, что указанные виды наиболее дивергированы в роде *Saccharomyces* также и по рибосомальным генам (Naumov et al. 2010). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о видоспецифичности генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*.

3. Молочные дрожжи-пробиотики рода *Kluveromyces*

С целью расширения научного и прикладного использования естественного генофонда молочных дрожжей *Kl. marxianus* и *Kl. lactis* мы провели молекулярно-генетическое изучение 56 штаммов *Kluveromyces* различного происхождения.

Молекулярная идентификация штаммов. Большинство штаммов были получены из коллекции ВКМ под следующими видовыми названиями: *Kluveromyces lactis*, *Kl. marxianus*, *Zygothrauxospora krassilnikovii*, *Zygothrauxospora marxiana*, *Fabospora fragilis*. Принимая во внимание современную классификацию дрожжей *Kluveromyces* (Lachance 2011), мы провели молекулярную реидентификацию 56 штаммов. Имеющие практически идентичные последовательности домена D1/D2 26S рДНК виды *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* достоверно различаются по последовательностям ITS1/ITS2 участка: 23 нуклеотидные замены. Мы сравнили рестрикционные карты нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-участков рДНК типовых культур *Kl. marxianus* CBS 712 и *Kl. lactis* ВКМ Y-868. Указанные виды можно четко дифференцировать ПДРФ-анализом с помощью эндонуклеазы *Hind*III (рис. 8). В 5.8S-ITS-участке дрожжей *Kl. marxianus* имеется *Hind*III-сайт рестрикции (a/agctt), в то время как у *Kl. lactis* он отсутствует за счет трансверсии Т–G в 548 позиции (рис. 8).

CBS 712	TACTCGTCTC-GGGTTAACTTGAAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGC 480
ВКМ Y-868T.TTC.....T.....
CBS 712	GTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGCACATCTACGTCTTAGGTTTTCGCCAATTCGTG 540
ВКМ Y-868
	↓ <i>Hind</i> III
CBS 712	GTAAGCTT-GGGTCA TAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTT 600
ВКМ Y-868GA.....AT.....T.....
CBS 712	GAGGCATACGGCTTTAACC AAAACTCTCAAAGT 633
ВКМ Y-868-.....-...T.....

Рис. 8. Нуклеотидные последовательности 5.8S-ITS-района рДНК типовых культур *Kluveromyces marxianus* CBS 712 и *Kl. lactis* ВКМ Y-868. Идентичные нуклеотидные последовательности обозначены точками. Нумерация последовательностей приводится по штамму CBS 712. Серым цветом выделен *Hind*III-сайт рестрикции.

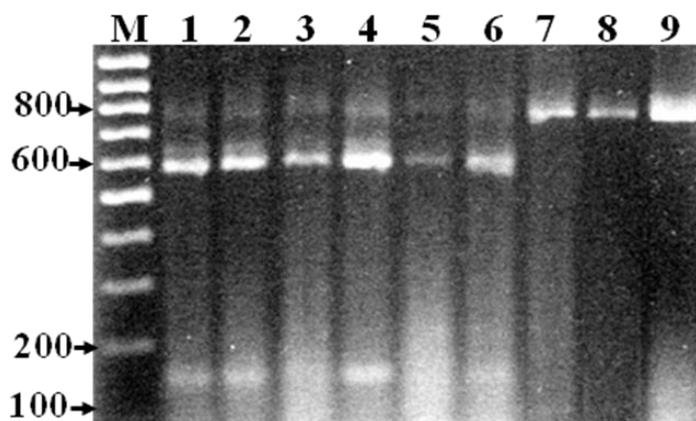
У 56 изученных штаммов *Kluveromyces* была проведена амплификация 5.8S-ITS-района рДНК. Сорок три штамма выделены из различных молочных продуктов, три – с гидролизного завода, два с испорченных винных ягод, один – из сахарной свеклы и семь из природных источников, включая сокотечения деревьев, почвы и др.

В качестве контролей использовали типовые культуры *Kl. lactis* и *Kl. marxianus*. Размер амплифицированных фрагментов был одинаковым у изучаемых и контрольных штаммов и составил около 720 п.н. Такой размер 5.8S-ITS-фрагментов характерен для дрожжей рода *Kluyveromyces* (Kurtzman 2003). По сходству рестрикционных профилей штаммы были разбиты на две четкие группы. ПДРФ профили некоторых штаммов представлены на рис. 9.

Большинство штаммов имели практически идентичные рестрикционные профили и не отличались от типовой культуры *Kl. marxianus* CBS 712: два *Hind*III-фрагмента размером примерно 570 и 150 п.н. (рис. 9, дорожки 1–6). Типовая культура *Kl. lactis* ВКМ Y-868 и 15 изученных штаммов, не имеющих *Hind*III-сайта рестрикции, составили вторую группу (рис. 9, дорожки 7–9). Согласно проведенному анализу, девять штаммов, хранящихся в коллекции ВКМ как *Zygofabospora marxiana* (ВКМ Y-832, ВКМ Y-833, ВКМ Y-2013) и *Fabospora fragilis* (ВКМ Y-126, ВКМ Y-431, ВКМ Y-1335, ВКМ Y-432, ВКМ Y-433, ВКПМ Y-4065), отнесены к виду *Kl. marxianus*. Из 40 штаммов, полученных как *Kl. lactis*, 29 реидентифицированы молекулярным анализом как *Kl. marxianus*. Из семи штаммов *Zygofabospora krassilnikowii* три идентифицированы как *Kl. marxianus* (ВКМ Y-835, ВКМ Y-836, ВКМ Y-837), а остальные (ВКМ Y-830, ВКМ Y-831, ВКМ Y-834, ВКМ Y-1890) отнесены к *Kl. lactis*. Следует отметить, что последние четыре штамма выделены из природных источников и не способны сбраживать лактозу.

Вид *K. lactis* имеет сложный состав и включает две разновидности: *K. lactis* var. *lactis* и *K. lactis* var. *drosophilorum* (Kurtzman 2003; Sidenberg & Lachance 1986; Lachance 1998, 2011). Рестрикционным анализом межгенного спейсера IGS2 рДНК можно дифференцировать молочные дрожжи *Kl. lactis* var. *lactis* и дикие дрожжи *K. lactis* var. *drosophilorum* (Naumova et al. 2004, Наумова и др. 2005). Размер амплифицированного IGS2-фрагмента был одинаковым у 15 штаммов, идентифицированных нами как *Kl. lactis*, и типовой культуры *Kl. lactis* ВКМ Y-868 и составил примерно 1200 п.н. Продукты ПЦР анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазой *Alu*I. Согласно *Alu*I-профилям штаммы ВКМ Y-762, ВКМ Y-869, ВКМ Y-870, ВКМ Y-896, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1334, ВКМ Y-1339, ВКМ Y-1343, ВКМ Y-1868, CBS 762 относятся к *Kl. lactis* var.

Рис. 9. ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов 5.8S-ITS-района рДНК штаммов *Kl. marxianus* и *Kl. lactis* с помощью эндонуклеазы *Hind*III. *Kl. marxianus*: 1 – CBS 712; 2 – ВКМ Y-453; 3 – ВКМ Y-470; 4 – ВКМ Y-833; 5 – ВКМ Y-1332; 6 – ВКМ Y-2013; *Kl. lactis*: 7 – ВКМ Y-868; 8 – ВКМ Y-1333; 9 – ВКМ Y-1890. М – маркер молекулярных весов (п.н.) 100 bp DNA Ladder.

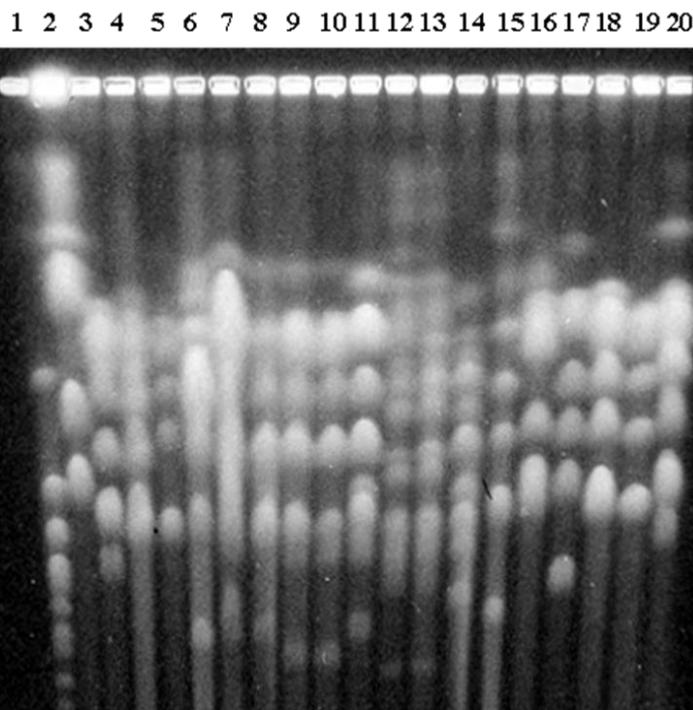


lactis. Не усваивающие лактозу штаммы ВКМ Y-830, ВКМ Y-831, ВКМ Y-834 и ВКМ Y-1890 относятся к европейской популяции «krassilnikovii» таксона *Kl. lactis* var. *drosophilorum*.

На основании ПДРФ-анализа некодирующих участков рДНК установлено, что большинство молочных штаммов с видовым названием *Kl. lactis*, в действительности, относятся к виду *Kl. marxianus*. Кроме того, гетерогенными оказались дрожжи под названием *Zygofabospora krassilnikovii*. Из семи штаммов только четыре отнесены к *Kl. lactis* var. *drosophilorum* (популяции «krassilnikovii»), а три к виду *Kl. marxianus*.

Молекулярные кариотипы и физиологические особенности дрожжей *Kl. marxianus*. Для кариотипического анализа было выбрано 29 штаммов *Kl. marxianus* различного происхождения. Молекулярное кариотипирование выявило значительный внутривидовой полиморфизм кариотипических профилей по числу и размерам индивидуальных хромосомных полос. Хромосомная ДНК различных штаммов разделилась на 5–12 электрофоретических полос размером от 580 до 2700 т.п.н. Кариотипы некоторых штаммов представлены на рис. 10. Наименьший диапазон размеров хромосомных полос (от 945 до 2200 т.п.н.) отмечен у пяти штаммов, выделенных из кисломолочных продуктов (ВКМ Y-453, ВКМ Y-454, ВКМ Y-464, ВКМ Y-1335, ВКМ Y-1336), а также у штаммов немолочного происхождения ВКМ Y-432 и ВКМ Y-433 (испорченные винные ягоды), ВКМ Y-2013 (сахарная свекла) и ВКМ Y-832 (почва) (рис. 10, дорожки 3–5, 18 и 19). Хромосомная ДНК указанных штаммов разделилась на 5–6 электрофоретических полос. Согласно интенсивности свечения окрашенных бромистым этидием электрофоретических полос, некоторые из них могут содержать более одной хромосомы. Молекулярные кариотипы остальных 17 молочных штаммов характеризуются 9–12 хромосомными полосами. Наибольшие отличия в кариотипах

Рис. 10. Пульс-электрофорез хромосомных ДНК дрожжей *Kl. marxianus*. Дорожки: 1 – *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – NRRL Y-1140; 3 – ВКМ Y-432; 4 – ВКМ Y-454; 5 – ВКМ Y-1335; 6 – ВКМ Y-126; 7 – ВКМ Y-459; 8 – ВКМ Y-1342; 9 – ВКМ Y-1337; 10 – ВКМ Y-1338; 11 – ВКМ Y-1341; 12 – ВКМ Y-473; 13 – ВКМ Y-474; 14 – ВКМ Y-2454; 15 – ВКМ Y-835; 16 – ВКМ Y-836; 17 – ВКМ Y-837; 18 – ВКМ Y-2013; 19 – ВКМ Y-832; 20 – ВПКМ Y-4065. Размеры хромосом (т.п.н.) приводятся согласно



Saccharomyces cerevisiae YNN 295 и *Wickerhamomyces canadensis* YB-4662-VIA.

этих штаммов отмечены в районе хромосом размером от 580 до 950 т.п.н. (рис. 10).

Интересно отметить, что штаммы *Kl. marxianus*, выделенные из одного и того же типа молочного продукта, как правило, имеют сходные кариотипы. Так, практически идентичные паттерны имели штаммы ВКМ Y-1337 и ВКМ Y-1338, ВКМ Y-473 и ВКМ Y-474, выделенные, соответственно, из простокваши и чала (рис. 10, дорожки 9, 10 и 12, 13). С другой стороны, каждый из трех, выделенных на гидролизных заводах штаммов (ВКМ Y-835, ВКМ Y-836, ВКМ Y-837), имеет уникальный кариотипический профиль (рис. 10, дорожки 15–17).

Согласно кариотипическому анализу, молочные дрожжи *Kl. marxianus* содержат дополнительные хромосомы или гомологичные хромосомы различных размеров. Известно, что полиморфизм размеров хромосомных ДНК характерен для культурных штаммов *S. cerevisiae* (Bakalinsky & Snow 1990, Наумова и др. 1993).

Ферментация лактозы у дрожжей *Kluyveromyces* контролируется тесно сцепленными структурными генами *LAC4* (β -галактозидаза) и *LAC12* (пермеаза лактозы). В качестве зондов при Саузерн-гибридизации хромосомных ДНК изучаемых штаммов *Kl. marxianus* использовали гены *LAC4* и *LAC12* штамма *Kl. lactis* NRRL Y-1140 (рис. 11 а, б, дорожка 2). По сходству гибридационных профилей 29 штаммов разделились на несколько групп. В первую группу, обозначенную нами как «А», попали десять штаммов, у которых обнаружена только одна гибридационная полоса размером около 1660 т.п.н. (рис. 11, дорожки 3–5, 18–20). Группа «В» включает штаммы ВКМ Y-126 и ВКМ Y-461, у которых зонды *LAC4* и *LAC12* гибридовались с двумя хромосомными полосами размером около 2200 и 2000 т.п.н. (рис. 11, дорожка 6). Пять штаммов (ВКМ Y-452, ВКМ Y-459, ВКМ Y-460, ВКМ Y-1332, ВКМ Y-1342) объединились в группу «С» с тремя гибридационными сигналами (рис. 11, дорожки 7 и 8). В группу «D» попали штаммы ВКМ Y-1337 и ВКМ Y-1338, имеющие два гибридационных сигнала, один из которых расположен в хромосоме размером 2200 т.п.н., а второй – в хромосоме размером 580 т.п.н. (рис. 11, дорожки 9 и 10). Штаммы ВКМ Y-431, ВКМ Y-462 и ВКМ Y-1341, объединенные в группу «Е», характеризуются двумя гибридационными сигналами, расположенными в хромосомах размером 2200 т.п.н. и 600 т.п.н. (рис. 11, дорожка 11). В группу «F» попали штаммы, выделенные из чала в Туркмении: ВКМ Y-471, ВКМ Y-473 и ВКМ Y-474. У этих штаммов обнаружены четыре гибридационных сигнала, локализованных в хромосомах размером около 580 т.п.н., 800 т.п.н., 945 т.п.н., 1600 т.п.н. (рис. 11, дорожки 12 и 13). Штаммы ВКМ Y-2454, ВКМ Y-835, ВКМ Y-836 и ВКМ Y-837 имели индивидуальные гибридационные профили, обозначенные, соответственно, как «G», «H», «I», «J» (рис. 11, дорожки 14–17). Несмотря на то, что все три последних штамма выделены на гидролизных заводах в России, их гибридационные профили сильно различаются (рис. 11, дорожки 15–17). У этих штаммов обнаружено по два гибридационных сигнала с зондом *LAC4*, но различной хромосомной локализации. С зондом *LAC12* у гидролизных штаммов обнаружено только по одной гибридационной полосе (рис. 11б, дорожки 15–17).

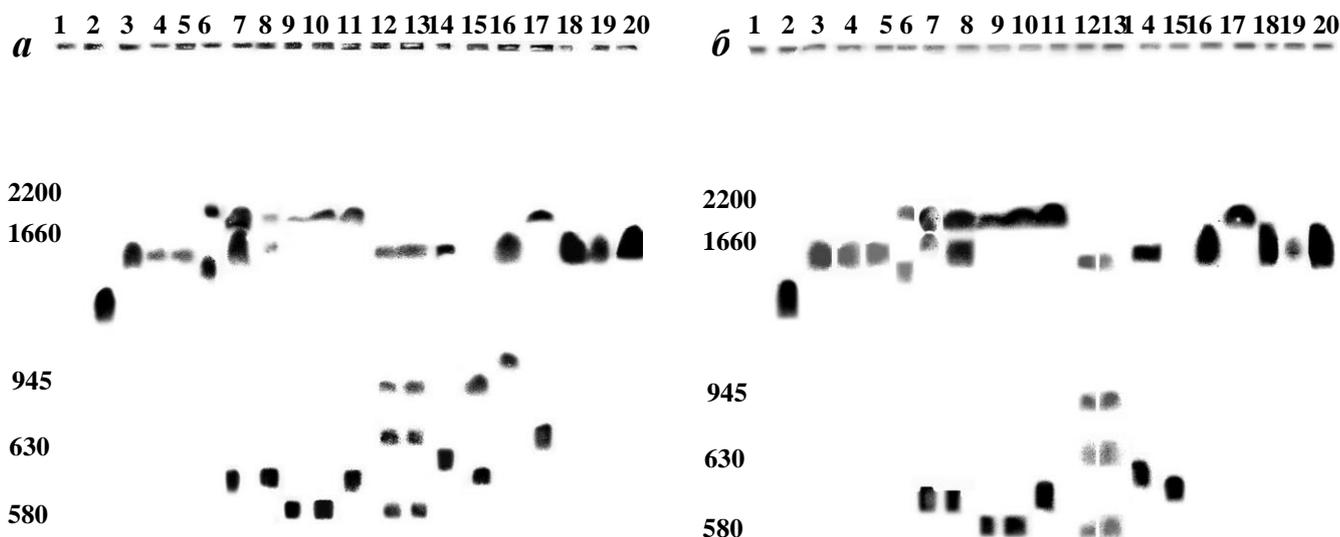


Рис. 11. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК штаммов *Kl. marxianus* с зондами *LAC4* (а) и *LAC12* (б). Дорожки: 1– *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – *Kl. lactis* NRRL Y-1140; 3 - ВКМ Y-432 (А); 4 – ВКМ Y-454 (А); 5 – ВКМ Y-1335 (А); 6 – ВКМ Y-126 (В); 7 – ВКМ Y-459 (С); 8 – ВКМ Y-1342 (С); 9 – ВКМ Y-1337 (D); 10 – ВКМ Y-1338 (D); 11 – ВКМ Y-1341 (Е); 12 – ВКМ Y-473 (F); 13 – ВКМ Y-474 (F); 14 – ВКМ Y-2454 (G); 15 – ВКМ Y-835 (H); 16 – ВКМ Y-836 (I); 17 – ВКМ Y-837 (J); 18 – ВКМ Y-2013 (А); 19 – ВКМ Y-832 (А); 20 – ВПКМ Y-4065 (А). Размеры хромосом (т.п.н.) приводятся согласно *S. cerevisiae* YNN 295 и *W. canadensis* YВ-4662-VIA. В скобках приводится гибридизационная группа.

Таким образом, Саузерн-гибридизация с зондами *LAC4* и *LAC12* выявила значительный полиморфизм гибридизационных профилей у *Kl. marxianus*. У разных штаммов обнаружено от одного до четырех гибридизационных сигналов.

Изученные штаммы были проверены по способности ферментировать лактозу при 37⁰С. Скорость брожения лактозы составила от 1 до 8 суток у разных штаммов. Все штаммы молочного происхождения забродили через сутки, но с различной интенсивностью. Активное брожение отмечено у штаммов: ВКМ Y-126, ВКМ Y-453, ВКМ Y-454, ВКМ Y-459, ВКМ Y-460, ВКМ Y-464, ВКМ Y-473, ВКМ Y-474, ВКМ Y-1335, ВКМ Y-1337 и ВКМ Y-1342. Штаммы ВКМ Y-835 и ВКМ Y-2013, выделенные, соответственно, на гидролизном заводе и из сахарной свеклы, сбраживали лактозу через двое суток. Остальные два гидролизных штамма (ВКМ Y-836 и ВКМ Y-837) забродили только через 8 суток. Выделенный из почвы штамм ВКМ Y-832 не сбраживал лактозу. На основании ферментационных тестов и Саузерн-анализа мы выбрали 12 штаммов (ВКМ Y-126, ВКМ Y-453, ВКМ Y-459, ВКМ Y-460, ВКМ Y-464, ВКМ Y-473, ВКМ Y-474, ВКМ Y-1335, ВКМ Y-1337, ВКМ Y-1338, ВКМ Y-1341, ВКМ Y-1342), у которых была определена интенсивность ферментации 2% лактозы при 37⁰ С (рис. 12). Изученные штаммы активно сбраживали лактозу в течение первых двух суток, а затем процесс останавливался. На первые сутки наиболее активное брожение отмечено у штаммов ВКМ Y-126, ВКМ Y-459, ВКМ Y-460, ВКМ Y-1341 и ВКМ Y-1342. Через 48 часов интенсивно забродили еще три штамма: ВКМ

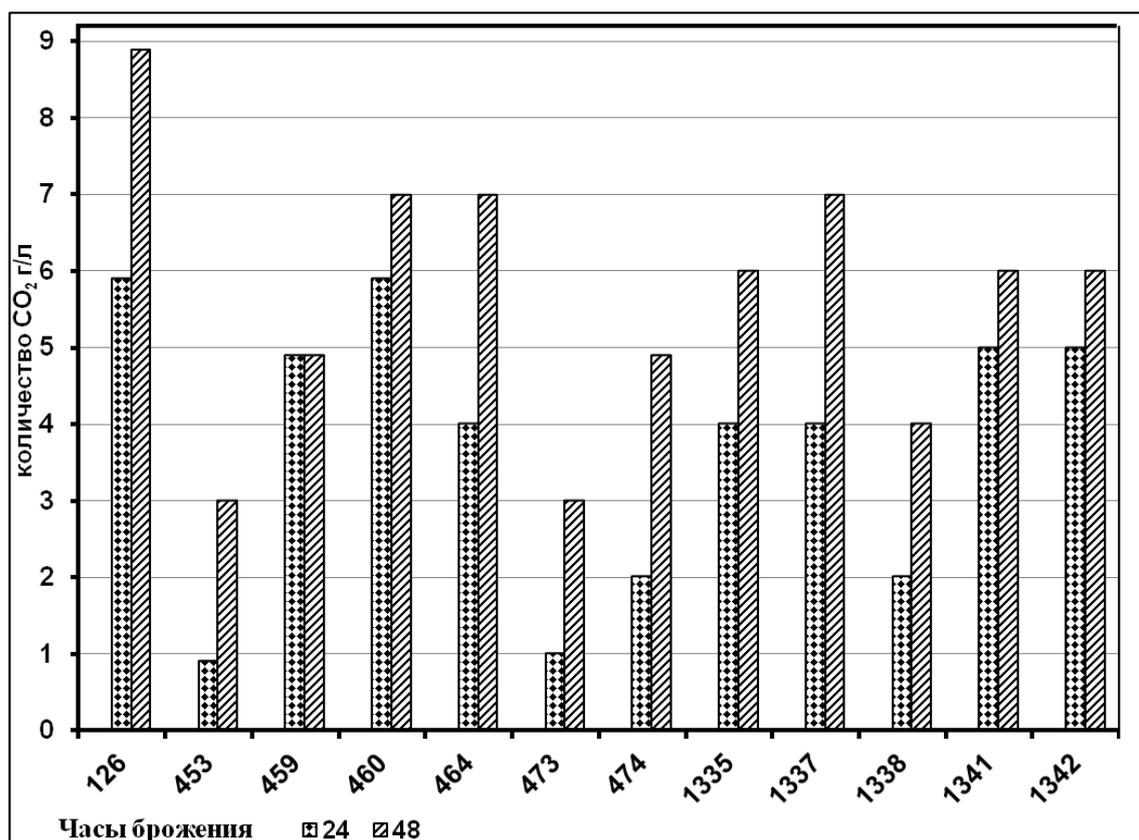


Рис. 12. Интенсивность сбраживания 2%-ной лактозы при 37°C молочными штаммами *Kl. marxianus*.

У-464, ВКМ У-1335 и ВКМ У-1337. Выделяется штамм ВКМ У-459, который выбродил лактозу уже на первые сутки. Этот штамм обладает тремя полимерными генами *LAC*. Наибольшей ферментационной активностью обладает штамм ВКМ У-126, имеющий два гена *LAC*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью ПЦР-ПДРФ-анализа 5.8S-ITS фрагментов рДНК, молекулярного кариотипирования и Саузерн-гибридизации изучены геномы 36 спиртовых штаммов, в основном отечественного происхождения. Молекулярный анализ показал, что все штаммы относятся к виду *S. cerevisiae*. Кариотипический анализ выявил значительный полиморфизм хромосомных ДНК спиртовых штаммов *S. cerevisiae*. Кариотипы большинства штаммов характеризуются также наличием дополнительных хромосомных полос.

Многие производственные штаммы *S. cerevisiae* являются анеуплоидными (Bakalinsky & Snow 1990). Анеуплоидия считается одним из механизмов адаптации дрожжей в промышленных ферментациях за счет увеличения числа копий необходимых генов (Adams et al. 1992). С этим хорошо согласуется наличие дополнительных хромосом, несущих гены *MAL* и *SUC*, у многих изученных нами спиртовых штаммов. Накопление полимерных генов ферментации сахаров может иметь адаптивное значение и приводить к увеличению ферментационной активности штаммов. Штаммы со многими генами *MAL* и *SUC* часто встречаются среди

спиртовых, пекарских и пивных дрожжей (Ness & Aigle 1995; Denayrolles et al. 1997; Codón et al. 1997; Oda & Tomomura 1996). Накопление в одном штамме полимерных генов ферментации сахаров, имеющих кумулятивный эффект, приводит к интенсификации процесса ферментации (Hohmann 1987). Действительно, большинство изученных нами штаммов, которые сбразивали мальтозу на первые сутки, обладают несколькими генами *MAL*. Способность активно ферментировать сахарозу является важной характеристикой спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*, поскольку сахароза является основным компонентом мелассы: до 54–63%. Большинство изученных нами спиртовых штаммов *S. cerevisiae* обладали, помимо гена *SUC2*, дополнительными субтеломерными генами *SUC*.

Концевые участки хромосом дрожжей *S. cerevisiae* имеют сложное строение и состоят из ряда повторяющихся последовательностей (Zakian 1996; Louis et al. 1992, 1994). Теломеры включают переменные повторы $(TG_{1-3})_n$, непосредственно за которыми расположены семейства Y' - и X -элементов. Между ними имеются короткие субтеломерные повторы STR (Subtelomeric Repeat), представленные в большинстве хромосомных концов (Louis et al. 1994). Полимерные гены *SUC* и фланкирующие их последовательности локализованы в соединительном районе $X-Y'$ (рис. 13).

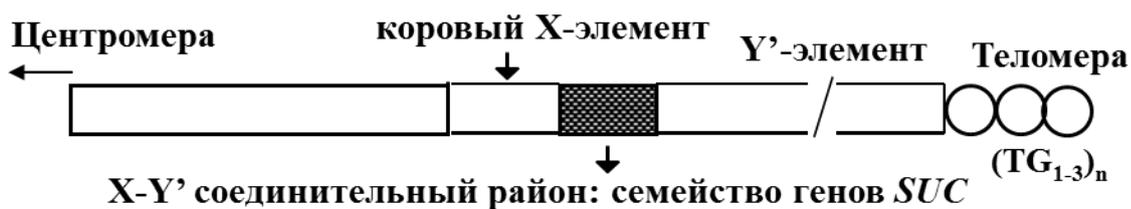


Рис. 13. Схема строения концевой участка хромосомы дрожжей *S. cerevisiae*.

Считается, что предковым является ген *SUC2*, имеющийся у всех штаммов дрожжей *Saccharomyces* независимо от их происхождения, а остальные гены *SUC* произошли от него в результате рекомбинации гомологичных субтеломерных последовательностей различных хромосом (Carlson & Botstein 1983; Carlson et al. 1985). Повторяющиеся субтеломерные последовательности являются горячими точками внутри- и межхромосомных рекомбинационных событий. У природных штаммов *S. cerevisiae* обнаружено три различные транслокации с участием хромосомы IX, которые приводят к перемещению гена *SUC2* в другие хромосомы (Наумов и Наумова 2011). Первый теломерный локус мог образоваться за счет инсерции фрагмента ДНК, содержащего ген *SUC2*, в субтеломерный район одной из хромосом; этот фрагмент мог в результате последующей рекомбинации гомологичных участков распространиться в субтеломерные районы различных хромосом. Инсерция, по-видимому, произошла на границе X - и Y' -теломерных последовательностей. На это указывает тот факт, что 5'-фланкирующие районы теломерных генов *SUC* содержат X -последовательности, а их 3'-фланкирующие районы заканчиваются Y' -элементами (Carlson et al. 1985). Такая инсерция, по-видимому, произошла в субтеломерном районе хромосомы VII, в которой локализован ген *SUC1*. Проведенный нами сравнительный анализ нуклеотидных и

аминокислотных последовательностей кодирующих районов генов *SUC* показал, что из восьми теломерных генов (*SUC1*, *SUC3–SUC5*, *SUC7*, *SUC8*, *SUC9* и *SUC10*) наибольшее сходство с геном *SUC2* имеет ген *SUC1*. Этот ген также наиболее сходен с геном *SUC2* в промоторной области (Hohmann & Gozalbo 1988). Следует отметить, что ген *SUC1* часто встречался у изученных нами спиртовых штаммов, а по литературным данным также имеется у пивных и пекарских дрожжей *S. cerevisiae* (Ness & Aigle 1995; Denayrolles et al. 1997; Codón et al. 1997). Теломерные гены *SUC3*, *SUC4*, *SUC5*, *SUC7*, *SUC8*, *SUC9* и *SUC10*, по-видимому, появились в ходе эволюции позже. Эти гены практически идентичны по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям (>99%), что указывает на их относительно недавнее расхождение. Помимо различной хромосомной локализации, полимерные гены *SUC* отличаются и по уровню экспрессии, которая наиболее интенсивна у генов *SUC1* и *SUC4*, несколько ниже у *SUC2* и *SUC3* и наименее интенсивна у гена *SUC7* (Gozalbo et al. 1994; Hohmann & Zimmermann 1986).

Штаммы *S. cerevisiae*, обладающие полимерными генами *SUC*, могут иметь селективные преимущества за счет увеличения количества инвертазы и продуктов гидролиза сахарозы и, как следствие, интенсификации процессов ферментации и роста дрожжей. Действительно, у большинства изученных нами спиртовых штаммов, которые интенсивно сбраживали сахарозу, выявлено несколько генов *SUC*. Ранее показано, что увеличение числа копий генов *SUC* в эксперименте за счет интегративной трансформации клеток приводит к суперпродукции инвертазы (Hohmann 1987). Полимерные гены *MAL*, *SUC* и *MEL* обнаружены только у дрожжей *S. cerevisiae* и отсутствуют у остальных шести видов рода *Saccharomyces* (Naumov et al. 1994b; Коршунова и др. 2005; Наумова и др. 2011). Накопление полимерных генов *SUC* только у промышленных штаммов *S. cerevisiae* может указывать на то, что субтеломерные повторы генов ферментации сахарозы появились в геноме дрожжей-сахаромицетов под воздействием селекционного отбора в процессе их доместикации.

Одним из способов удешевления и интенсификации промышленного получения этилового спирта является высокотемпературная алкогольная ферментация. Актуальным является отбор и селекция термоустойчивых штаммов *S. cerevisiae*, обладающих хорошей ферментационной активностью. На основании молекулярно-генетического скрининга дрожжей *S. cerevisiae*, выделенных в странах с жарким климатом, были отобраны штаммы, способные расти при повышенных температурах (42°C и 43°C) и обладающие хорошей ферментационной активностью. При гибридизации штаммов независимого происхождения можно рассчитывать на эффект межштаммового гетерозиса. Действительно, изученные нами межштаммовые гибриды между спиртовой расой XII₇ и отобранными природными термоустойчивыми штаммами превосходили по ферментационной активности родительские культуры и были способны расти при повышенных температурах. Межштаммовая гибридизация — эффективный метод создания спиртовых штаммов *S. cerevisiae*.

Дрожжи *Kluuyveromyces marxianus* и *Kl. lactis*, благодаря наличию фермента β-галактозидазы, способны гидролизовать и утилизировать лактозу. Штаммы этих

дрожжей часто выделяются из различных молочных продуктов и молочной сыворотки. Известно, что присутствие в пищевых молочных продуктах лактозы может способствовать развитию вредной микрофлоры, приводящей к кишечным расстройствам и газообразованию у взрослых людей из-за отсутствия активной β -галактозидазы. Молочные дрожжи *Kl. marxianus* и *Kl. lactis* фенотипически очень схожи и не могут быть дифференцированы только на основании стандартных физиологических тестов. В ходе выполнения настоящего исследования был разработан эффективный метод молекулярной дифференциации молочных дрожжей *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* на основе ПДРФ-анализа некодирующих участков рДНК: ITS1-5.8S-ITS2 последовательности и межгенного спейсера IGS2.

Использованные молекулярные подходы позволили провести кардинальную реидентификацию отечественных молочных дрожжей *Kluveromyces*, хранящихся во Всероссийской коллекции микроорганизмов. Молекулярный анализ показал, что большинство молочных штаммов с видовым названием *Kl. lactis* в действительности относятся к виду *Kl. marxianus*. Кроме того, гетерогенными оказались дрожжи под названием *Zygofabospora krassilnikovii*. Из семи штаммов только четыре отнесены к *Kl. lactis* var. *drosophilorum* (популяции «krassilnikovii»), а три к виду *Kl. marxianus*. Согласно проведенной нами реидентификации, большинство штаммов *Kluveromyces* из коллекции ВКМ, активно сбраживающих лактозу (Голубев и Голубев 2004), относятся к виду *Kl. marxianus*. Ошибки в идентификации дрожжей *Kl. marxianus* и *Kl. lactis* были допущены и в других коллекциях, например, в Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Нидерланды). В свое время van der Walt (van der Walt 1970) идентифицировал ряд штаммов как *Kl. vanudenii* (syn. *Kl. lactis* var. *drosophilorum*) (Naumova et al. 2004)). Правильно была идентифицирована только типовая культура CBS 4372. Согласно молекулярному кариотипированию (Naumov & Naumova 2002; Belloch et al. 2002) два других штамма CBS 5669 и CBS 5670 относятся к *Kl. marxianus*, а не как считалось к *Kl. lactis* (CBS. List of cultures. 1996).

Таким образом, ПЦР-ПДРФ-анализ 5.8S-ITS и IGS2 участков рДНК позволяет проводить быструю и достоверную идентификацию молочных дрожжей *Kl. marxianus* и *Kl. lactis*, а также дифференцировать разновидности последнего вида. При этом процедура молекулярной идентификации штаммов занимает не более 2–4 дней: выращивание дрожжей на твердых агаризованных средах (1-2 дня), ПЦР на дрожжевых клетках и последующий ПДРФ-анализ (1–2 дня).

Достоверность молекулярной дифференциации дрожжей *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* была подтверждена молекулярным кариотипированием. Все штаммы, отнесенные по результатам ПЦР-ПДРФ-анализа к *Kl. lactis*, имели похожие кариотипические паттерны с шестью хромосомными полосами размером от 1500 до 3000 т.п.н. В отличие от *Kl. lactis*, у штаммов *Kl. marxianus* различного происхождения обнаружен значительный полиморфизм размеров и количества хромосомных полос. Большинство штаммов, выделенных из природных источников, имели паттерны с 8 хромосомными полосами. Недавно проведенное секвенирование геномов трех природных штаммов показало, что гаплоидное число хромосом у

дрожжей *Kl. marxianus* равно восьми (Jeong et al. 2012; Suzuki et al. 2014; Inokuma et al. 2015). В отличие от природных изолятов, молочные штаммы *Kl. marxianus* имели кариотипические профили с 9–12 хромосомными полосами. Подобно спиртовым штаммам *S. cerevisiae*, молочные дрожжи *Kl. marxianus*, по-видимому, являются анеуплоидными. С помощью Саузерн-гибридизации обнаружено накопление полимерных генов *LAC* ферментации лактозы у изученных нами молочных штаммов. Молочные штаммы *Kl. marxianus* интенсивно сбраживали лактозу при 37° С уже на первые сутки, тогда как штаммы другого происхождения не сбраживали лактозу вовсе или с большой задержкой. По результатам ферментационных тестов были отобраны 12 штаммов *Kl. marxianus*. Принимая во внимание, что дрожжи *Kl. marxianus* присутствуют во многих молочных продуктах, они могут рассматриваться как безопасные для здоровья человека микроорганизмы (Generally Recognized as Safe, GRAS). Обладающий наибольшей ферментационной активностью штамм ВКМ У-126 представляет интерес в качестве пробиотического микроорганизма для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных разработок.

ВЫВОДЫ

1. Изучены молекулярно-генетические и физиологические особенности спиртовых штаммов *S. cerevisiae* отечественного происхождения. Показано накопление у них полимерных генов *SUC* и *MAL*, контролирующих ферментацию сахарозы и мальтозы. Отобраны штаммы, обладающие высокой ферментационной активностью.
2. Показано, что межштаммовая гибридизация является эффективным методом селекции спиртовых штаммов *S. cerevisiae*, сочетающих термоустойчивость и высокую ферментационную активность.
3. На большом материале штаммов *Saccharomyces* различного происхождения изучен молекулярный полиморфизм β-фруктозидазных генов *SUC*, кодирующих ферментацию сахарозы. Установлено, что виды *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* имеют только по одной копии гена *SUC* и не накапливают полимерные гены, как это характерно для штаммов *S. cerevisiae* из промышленных популяций.
4. Разработан экспресс-метод молекулярной идентификации фенотипически сходных молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* и *Kl. marxianus* на основе рестрикционного анализа ITS1-5.8S-ITS2–последовательности с использованием эндонуклеазы *HindIII*. С помощью разработанного метода проведена кардинальная реидентификация штаммов дрожжей *Kluyveromyces* из Всероссийской Коллекции Микроорганизмов.
5. Выявлен значительный полиморфизм кариотипических паттернов дрожжей *Kl. marxianus* различного происхождения. Обнаружено накопление генов *LAC* ферментации лактозы у молочных штаммов *Kl. marxianus*.
6. По результатам ферментационных тестов отобраны 12 молочных штаммов *Kl. marxianus*, способных при 37°С активно сбраживать лактозу.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Наумова Е.С., Наумов Г.И., Никитина Т.Н., **Садыкова А.Ж.**, Кондратьева В.И. Молекулярно-генетическая и физиологическая дифференциация дрожжей *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus*: анализ штаммов из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). **Микробиология**. 2012. Т.81. № 2. С.216–223.
2. Наумова Е.С., **Садыкова А.Ж.**, Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. **Микробиология**. 2013. Т.82. № 2. С.176–186.
3. Наумова Е.С., **Садыкова А.Ж.**, Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм β -фруктозидазных генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*. **Молекулярная биология**. 2014. Т.48. № 4. С.658–668.
4. **Садыкова А.Ж.**, Наумова Е.С., Наумов Г.И. Генетические особенности молочных дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, возможных пробиотиков. **Успехи медицинской микологии**. 2016. Т.15. С.21–23.
5. **Садыкова А.Ж.**, Наумова Е.С., Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярный полиморфизм спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. **Сборник VII Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии»**. 24-26 октября 2011, Москва, С.141-143.
6. **Sadykova A.Zh.**, Naumova E.S., Martynenko N.N, Naumov G.I. Molecular-genetic differentiation of *Kluyveromyces lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. Abstracts of the International Symposium “Non-Conventional Yeasts in the Postgenomic Era” (NCY-2011) Lviv, Ukraine, on September 11–14, 2011.
7. **Sadykova A. Zh.**, Naumova E.S., Martynenko N.N., Naumov G.I. Intra- and interspecies evolution of beta-fructosidase *SUC* genes in the yeast *Saccharomyces*. Abstracts of 38th FEBS Congress, St. Petersburg, Russia, 6–11 July 2013. FEBS Journal, 280 (S1), SW01.S1–39, P. 14.
8. Naumov G.I., **Sadykova A. Zh.**, Naumova E.S. Chromosomal polymorphism of *LAC* genes for lactose fermentation in dairy probiotic yeasts *Kluyveromyces*. Abstracts of 38th FEBS Congress, St. Petersburg, Russia, 6–11 July 2013. FEBS Journal, 280 (S1), SW01. S1–40, P. 14–15.