

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

на правах рукописи

Садыкова Айгуль Жомартовна

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ
ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES* И
*KLUYVEROMYCES***

Специальность 03.02.07 – Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

научный руководитель:
доктор биологических наук,
Е.С. Наумова
научный консультант:
доктор биологических наук,
Н.Н. Мартыненко

Москва 2016

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Актуальность работы	5
Цель и задачи исследования	7
Научная новизна и практическая значимость работы	7
Положения, выносимые на защиту	9
Обзор литературы	10
Глава 1. Спиртовые дрожжи <i>Saccharomyces</i>	10
1.1. ДНК-ДНК реассоциация	11
1.2. Гибридологический анализ	11
1.3. Секвенирование и ПДРФ-анализ рибосомальных последовательностей	13
1.4. Молекулярное кариотипирование	15
1.5. Современная классификация дрожжей <i>Saccharomyces</i>	16
1.5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.5.2. <i>Saccharomyces bayanus</i>	18
1.5.3. <i>Saccharomyces paradoxus</i>	20
1.5.4. Дикие дрожжи <i>S. arboricola</i> , <i>S. kudriavzevii</i> и <i>S. mikatae</i>	20
1.5.5. Межвидовые гибриды <i>Saccharomyces</i>	21
1.6. Селекция спиртовых дрожжей <i>Saccharomyces</i>	22
Глава 2. Полимерные гены ферментации сахаров	25
2.1. β -Фруктозидазные гены <i>SUC</i> ферментации сахарозы	25
2.2. Полимерные гены <i>MAL</i> , контролирующие ферментацию мальтозы	29
2.3. α -Галатозидазные гены <i>MEL</i> ферментации мелибиозы	32
Глава 3. Молочные дрожжи рода <i>Kluyveromyces</i>	35
3.1. Роль пробиотических микроорганизмов	35
3.2. Современная таксономия дрожжей рода <i>Kluyveromyces</i>	36
3.3. <i>Kluyveromyces lactis</i>	39
3.4. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	41
3.5. Полимерные β -галактозидазные гены <i>LAC</i> , контролирующие ферментацию лактозы	43
Экспериментальная часть	46
Глава 4. Материалы и методы исследования	46

4.1. Объекты исследования и методы культивирования дрожжей	46
4.2. Физиологическая характеристика штаммов	58
4.2.1. Способность дрожжей сбраживать сахара	58
4.2.2. Скорость сбраживания сахаров	58
4.2.3. Тест на устойчивость штаммов к повышенной температуре	59
4.3. ПЦР-анализ	59
4.3.1. Амплификация рибосомальных последовательностей	59
4.3.2. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)	60
4.3.3. Изоляция ДНК	60
4.3.4. Амплификация генов ферментации сахаров	61
4.4. Секвенирование β -фруктозидазных генов <i>SUC</i> и филогенетический анализ	61
4.5. Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация	62
4.5.1. Выделение интактной хромосомной ДНК	62
4.5.2. Пульс-электрофорез хромосомной ДНК	62
4.5.3. Саузерн-гибридизация хромосомных ДНК	63
Глава 5. Молекулярно–генетические особенности и селекция спиртовых штаммов <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
5.1 Молекулярная идентификация спиртовых штаммов	65
5.1.1. ПДРФ–анализ 5.8S - ITS фрагментов рДНК	66
5.1.2. Молекулярное кариотипирование	68
5.2. Саузерн-гибридизация	70
5.3. Физиологические особенности изученных штаммов	74
5.3.1. Ферментация мальтозы, сахарозы и мелибиозы	74
5.3.2. Термоустойчивость	74
5.3.3. Ферментационная активность	74
5.4. Селекция спиртовых штаммов дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	75
5.4.1. Скрининг термоустойчивых штаммов	75
5.4.2. Межштаммовые гибриды <i>S. cerevisiae</i>	78
5.5. Обсуждение	80
Глава 6. Молекулярный полиморфизм β-фруктозидазных генов <i>SUC</i> дрожжей <i>Saccharomyces</i>	84

6.1. Хромосомный полиморфизм генов <i>SUC</i>	84
6.2. Нуклеотидный полиморфизм генов <i>SUC</i> дрожжей <i>S. cerevisiae</i> и <i>S. paradoxus</i>	88
6.3. Нуклеотидная последовательность гена <i>SUCa</i> дрожжей <i>S. arboricola</i>	90
6.4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей β -фруктозидаз дрожжей <i>Saccharomyces</i>	91
6.5. Обсуждение	93
Глава 7. Молочные дрожжи-пробиотики рода <i>Kluyveromyces</i>	94
7.1. Молекулярная идентификация штаммов	94
7.2. Физиологические особенности изученных штаммов	98
7.3. Молекулярный полиморфизм <i>Kl. marxianus</i>	99
7.3.1. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК	99
7.3.2. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК штаммов <i>Kl. marxianus</i> с зондами <i>LAC4</i> и <i>LAC12</i>	102
7.3.3. Ферментационная активность штаммов <i>Kl. marxianus</i>	104
7.4. Молекулярные кариотипы и физиологические особенности дрожжей <i>Kl. lactis</i>	105
7.5. Обсуждение	107
Заключение	109
Выводы	115
Список литературы	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Культурные микроорганизмы, прежде всего дрожжи-сахаромицеты, используются человечеством на протяжении многих тысячелетий, наряду с культурными растениями и домашними животными. Практическое применение дрожжей *Saccharomyces* в хлебопечении, виноделии, пивоварении, производстве спирта и белково-витаминных препаратов, возможность их культивирования в лабораторных условиях, а также доступность для биохимических, молекулярных и генетических исследований сделали их универсальным модельным объектом для изучения других эукариот, в том числе человека. Не случайно, дрожжи *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, 1994b, 1996c,d). 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, который включает сахарификацию измельченного биологического сырья рекомбинантными грибными ферментами при оптимальной для работы гидролитических ферментов 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* являются вторым по значимости объектом фундаментальных и прикладных исследований. Эти дрожжи имеют большое биотехнологическое значение и используются для производства различных гетерологичных белков медицинского и пищевого значения, а также в качестве продуцентов биоэтанола из лигноцеллюлозных отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности (van Ooyen et al. 2006; Fonseca et al. 2008; Suzuki et al. 2014). Дрожжи *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* – постоянные компоненты многих молочнокислых 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 взрослых людей 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 потенциальных 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 *Saccharomyces 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 *SUC*. 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 *SUC* дрожжей рода *Saccharomyces*. Полученные результаты указывают на видоспецифичность генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*.

Разработан экспресс-метод молекулярной идентификации фенотипически схожих молочных дрожжей *Kluveromyces lactis* и *Kl. marxianus* на основе рестрикционного анализа ITS1-5.8S-ITS2-последовательности с использованием эндонуклеазы *Hind*III. С помощью разработанного метода проведена кардинальная реидентификация штаммов дрожжей *Kluveromyces*, хранящихся во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (ВКМ, Пущино, Московская область). 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. Впервые 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 дальнейших 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 доместикиации. Филогенетический анализ выявил видоспецифичность β -фруктозидазных генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*.
3. Полиморфизм молекулярных кариотипов зависит от происхождения штаммов дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Для молочных штаммов характерно накопление генов *LAC* ферментации лактозы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. СПИРТОВЫЕ ДРОЖЖИ *SACCHAROMYCES*

Большое практическое значение сахаромикетов способствовало бурному развитию их систематики. Впервые, присутствие в пиве дрожжей установил в 1680 г. А. Ван Левенгук, наблюдая их в микроскоп. Луи Пастер позднее доказал, что брожение является результатом метаболизма дрожжей. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* впервые были описаны в 1838 году ботаником J. Meyen на штаммах, выделенных из пивного производства. Hansen (1883, 1888, 1908) дал более полное описание дрожжей-сахаромикетов, обозначил пивные дрожжи верхового брожения как *S. cerevisiae*, а низового – *S. carlsbergensis* и ввел технику чистых культур. Позднее в роде *Saccharomyces* было описано более 100 новых видов на основании морфологических и физиологических особенностей, включая различия в способности сбраживать определенные сахара. В ранг новых видов возводили штаммы из различных ферментационных процессов, а дрожжам, загрязняющим производство, присваивали отдельные видовые названия. В первом определителе дрожжей род *Saccharomyces* включал 44 вида (Guilliermond 1914). В первом издании определителя, составленного голландской коллекцией CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) род *Saccharomyces* включает 23 вида, а часть из ранее описанных видов была переведена в синонимы (Lodder & Kregen van Rij 1952). van der Walt (1970a) разделил род *Saccharomyces* на две группы: *sensu stricto* и *sensu lato*. В первую группу вошли *S. cerevisiae* и другие виды-диплонты, характеризующиеся активной ферментацией сахаров. Вторая группа включила виды не близкородственные *S. cerevisiae*.

Стандартные таксономические тесты, основанные на морфолого-физиологических особенностях, имеют существенные ограничения для видовой дифференциации дрожжей из-за мутационной, комплементарной и комбинативной изменчивости биохимических признаков (Sheda & Yarrow 1966, 1968; Наумов и Юркевич 1970). Это привело к пересмотру систематики дрожжей *Saccharomyces* и переводу многих таксономических видов в синонимы *S. cerevisiae*. В определителе дрожжей 1984 года группа *Saccharomyces sensu stricto* представлена уже только одним видом *S. cerevisiae* с более чем 80 синонимами (Yarrow 1984).

Большие изменения в таксономии дрожжей рода *Saccharomyces* начались с применением молекулярных и генетических методов.

1.1 . ДНК-ДНК реассоциация

Метод ДНК-ДНК реассоциации основан на реассоциации одноцепочечных молекул ДНК двух различных штаммов и образовании гибридных двухцепочечных молекул. На основе сравнения видов дрожжей родов *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* и *Pichia* (Price et al. 1978) было показано, что штаммы, имеющие 80-100% сходства ДНК, являются конспецифичными, т.е. относятся к одному виду. Низкая степень (0-30%) гомологии ДНК свидетельствует о принадлежности дрожжей к разным видам. Определенные трудности для интерпретации результатов вызывает промежуточный уровень гомологии ДНК: 50-70%.

Bicknell и Douglas (1970) с помощью метода ДНК-ДНК реассоциации показали гетерогенность дрожжей группы *Saccharomyces sensu stricto*. Ряд изученных штаммов имели 40-70% гомологии с типовой культурой *S. cerevisiae*. Типовые культуры таксономических видов *S. bayanus* CBS 380 и *S. uvarum* CBS 395 имеют 30% сходства ДНК с *S. cerevisiae* (Rosini et al. 1982). При этом указанные два штамма имеют 95% ДНК-ДНК реассоциации. Исследование дрожжей *Saccharomyces sensu stricto* с помощью метода ДНК-ДНК реассоциации позволило выявить синонимы дрожжей *S. cerevisiae*, показать существование вида *S. bayanus* (синоним *S. uvarum*) и дифференцировать гибридный таксон *S. pastorianus* (Vaughan Martini & Kurtzman 1975; Vaughan Martini & Martini 1987a). Было установлено, что типовые культуры *S. carlsbergensis* CBS 1513 (дрожжи низового брожения пива) и *S. pastorianus* CBS 1538 (дрожжи, загрязняющие пивное производство) имеют 93% ДНК-ДНК гомологии и являются синонимами. Так как вид *S. pastorianus* был описан раньше, чем *S. carlsbergensis*, то именно этот видовой эпитет является приоритетным согласно международному кодексу Ботанической Номенклатуры.

1.2. Гибридологический анализ

Winge & Lausten (1939) впервые предложили использовать способность дрожжей к скрещиванию и оценку выживаемости аскоспор гибридов в качестве критерия дифференциации видов внутри рода *Saccharomyces*. Следует отметить,

что многие штаммы сахаромицетов, особенно промышленные, характеризуются низкой выживаемостью аскоспор из-за их анеуплоидности, присутствием рецессивных аллелей, делеций, транслокаций и т.п. Поэтому использование в качестве контроля выживаемости аскоспор исходных природных или промышленных штаммов может приводить к ошибкам в определении видовой принадлежности исследуемых дрожжей. Показано, что многие музейные, природные и, в особенности, промышленные штаммы *Saccharomyces* образуют нежизнеспособные продукты мейоза–аскоспоры (Johnston 1965; Наумов 1969; Anderson & Martini 1975; Spencer & Spencer 1977). Было предложено использовать в скрещиваниях не исходные штаммы, а специально полученные от них инбредные линии, имеющие высокую выживаемость аскоспор и маркированные ауксотрофными или природными маркерами (Наумов и др. 1983). При анализе полученных гибридов, помимо выживаемости аскоспор, необходимо учитывать также рекомбинацию контрольных маркеров (Наумов и Никоненко 1987; Наумов 1997). Фертильность полученных гибридов и регулярное мейотическое расщепление контрольных ауксотрофных маркеров свидетельствуют о принадлежности штаммов к одному биологическому виду, тогда как гибриды различных видов стерильны (Наумов 1969). Использование гибридологического анализа позволило доказать существование биологического вида *S. cerevisiae* и отнести к нему ряд таксономических видов: *S. aceti*, *S. capensis*, *S. gadiensis*, *S. hienipiensis*, *S. lindneri*, *S. mangini*, *S. norbensis*, *S. oleaceus*, *S. oleaginosus*, *S. oviformis*, *S. oxidans* и *S. hispanica* (Наумов 1979b; Наумов и др. 1983). Гибридологическим анализом многочисленных таксонов-синонимов *S. cerevisiae* также установлены биологические виды *S. bayanus* и *S. paradoxus* (Наумов 1979b, 1986; Naumov 1987). Существование последнего таксона было подтверждено ДНК-ДНК реассоциацией (Vaughan Martini 1989). В определителе дрожжей Barnett et al. (1990) род *Saccharomyces* насчитывал 10 видов: *S. cerevisiae* с более, чем 130 синонимами, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. castellii*, *S. dairensis*, *S. exiguus*, *S. kluyveri*, *S. servazzii* и *S. uniformis*. Гибридологическим анализом были выявлены три генетически изолированные популяции дрожжей *Saccharomyces*: две в Японии и одна в Бразилии (Naumov et al. 1985 a, b). Штаммы из этих популяций образовывали стерильные гибриды между собой и с видовыми тестерами

S. cerevisiae, *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Позднее, с использованием сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов рРНК и молекулярного кариотипирования, на материале указанных популяций, были описаны три новых вида рода *Saccharomyces*: *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. cariocanus* (Naumov et al. 2000a).

1.3. Секвенирование и ПДРФ-анализ рибосомальных последовательностей

Использование филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей генов рРНК привело к изменению видового состава многих родов дрожжей, включая *Saccharomyces*. На рис. 1. представлена схема строения рибосомального кластера дрожжей *S. cerevisiae*. Кодрующие области генов 18S, 5.8S и 26S рРНК разделены внутренними транскрибируемыми спейсерами ITS1 и ITS2. Ген 5S рРНК окружен очень вариабельными межгенными спейсерами IGS1 и IGS2. Ген 5S рРНК был первым рибосомальным геном, использованным в таксономии дрожжей. Однако из-за большой консервативности этого гена, более информативными являются гены 18S и 26S рРНК.

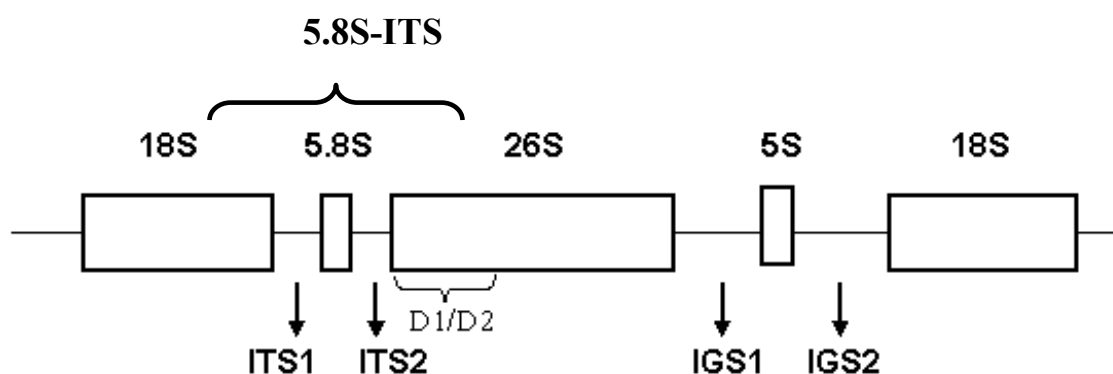


Рис.1. Строение кластера рибосомальной ДНК у дрожжей *S. cerevisiae*. Некодирующие участки: ITS–внутренний транскрибируемый спейсер, IGS–межгенный спейсер. Кодрующие области: гены 18S, 5.8S, 26S и 5S рРНК.

Дрожжи *Saccharomyces sensu stricto* имеют практически идентичные последовательности гена 18S рРНК (Naumov et al. 2000b). Идентичные последовательности имеют пары видов *S. cerevisiae*/*S. paradoxus*, *S. bayanus*/*S. pastorianus* и *S. kudriavzevii*/*S. mikatae*. Ген 18S рРНК у вида *S. cariocanus* отличается одной заменой от *S. cerevisiae*/*S. paradoxus*, двумя заменами от *S. kudriavzevii*/*S. mikatae* и тремя заменами от *S. bayanus*/*S. pastorianus*. Дрожжи

Saccharomyces sensu stricto и *sensu lato* четко разделяются по последовательностям гена 18S рРНК (Ando et al. 1996; James et al. 1997; Oda et al. 1997, 1999; Mikata et al. 2001).

Ген 26S рРНК очень гетерогенен и содержит как переменные, так и более консервативные участки. Было показано, что домен D1/D2 26S рДНК (рис. 1) длиной 600 п.н. обладает достаточной изменчивостью для дифференциации близкородственных видов различных родов аскомицетовых дрожжей, включая *Saccharomyces* (Petersen & Kurtzman 1991). На основании экспериментальных данных была принята шкала, согласно которой различия по 6 и более нуклеотидам в домене D1/D2 указывают на принадлежность штаммов к разным видам. Штаммы, имеющие идентичные или отличающиеся 1–3 нуклеотидами, как правило, относятся к одному виду.

Для дифференциации близкородственных видов дополнительно используют секвенирование более переменного 5.8S-ITS фрагмента, включающего внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2, разделенные геном 5.8S рРНК (рис. 1). Длина 5.8S-ITS-участков постоянна у штаммов одного и того же вида (Valente et al. 1996), но их последовательность может варьировать (James et al. 1996). Секвенирование спейсеров ITS1 и ITS2 у видов родов *Zygosaccharomyces* и *Torulaspota* показало, что они обладают большей изменчивостью по сравнению с геном 18S рРНК (James et al. 1996). На основании анализа ITS участков авторы смогли дифференцировать близкородственные виды рода *Zygosaccharomyces*, неразличимые по последовательностям гена 18S рРНК.

Помимо секвенирования для идентификации и дифференциации дрожжей используется ПДРФ-анализ (Полиморфизм Длин Рестрикционных Фрагментов) ПЦР-амплифицированных 5.8-ITS фрагментов. Полученные амплифицированные участки обрабатывают соответствующими рестриктазами, при этом происходит расщепление ДНК в специфических точках – сайтах рестрикции. Образовавшиеся в ходе рестрикции ДНК-фрагменты разделяют при помощи гель-электрофореза. Размер спейсеров и их нуклеотидная последовательность коррелируют с видовой принадлежностью штаммов. В результате наблюдается видоспецифичный рестрикционный профиль при минимальном внутривидовом полиморфизме (Chen 1992; Chen et al. 1992). С использованием различных эндонуклеаз была составлена

база данных рестрикционных 5.8-ITS фрагментов видов родов *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces* и *Saccharomyces* (Esteve-Zarzoso et al. 1999). Длина 5.8-ITS фрагмента дрожжей *Saccharomyces sensu stricto* составляет 850 п.н. (Valente et al. 1996; Naumov et al. 2000a), но его последовательность может варьировать у разных видов (James et al. 1997; Oda et al. 1997; Montroscher et al. 1998; Fernandez-Espinar et al. 2000; Naumov et al. 2000a). У дрожжей *Saccharomyces sensu lato* размер 5.8-ITS фрагмента варьирует от 700 до 875 п.н. (Valente et al. 1996; Esteve-Zarzoso et al. 1999). С помощью эндонуклеаз *HpaII* и *HaeIII* можно дифференцировать виды *Saccharomyces sensu stricto* (Серпова и др. 2011).

В таксономии дрожжей также применяют ПДРФ-анализ других вариабельных участков рибосомальной ДНК – межгенных спейсеров IGS1 и IGS2 (рис. 1). С помощью рестрикционного анализа IGS районов были дифференцированы разновидности патогенных дрожжей *Cryptococcus neoformans* (Vilgalys & Hester 1990), а также некоторые виды рода *Candida* (Magge et al. 1987; Williams et al. 1995). Molina et al. (1993) предложил использовать этот метод для разграничения близкородственных видов *Saccharomyces sensu stricto*.

1.4. Молекулярное кариотипирование

Пульс-электрофорез, или молекулярное кариотипирование, представляет собой электрофоретическое разделение интактных хромосомных ДНК в агарозном геле. В зависимости от числа и размеров хромосом получается специфический электрофоретический профиль. С помощью кариотипических стандартов, имеющих известные размеры и порядок хромосом, можно оценивать размеры геномов у изучаемых штаммов. Метод молекулярного кариотипирования был впервые опробован на лабораторных линиях дрожжей *S. cerevisiae* (Carle & Olson 1984, 1985). С помощью молекулярного кариотипирования и последующей Саузерн-гибридизации с зондами картированных генов у лабораторных штаммов *S. cerevisiae* было определено соответствие всех 16 электрофоретических полос конкретным хромосомам, ранее идентифицированных рекомбинантным анализом (Mortimer et al. 1992). Кариотипический анализ показал, что все биологические виды *Saccharomyces sensu stricto* имеют одинаковое гаплоидное число хромосом ($n=16$) и одинаковые предельные размеры хромосомных полос: от 245 до 2200 т.п.н. (Naumov et al. 1992, 2000a, 2000b, 2010). При этом индивидуальные размеры

хромосом могут варьировать у разных видов. С помощью молекулярных зондов *S. cerevisiae* было проведено сравнение молекулярных кариотипов биологических видов *Saccharomyces sensu stricto* (Fisher et al. 2000; Naumov et al. 2000a). Было установлено, что виды *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* имеют одинаковый порядок и размеры 16 гомеологичных хромосом, т.е. их кариотипы коллинеарны. У *S. mikatae* выявлена одна реципрокная транслокация между хромосомами VI и VII. Три реципрокные транслокации обнаружили у *S. bayanus*: хромосомы XV/VIII, IV/II и X/VI. Наибольшее количество реципрокных транслокаций имеется у дрожжей *S. cariocanus* – четыре, которые затрагивают восемь хромосом: IX/XV, II/XVI, XI/IV и XII/XIV. За счет этих транслокаций дрожжи *S. mikatae*, *S. bayanus* и *S. cariocanus* имеют видоспецифичные молекулярные кариотипы. Выделенные из природы штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii* имеют сходные кариотипические профили (Naumov et al. 1992, 2013). В то же время для культурных штаммов *S. cerevisiae* характерен значительный полиморфизм молекулярных кариотипов (Наумова и др. 1993а; Naumov et al. 1992).

1.5. Современная классификация дрожжей *Saccharomyces*

По результатам секвенирования домена D1/D2 26S рДНК более 600 видов аскомицетовых дрожжей были разделены на 10 клад (Kurzman & Robnett 1998). В кладу «*Saccharomyces*» попали, помимо *Saccharomyces*, дрожжи *Arxiozyma*, *Eremothecium*, *Hanseniaspora*, *Kluveromyces*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, а также несколько видов рода *Candida*, ферментирующие пищевые продукты и напитки.

С помощью мультигенного филогенетического анализа последовательностей рДНК (районы 18S, 26S и ITS), однокопийных ядерных (EF-1 α , актин-1, РНК полимеразы II) и митохондриальных (COX II, малая субъединица рДНК) генов была проведена таксономическая ревизия клады «*Saccharomyces*» (Kurzman & Robnett 2003). В результате филогенетического анализа 75 видов клады «*Saccharomyces*» разделились на 14 статистически достоверных кластеров, на основании которых были сформированы 14 родов (Kurzman 2003). Девять кластеров соответствовали ранее известным родам: *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Tetrapisispora*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Kluveromyces*,

Eremothecium, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, однако с измененным видовым составом. На основе пяти кластеров были созданы новые роды *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumoviozyma*, *Vanderwaltozyma* и *Zygotorulasporea*.

В роде *Saccharomyces* sensu Kurtzman остались только виды *Saccharomyces* sensu stricto: *S. cerevisiae* (типовой вид рода), *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и гибридный таксон *S. pastorianus*. Новый состав рода напоминает первоначальное представление о сахаромицетах как о дрожжах, осуществляющих спиртовое брожение.

С помощью филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена 18S и домена D1/D2 26S рРНК, транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, а также молекулярного кариотипирования, был описан новый вид *S. arboricola* на материале трех штаммов *Saccharomyces*, изолированных с коры дуба в Китае (Wang & Bai 2008). Гибридологическим анализом было подтверждено существование нового биологического вида *S. arboricola* (Наумов 2009; Naumov et al 2010).

В последнем определителе дрожжей род *Saccharomyces* представлен семью биологическими видами (*S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus*) и гибридным таксоном *S. pastorianus* (Vaughan-Martini & Martini 2011).

1.5.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Использованные в прошлом таксономические построения сахаромицетов возводили в ранг видов штаммы различных производств, тогда как дикие дрожжи-сорняки имели свои видовые названия (Наумов 1989а). В современной классификации вид *S. cerevisiae* объединяет как культурные, так и дикие штаммы. Большинство известных штаммов *S. cerevisiae* изолировано из различных бродильных процессов. Культурные штаммы *S. cerevisiae* очень полиморфны по ферментационным спектрам. До сих пор прикладные микробиологи используют старые таксономические названия, отражающие физиолого-биохимические особенности дрожжей. Принимая во внимание, что штаммы различных производств и их дикие родственники имеют существенные различия, Наумов (1989а) предложил систему групп культиваров для дифференциации генофонда

культурных дрожжей *Saccharomyces*. В результате культурные штаммы *S. cerevisiae* были разделены на 6 групп.

Первая группа «Cerevisiae» включила пивные, хлебопекарские и спиртовые штаммы, ферментирующие сахарозу, мальтозу и галактозу. У штаммов этой группы показано накопление полимерных генов *MAL* (Наумов 1985). Вторая группа «Ellipsoideus» – дрожжи первичного виноделия. Ферментационные спектры сходны с представителями первой группы. Третья группа «Cheresanus» объединяет дрожжи вторичного виноделия, образующие на поверхности вина хересную пленку за счет окисления этилового спирта. Хересные штаммы не сбраживают мальтозу и галактозу, а также чувствительны к LiCl и CuSO₄ (Наумов и др. 1994). Для этих дрожжей характерно наличие делеции в 24 пары нуклеотидов, которая отсутствует у дрожжей первичного виноделия (Fernandez–Espinar 2000, 2004; Montrocher et al. 1998; Наумова и др. 2005а).

Четвертая группа «Oviformis» включает винные штаммы, не сбраживающие галактозу и устойчивые к повышенным концентрациям этилового спирта и сульфитов. Эти дрожжи накапливаются в конце выбраживания виноградного сусла. Имеют фенотип Mal⁺, Suc⁺, Gal⁻, Mel⁻, Sta⁻. Показано, что в процессе шампанского технологического процесса происходит вытеснение Gal⁺ штаммов не сбраживающими галактозу штаммами Oviformis (Наумов и др. 1989а).

Пятая группа «Diastaticus» включает штаммы фенотипа Sta⁺, способные сбраживать растворимый крахмал. Эти дрожжи также сбраживают галактозу мальтозу и сахарозу.

Шестая группа «Logos» характеризуется способностью ферментировать мелибиозу. У этих дрожжей отмечено накопление генов *MEL* (Naumov et al. 1996а).

1.5.2. *Saccharomyces bayanus*

Этот вид представлен двумя разновидностями *Saccharomyces bayanus* var. *bayanus* и *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* (Наумов 2000а; Naumova et al. 2005; Vaughan-Martini & Martini 2011).

К первой разновидности относятся типовые культуры *S. bayanus* CBS 380, а так же таксономических видов *S. globosus*, *S. heterogenicus*, *S. intermedius* var.

valdensis и *S. inusitatus*. Большинство дрожжей *S. bayanus* var. *bayanus* представлены штаммами, загрязняющими пивное производство.

Специфической экологической нишей дрожжей *S. bayanus* var. *ivarum* является виноделие и виноградарство (Naumov 1987). В Европе дрожжи ассоциированы с производством сладких и игристых вин, а также сидра (Naumov et al. 2000b, 2001a). Редкие природные изоляты этого вида были обнаружены в Испании, Словакии, Венгрии, на Дальнем Востоке России и в США (Naumov 1996; Naumov et al. 1996b; Наумов и др. 2003). Штаммы *S. bayanus* var. *bayanus* и *S. bayanus* var. *ivarum* имеют высокий уровень ДНК-ДНК реассоциации (86-100%) (Vaughan-Martini & Kurtzman 1985). В то же время, указанные разновидности частично генетически изолированы и отличаются по ряду молекулярных маркеров: ПДРФ-профилям межгенного спейсера IGS2 и молекулярным кариотипам (Наумов 2000a; Naumov et al. 2000c; Naumova et al. 2005; Nguen & Goillarden 1997). Показано, что штаммы *S. bayanus* var. *ivarum* различного экологического и географического происхождения можно дифференцировать по микросателлитным маркерам (Masneuf-Pomarede et al. 2007; Naumova et al. 2011). Несмотря на молекулярные различия, штаммы *S. bayanus* var. *ivarum* различного происхождения образуют фертильные гибриды с выживаемостью аскоспор 91-100% (Naumov et al. 2000b., Naumov et al. 2001a).

Многие штаммы, выделенные из промышленных ферментаций, являются анеуплоидными (Bakalinski & Show 1990). Типовая культура *S. bayanus* CBS 380, выделенная из пивного производства, так же является анеуплоидной и содержит три дополнительные хромосомы (Kaneko & Banno 1991; Naumova et al. 2005). У этого штамма обнаружены субтеломерные последовательности *S. cerevisiae* (Naumov et al. 1992; Nguyen et al. 2000a). На этом основании Nguyen & Goillardin (2005) предложили закрыть вид *S. bayanus* и восстановить вид *S. ivarum* с типовой культурой CBS 7001 (МСУС 623), у которой проведено секвенирование всего генома (Kellis et al. 2003). Принимая во внимание молекулярные и генетические данные, в последнем определителе дрожжей принят вид *S. bayanus* с типовой культурой CBS 380 и разделенный на две разновидности: var. *bayanus* и var. *ivarum* (Vaughan-Martini & Martini 2011).

1.5.3. *Saccharomyces paradoxus*

Дрожжи *S. paradoxus*, как правило, не связаны с ферментационными процессами и выделяются из различных природных источников: сокотечения широколиственных деревьев, почва, насекомые и др.

Дрожжи *S. paradoxus* — ближайšie родственники *S. cerevisiae*, имеющие 50% ДНК-ДНК реассоциации (Vaughan-Martini 1989). В отличие от космополитных дрожжей *S. cerevisiae* и *S. bayanus*, вид *S. paradoxus* включает, по крайней мере, четыре географические популяции: европейскую, дальневосточную, северо-американскую и гавайскую (Наумов 1999; Naumov et al. 1997, 1998; Sniegowski et al. 2002; Boynton & Greig 2014). Штаммы указанных популяций частично генетически изолированы и отличаются по ряду молекулярных маркеров (Naumov et al. 1997; Liti et al. 2006, 2009).

По ряду молекулярных маркеров (ITS – последовательности, ядерные гены *SDT4*, *HDF1*, *HDF2*, *NEJ1*, *EST2*, *TLC1*) штаммы северо-американской популяции *S. paradoxus* не отличаются от дрожжей *S. cariocanus* (Liti et al. 2005, 2006). В то же время, штаммы *S. cariocanus* характеризуются уникальным молекулярным кариотипом и репродуктивно изолированы (Naumov et al. 2000a). Известно всего два штамма *S. cariocanus*, изолированных в Бразилии.

1.5.4. Дикие дрожжи *S. arboricola*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*

Дрожжи *S. arboricola* были описаны на материале трех штаммов, изолированных с коры дуба в Китае (Wang & Bai 2008). Недавно штамм *S. arboricola* был идентифицирован на Тайване (Naumov et al. 2013).

Дрожжи *S. kudriavzevii* и *S. mikatae* были также описаны на единичных эндемических изолятах из Японии (Naumov et al. 2000a). В настоящее время известно около 15 штаммов *S. mikatae*, все изолированы в Японии из различных природных источников (Liti et al. 2005). До недавнего времени было известно только четыре штамма *S. kudriavzevii*, все изолированные в Японии (Naumov et al. 2000a; Liti et al. 2005). Samraio и Gonçalves (2008) обнаружили штаммы этого вида на коре дуба в Португалии. Недавно штаммы *S. kudriavzevii* были изолированы на Тайване (Naumov et al. 2013). Несмотря на то, что изоляты разного географического происхождения отличаются по молекулярным маркерам, они образуют фертильные гибриды с высокой выживаемостью аскоспор (Наумов 2009).

1.5.5. Межвидовые гибриды *Saccharomyces*

Дрожжи *Saccharomyces* могут встречаться в симпатрических популяциях в природных и промышленных условиях и формировать межвидовые гибриды. Гибридное происхождение имеют пивные дрожжи низового брожения: *S. cerevisiae* x *S. bayanus* (Vaughan-Martini & Kurtzman 1985; Naumova et al. 2005; Dunn & Shenloch 2008). Формирование межвидовых гибридов *Saccharomyces* не ограничивается условиями пивоварения. Гибриды *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *uvarum* обнаружены в виноделии Франции, Испании и Италии (Naumov et al. 2000c, 2002; Gonzales et al. 2006; Stribny et al. 2015). Большинство обнаруженных гибридных штаммов являются диплоидными. Среди коммерческих винных штаммов обнаружены также аллотетраплоидные штаммы *Saccharomyces* (Naumov et al. 2000c).

За последние 15 лет среди коммерческих винных штаммов в Швейцарии, Австрии и Германии обнаружен новый тип межвидовых гибридов *Saccharomyces*: диплоидные гибриды *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* и триплоидные гибриды *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus* var. *uvarum* (Gonzalez et al. 2006; Lopandic et al. 2007; Bradbury et al. 2006; Naumova et al. 2005).

Межвидовые гибриды *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* выявлены также среди пекарских и пивных дрожжей верхового брожения в Германии, Бельгии и Англии (Gonzales et al. 2008; Nguyen & Gaillardin 1997). Особенность межвидовых гибридов *Saccharomyces* – сочетание в одном организме генов с низкой гомологией, что может приводить к эффекту гетерозиса при межвидовых скрещиваниях. Показано, что по физиолого-биохимическим свойствам гибриды *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* лучше адаптированы к низким температурам и продуцируют большее количество ароматических веществ по сравнению с родительскими штаммами, и тем самым, улучшают органолептические характеристики вина (Gonzalez 2007, Stribny et al. 2015). Показано, что экспериментальная межвидовая гибридизация *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *uvarum* приводит к созданию высокопродуктивных штаммов, обладающих высокой ферментационной способностью и улучшающих композицию игристых вин (Наумова и др. 1993б).

1.6. Селекция спиртовых дрожжей *Saccharomyces*

Спиртовое производство является важнейшей бюджетообразующей отраслью пищевой промышленности России. Используемые в производстве спирта штаммы-сахаромицеты должны обладать следующими важными характеристиками: высокая бродильная способность (интенсивность, с какой дрожжи разлагают сахар с образованием спирта в единицу времени), целенаправленный синтез этанола с пониженным образованием побочных метаболитов, устойчивость к продуктам своего обмена и к продуктам обмена посторонних микроорганизмов, а также устойчивость к повышенным температурам брожения (Маринченко и др. 1981; Устинников и Яровенко 1973; Рухлядева 1974).

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 дрожжами-сахаромицетами при оптимальной для их роста мезофильной температуре (28–30°C) (Vanat et al. 1998; McMillan et al. 1999; Wingren et al. 2003) (рис. 2). Объединение процессов сахарификации и ферментации позволяет избежать подогревания/охлаждения промышленных емкостей и способствует более эффективной работе гидролитических ферментов, которые в этом случае не подвергаются ингибированию конечными продуктами гидролиза – моно- и дисахаридами, конвертируемыми непосредственно в спирт дрожжами *S. cerevisiae*.

Дрожжи живут и размножаются в широких температурных пределах, но для нормальной их жизнедеятельности необходима температура 29-30°C. При очень высокой или очень низкой температуре жизнедеятельность дрожжей ослабляется или прекращается. Как правило, максимальная температура для развития дрожжей 38°C, минимальная —5°C; при температуре 50°C дрожжи погибают. На спиртовых заводах, перерабатывающих крахмалсодержащее сырье, для сбраживания сусле традиционно применяют дрожжи *S. cerevisiae* расы XII. Бродильная активность дрожжей расы XII при повышенной температуре 36–40°C резко снижается, что приводит к значительным потерям углеводов и уменьшению выхода спирта. Кроме того, в сусле из крахмалсодержащего сырья содержится до 30% декстринов,

которые полностью не осахариваются при дображивании и не сбраживаются дрожжами расы XII. Для устранения этих недостатков и более полного использования сельскохозяйственного сырья были подобраны новые расы дрожжей, которые частично сбраживают декстрины и выдерживают повышенные температуры при сбраживании суслу. Повышение бродильной активности дрожжей может быть достигнуто различными способами: мутагенезом, гибридизацией и др. Для получения штаммов дрожжей с требуемыми свойствами наиболее перспективным оказался метод гибридизации, так как при скрещивании двух родительских видов можно подобрать расы с заранее известными свойствами (Маринченко и др. 1981; Устинников и Яровенко 1973; Рухлядева 1974; Наумов и др. 2006).

Для селекции спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*, сочетающих термоустойчивость с высокой ферментационной активностью, перспективным является использование межштаммовой гибридизации. При гибридизации штаммов различного происхождения можно рассчитывать на эффект межштаммового гетерозиса (Наумов и др. 2006). На основе гибридизации и последующего мейоза можно объединить в одном производственном штамме различные признаки, присущие родительским штаммам. В результате гибридизации и рекомбинации в производственные штаммы были перенесены гены ферментации сахарозы, мальтозы, мелибиозы и растворимого крахмала, флокуляции, образования терпенов (мускатный аромат) и других признаков (Stewart & Russel 1986; Tsai Chen-ko et al. 1978; Lahtchev et al. 1991; Javelot et al. 1991). Принимая во внимание, что для биотехнологического получения спирта используется крахмалосодержащее сырье и отходы сахарного производства, для спиртовых дрожжей важным признаком является способность сбраживать мальтозу, сахарозу и мелибиозу.

Полимерные гены ферментации сахарозы, мальтозы и мелибиозы у дрожжей *Saccharomyces* рассмотрены в Главе 2.

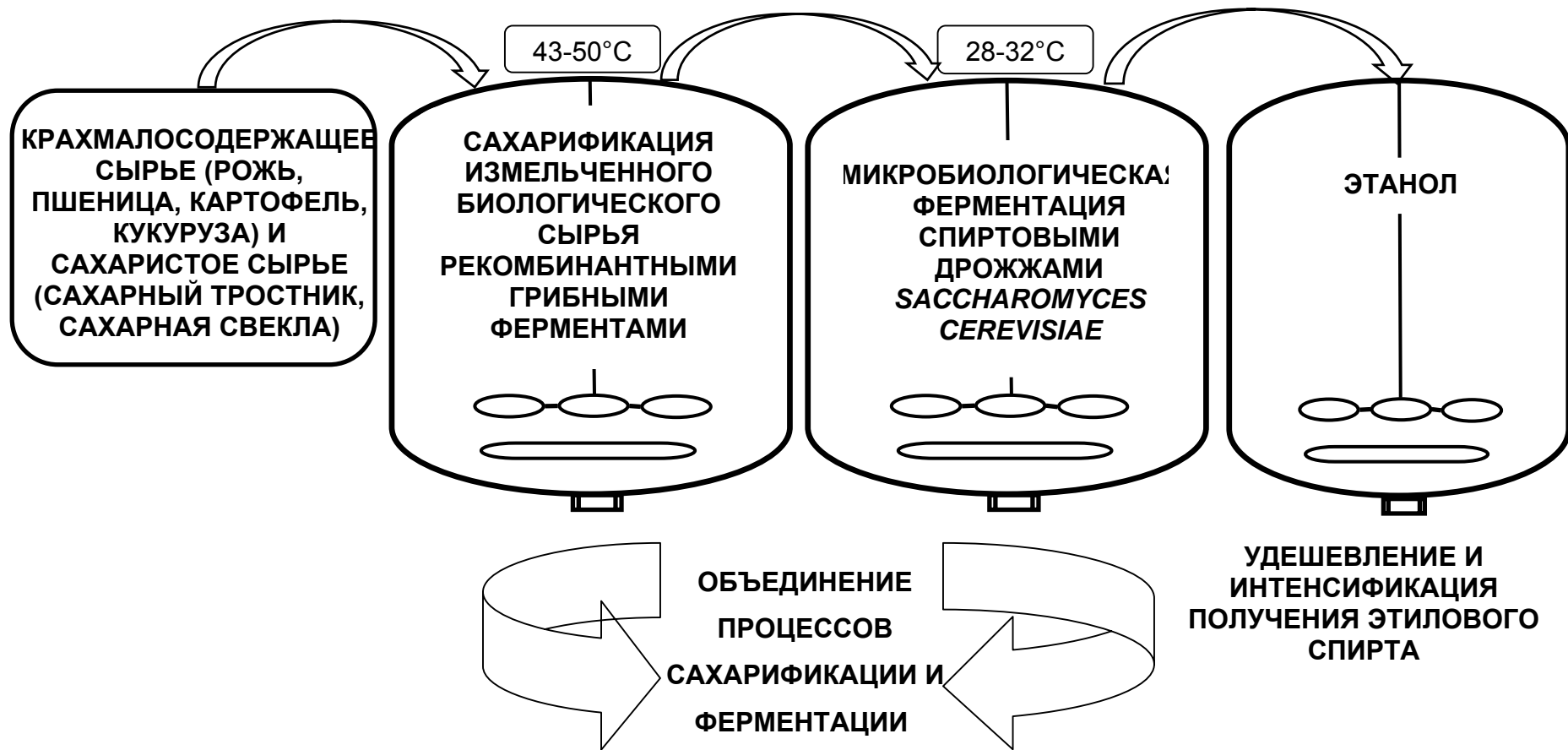


Рис. 2. Схема современной технологии производства спирта.

ГЛАВА 2. ПОЛИМЕРНЫЕ ГЕНЫ ФЕРМЕНТАЦИИ САХАРОВ

Ферментация сахаров у дрожжей *Saccharomyces* контролируется семействами полимерных генов, расположенных в субтеломерных районах хромосом – наиболее динамичных участках дрожжевого генома (Mortimer et al. 1992). Рассмотрим важные для спиртовых дрожжей семейства полимерных генов *SUC*, *MAL* и *MEL*, отвечающих соответственно, за ферментацию сахарозы, мальтозы и мелибиозы.

2.1. β -Фруктозидазные гены *SUC* ферментации сахарозы

Сахароза — распространенный естественный источник углерода для дрожжей *Saccharomyces*. Гидролиз этого дисахарида до глюкозы и фруктозы обычно осуществляется за счет фермента инвертазы (β -фруктозидазы) (рис. 3).

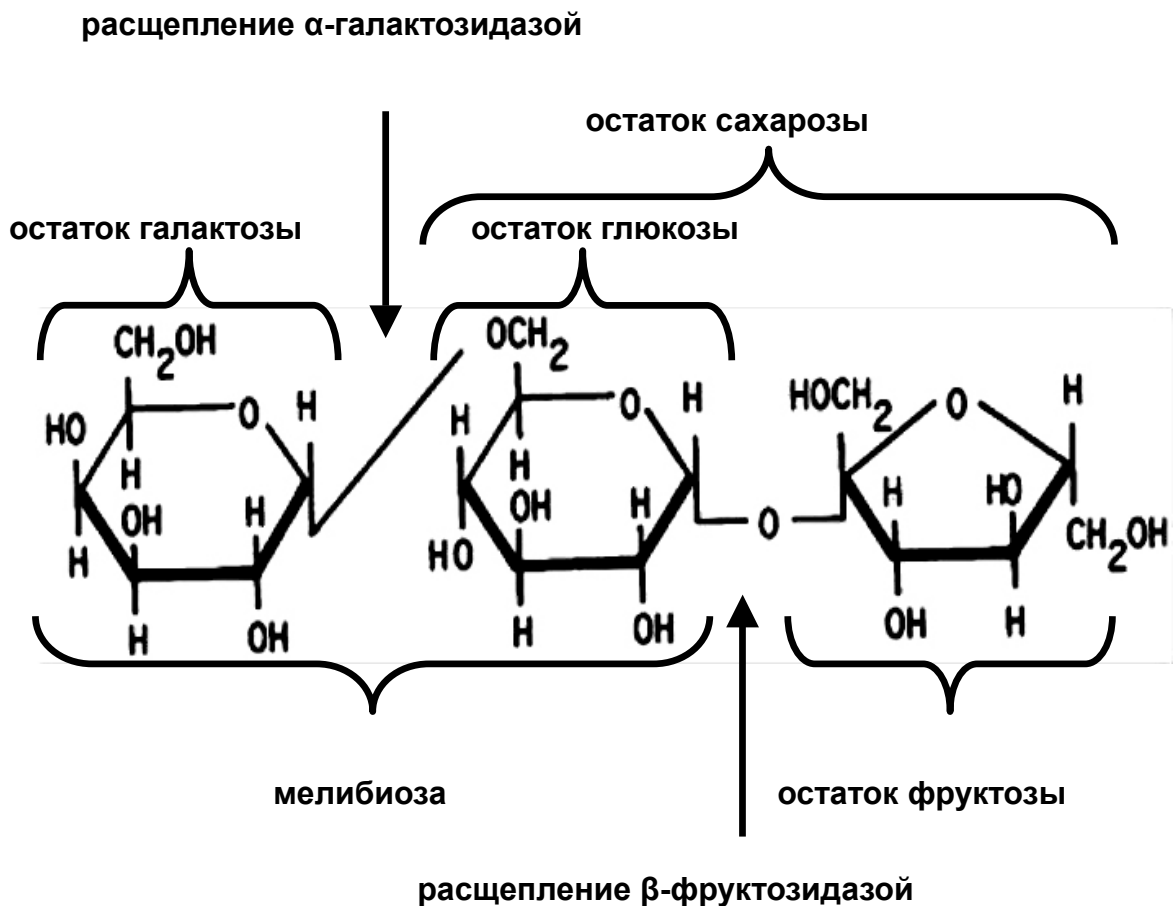


Рис. 3. Строение молекулы раффинозы.

Ферменты, обладающие β -фруктозидазной активностью, относятся к семействам GH32 (прокариотические и эукариотические сахаразы и фруктанызы) и GH68 (бактериальные левансахаразы). Согласно сравнительному анализу аминокислотных последовательностей, представители указанных семейств имеют сходные по структуре олигопептидные блоки, что позволило объединить семейства GH32 и GH68 в β -фруктозидазное суперсемейство (Наумов и Дорошенко 1998). У редких штаммов сахараза может гидролизоваться внутриклеточной α -глюкозидазой (мальтазой) (Наумов и Наумов 2012). В результате транскрипции гена *SUC2* дрожжей *S. cerevisiae* образуются две формы фермента: внутриклеточная негликозилированная инвертаза неизвестной функции и периплазматическая гликозилированная инвертаза, необходимая для гидролиза сахаразы (Carlson & Botstein 1982.). Семейство полимерных генов *SUC* представлено девятью генами, расположенными на разных хромосомах: *SUC1* (хр. VII), *SUC2* (IX), *SUC3* (II), *SUC4* (XIII), *SUC5* (IV), *SUC7* (VIII), *SUC8* (X), *SUC9* (XIV) и *SUC10* (XVI). За исключением *SUC2*, эти гены локализованы в высоко мобильных субтеломерных районах хромосом (Carlson & Botstein 1982, 1983; Carlson et al. 1995; Sarokin & Carlson 1985, 1986; Mortimer et al. 1992; Наумов и Наумова 2010 а, б). Единственный нетеломерный ген *SUC2* локализован на расстоянии около 14 т.п.н. от субтеломерных последовательностей левого плеча хромосомы IX (Mortimer et al. 1992). Ген *SUC2*, или его нефункциональный аллель *suc2⁰*, имеются у всех изученных природных и промышленных штаммов *S. cerevisiae* (Carlson & Botstein 1982, Naumov et al. 1992, 1996c; Naumova 2003; Ness & Aigle 1995; Denayrolles et al. 1997). В начале кодирующей области псевдогена *suc2⁰* обнаружен стоп-кодон (Gozalbo & Hohmann 1989).

Считается, что ген *SUC2* является исходным (предковым) геном, от которого произошли остальные гены *SUC* путем дупликации (Carlson & Botstein 1983). Образовавшийся теломерный локус *SUC* в ходе эволюции мог переместиться на различные хромосомы дрожжей за счет рекомбинации гомологичных последовательностей (Carlson & Botstein 1985).

Полимерные гены *SUC8*, *SUC9* и *SUC10* были недавно идентифицированы в нашей лаборатории с помощью гибринологического анализа и Саузерн-гибридизации. У спиртовой расы XII обнаружено три полимерных гена: *SUC2*,

SUC5 и *SUC8* (Наумов и Наумова 2010 б). Показано, что штаммы ВКМ Y-1831 и DBVPG 1340, выделенные, соответственно, из поврежденных яблок и из почвы, имеют генотипы *SUC2 SUC9* и *suc2⁰ SUC10* (Наумов и Наумова 2010 б).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей полимерных генов *SUC1*, *SUC2* и *SUC4* не выявил делеций и вставок отдельных нуклеотидов (Gozalbo & Hohmann 1989a). Среди нуклеотидных замен, наблюдаемых в кодирующей области изученных генов *SUC*, преобладали транзиции С-Т (Hohmann & Gozalbo 1989).

Показано, что культурные дрожжи *S. cerevisiae*, обладающие дополнительными теломерными генами *SUC1*, *SUC3–SUC5* и *SUC7* в различных комбинациях, часто встречаются среди спиртовых, пекарских, пивных и винных дрожжей (Ness & Aigle 1995; Naumov et al. 1996с; Denayrolles et al. 1997; Codón et al. 1997). В некоторых популяциях, несмотря на потерю активного гена *SUC2*, может иметь место стабилизация фенотипа *Suc⁺* за счет полимерии генов *SUC*, например, у штамма DBVPG 1340: *suc2⁰ SUC10* (Наумов и Наумова 2010а). Известно, что промышленные штаммы *S. cerevisiae* выращивают на мелассе, содержащей β-фруктозиды – сахарозу и раффинозу. Поэтому наличие полимерных генов *SUC* у этих штаммов может быть результатом естественной селекции. Большинство винных штаммов, выращиваемых на виноградном сусле, не содержащем сахарозу в существенном количестве, имеют только один ген – *SUC2* (Naumov et al. 1996а; Denayrolles 1997; Nadal 1999; Bidenne 1992). В современной виноделии при определенных условиях допускается добавление сахарозы в виноградное сусло, а для получения сухих препаратов стартовых винных дрожжей используется меласса (Мартыненко 2006). Это может объяснить редкое обнаружение винных штаммов *S. cerevisiae* с несколькими генами *SUC*. Полимерные гены *SUC*, прежде всего, необходимы для роста дрожжей на сахарозе, а также ее ферментации при изготовлении игристых и плодово-ягодных вин, сидра и хлеба. Кроме того, препараты β-фруктозидазы применяются в технологических процессах, где необходима инверсия сахарозы: в ликеро-водочной и, особенно, безалкогольной промышленности при приготовлении инвертных сиропов, а также в качестве антикристаллизатора при приготовлении плодово-ягодных морсов,

соков, в хлебопечении, в кондитерской промышленности для ослабления сахарозы (Грачева и Кривова 2000).

При изучении устойчивости дрожжей к токсическим веществам, содержащимся в мелассе, были идентифицированы полимерные гены *RTM* (от англ. Resistance to Toxic Molasses) (Ness & Aigle 1995). Было показано, что гены *RTM* тесно сцеплены с теломерными генами *SUC*, а последовательность *SUC-RTM* локализована между X- и Y'-субтеломерными последовательностями. Гены *RTM* во многих копиях обнаружены у спиртовых, пекарских и пивных штаммов дрожжей *Saccharomyces* и, как правило, отсутствуют у винных штаммов (Ness & Aigle 1995; Naumov et al. 1996c; Denayrolles et al. 1997). Наличие генов *RTM* не влияет на способность дрожжей ферментировать сахарозу. Совместная эволюция генов *SUC* и *RTM*, по-видимому, связана с присутствием токсических метаболитов в субстратах, содержащих сахарозу в качестве источника углерода, включая мелассу (Denayrolles et al. 1997).

Сравнительный анализ генов биологических видов рода *Saccharomyces* показал, что наиболее изменчивыми являются теломерные районы хромосом, в которых локализованы и гены *SUC*, контролирующие ферментацию сахарозы (Kellis et al. 2003). Гены *SUC* с хромосомной локализацией, аналогичной гену *SUC2* дрожжей *S. cerevisiae*, обнаружены у дрожжей *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus*, тогда как у *S. cariocanus* он расположен в хромосоме XV, в области реципрокной транслокации (Kellis et al. 2003; Коршунова и др. 2005). В настоящее время известно всего четыре штамма дрожжей *S. arboricola*, изолированных в континентальном Китае и на Тайване (Wang & Bai 2008; Naumov et al. 2013). Хромосомная локализация гена *SUC* у этих дрожжей до настоящего времени не известна.

В отличие от культурных дрожжей *S. cerevisiae*, у остальных видов *Saccharomyces* теломерные гены *SUC* не обнаружены. Нуклеотидная последовательность гена *SUC2* составляет 1596 п.н. и кодирует полипептид, размером в 532 аминокислотных остатка (Taussing & Carlson 1983). Определены нуклеотидные последовательности теломерных генов *SUC1* и *SUC4* дрожжей *S. cerevisiae* (Hohmann & Gozalbo 1988). Нуклеотидные последовательности генов *SUC2* видов *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. bayanus* имеются в

международных компьютерных базах данных (Регистрационные номера AABY01000004, AAC101000133, AABZ01000015 и AACA01000015, соответственно). Известна также нуклеотидная последовательность гена *SUC2* дрожжей *S. cariocanus* (Коршунова и др. 2005).

Сравнительный анализ β -фруктозидаз дрожжей *Saccharomyces* выявил их большое сходство: 90-97% (Коршунова и др. 2005). Наиболее дивергентным является белок *SUCb* дрожжей *S. bayanus*, которые в свою очередь являются самыми дивергентными в роде *Saccharomyces* и по результатам филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 26S рДНК (Kurtzman & Robnett 2003). Это может указывать на параллельную эволюцию β -фруктозидазных и рибосомальных генов дрожжей рода *Saccharomyces*.

2.2. Полимерные гены *MAL*, контролирующие ферментацию мальтозы

У дрожжей *S. cerevisiae* существует два типа α -глюкозидаз. Мальтаза отвечает за гидролиз α -1,4-глюкозидов (мальтоза, тураноза), а изомальтоза — за гидролиз и ферментацию α -1,6-глюкозидов (α -метилглюкозида, изомальтоза) (Наумов и Наумов 2012). Признак ферментации мальтозы важен для культурных дрожжей *S. cerevisiae*, выращиваемых на средах, содержащих этот сахар. Ферментация мальтозы у дрожжей *S. cerevisiae* контролируется, по крайней мере, пятью полимерными локусами *MAL*: *MAL1* (локализован в хромосоме VII-R), *MAL2* (III-R), *MAL3* (II-R), *MAL4* (XI-R) и *MAL6* (VIII-R) (Charron et al. 1986; Charron et al. 1989; Chow et al. 1989; Mortimer et al. 1992; Barnett 1981). Локусы *MAL* расположены в субтеломерной области хромосом (Прайд и Льюис 1997). Каждый из локусов *MAL* состоит из трех тесно сцепленных генов, кодирующих пермеазу мальтозы (GENE1), α -глюкозидазу/мальтазу (GENE2) и регуляторный ген *MAL*-активатора (GENE3) (Cohen et al. 1985; Charron et al. 1986; Needleman 1991; Наумов и др. 1989 б; Naumov et al. 1994a). Схема строения локуса *MAL6* представлена на рис. 4. Мальтозные гены дают эффект как внутрилокусной, так и межлокусной комплементации. Генетический и молекулярный анализ штаммов, сбрасывающих и не сбрасывающих мальтозу, позволил проследить эволюцию локусов *MAL* в природных популяциях дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* (Наумова и др. 1994а, б; Naumov et al. 1994а). Большинство штаммов *S. cerevisiae* содержали более одного функционального мальтозного локуса, тогда как среди *S. paradoxus* не были

обнаружены штаммы с несколькими локусами *MAL*. Комплементационный анализ и Саузерн-гибридизация показали, что локус *MAL1* имеется у всех штаммов *S. cerevisiae* и является единственным локусом, обнаруженным у дрожжей *S. paradoxus*. На этом основании было высказано предположение, что локус *MAL1* является исходным предковым локусом, от которого в процессе эволюции произошли остальные локусы ферментации мальтозы (Naumov et al. 1994a). Большинство штаммов *S. paradoxus* не способны сбраживать мальтозу. У этих штаммов *S. paradoxus* обнаружен только один активный ген из трех — α -глюкозидаза (*GENE2*) (Naumov et al 1994a).

Обитающие в природе дрожжи *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. cariocanus* и редкие природные изоляты *S. cerevisiae* могут ассимилировать мальтозу, но не сбраживают этот сахар или сбраживают его с большой задержкой. Явление утилизации сахаров в аэробных, а не в анаэробных условиях получило название — «эффект Ключивера» (Fukuhara 2003). С помощью цитоплазматических митохондриальных дыхательно-недостаточных мутаций (*petite*) Наумов и др. (2007 а,б) изучили роль дыхания в утилизации мальтозы у не сбраживающих мальтозу дрожжей *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* и *S. cariocanus*. Все штаммы не сбраживали мальтозу в течение 10 суток, однако, они могли ассимилировать 5%-ную мальтозу на питательной среде, содержащей пептон и дрожжевой экстракт. При этом их митохондриальные мутанты дыхательной недостаточности теряли способность даже утилизировать мальтозу. На примере делеционных мутантов лабораторного штамма *S. cerevisiae* 600-1В показано, что экспериментальные дизрупции в генах *GENE1* и *GENE3* не блокируют ассимиляцию мальтозы, тогда как дизрупция в α -глюкозидазном гене *GENE2* приводит к отсутствию ассимиляции мальтозы (Наумов и др. 2007а).

У дрожжей *Saccharomyces* α -глюкозидаза является внутриклеточным ферментом (De la Fuente & Sols 1962), поэтому для ферментации этого сахара необходима активная пермеаза мальтозы. Природные штаммы, в отличие от культурных дрожжей *S. cerevisiae*, характеризуются низкоэффективным транспортом мальтозы, зависимым от дыхания. Известно, что митохондриальные мутации дыхательной недостаточности могут приводить к одновременной потере ферментации и ассимиляции мальтозы у некоторых генетических линий

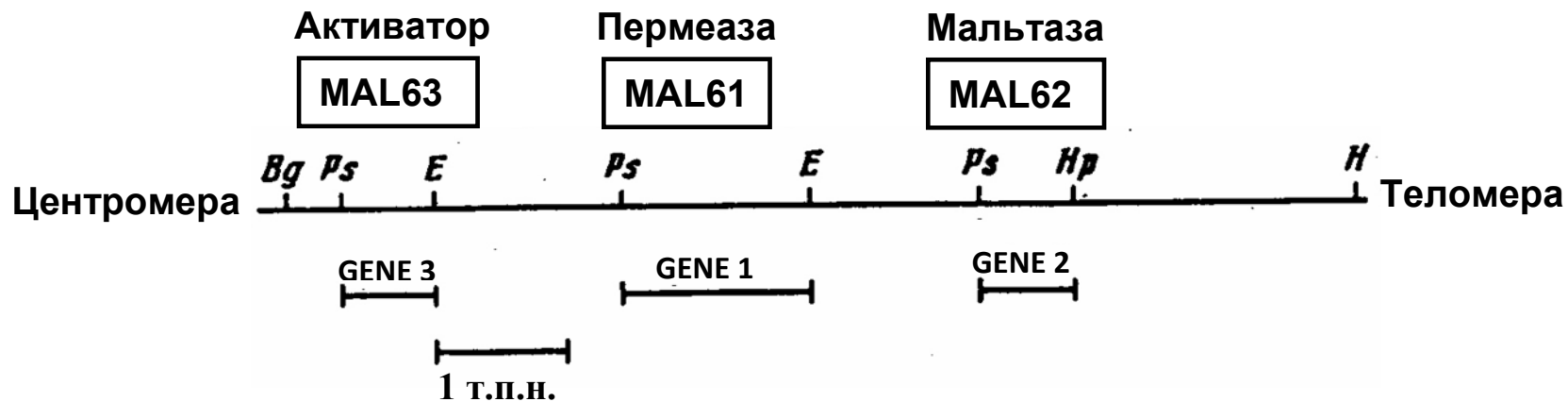


Рис. 4. Строение локуса *MAL6* у дрожжей *S. cerevisiae*. Используемые для Саузерн-гибридизации зонды приведены под рестрикционной картой. Сокращения, используемые для эндонуклеаз: *Bg*=*Bgl*III, *H*=*Hind*III, *Hp*=*Hpa*II, *Ps* = *Pst*I, *E* = *Eco*RI.

S. cerevisiae (Schamhart et al. 1975, Evans & Wilkie 1976). Как правило, этого не происходит у промышленных штаммов *S. cerevisiae*, для которых свойственно накопление полимерных локусов *MAL* (Oda et al. 1996).

У природных штаммов *Saccharomyces* зависимость от дыхания низкоаффинная пермеаза мальтозы, по-видимому, предназначена для ассимиляции мальтозы, а не для ее ферментации. В отличие от культурных дрожжей в ферментационных процессах, природные штаммы *Saccharomyces* усваивают мальтозу в аэробных условиях. Подтверждением этому могут быть образующие на поверхности вина пленку аэробные хересные дрожжи, у которых ассимиляция мальтозы также зависит от дыхания (Наумов и др. 2007а).

2.3. α -Галактозидазные гены *MEL* ферментации мелибиозы

У дрожжей *Saccharomyces* фермент α -галактозидаза (мелибиаза) способствует гидролизу дисахарида мелибиозы, в результате чего образуются глюкоза и галактоза. При культивировании дрожжей *Saccharomyces* в промышленности часто используют субстрат мелассу, содержащий в качестве одного из компонентов трисахарид раффинозу, для полного гидролиза которого необходимо наличие двух ферментов – β -фруктозидазы (инвертазы) и α -галактозидазы (мелибиазы) (рис. 3). В связи с чем гены *MEL*, отвечающие за ферментацию мелибиозы дрожжей *Saccharomyces*, представляют интерес, в частности, для создания производственных штаммов дрожжей-сахаромицетов, наиболее полно усваивающих мелассу. Среди дрожжей *Saccharomyces* известны как штаммы, способные сбраживать мелибиозу, так и штаммы негативные по этому признаку. Наиболее хорошо изучены α -галактозидазные гены дрожжей *S. cerevisiae*. Большинство штаммов этого вида не сбраживают мелибиозу и даже не содержат молчащей последовательности *MEL* (Naumov et al. 1991, 1995а, 1996а,d; Turakainen et al. 1993). Обнаружено накопление полимерных генов *MEL* у штаммов *S. cerevisiae*, обитающих в желудочно-кишечном тракте млекопитающих и отходах производства оливкового масла (Naumov et al. 1991, 1995а; Turakainen et al. 1993 а).

Секвенирование гена *MEL1* было проведено на двух разных штаммах *S. cerevisiae* (Liljeström 1985; Summer-Smith et al. 1985). Была установлена теломерная локализация гена *MEL1* в левом плече хромосомы II (Vollrath et al. 1988). Ген *MEL2* был идентифицирован у штамма *S. cerevisiae*, выделенного с ягод винограда, с

помощью гибридологического анализа (Наумов 1989б). С помощью рекомбинационных тестов на аллелизм и Саузерн-гибридизации с зондом *MEL1* были идентифицированы еще 9 полимерных генов *MEL3—MEL11* различной хромосомной локализации (Naumov et al. 1990; 1991; 1996d). Физическое картирование, основанное на фрагментации хромосом, позволило установить субтеломерную локализацию генов *MEL2—MEL10* (Turakainen et al. 1993а). Специально сконструированные 32 теломерных тестера *S. cerevisiae*, у которых маркер *URA3* интегрирован в левое или правое плечо каждой из 16 хромосом, были скрещены с гаплоидными линиями, содержащими только по одному гену *MEL2—MEL11* (Naumov et al. 1995b; 1996d). По результатам рекомбинационного анализа была однозначно определена локализация всех известных генов *MEL* в субтеломерных районах левых (L) или правых (R) плеч хромосом: *MEL2* (VII-L), *MEL3* (XVI-L), *MEL4* (XI-L), *MEL5*(IV-L), *MEL6* (XIII-R), *MEL7* (VI-R), *MEL8* (XV-R), *MEL9* (X-R), *MEL10* (XII-R), ген *MEL11*(I-L) и *MEL1*(II-L). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *MEL1—MEL11* показал их высокий уровень сходства: 94.8–100% (Turakainen et al. 1994; Naumov et al. 1996d).

Признак ферментации мелибиозы характерен для видов *S. arboricola*, *S. bayanus* и *S. mikatae*, а также для гибридного таксона *S. pastorianus*. Сбраживающие мелибиозу винные штаммы, как правило, относятся к *S. bayanus* и редко к *S. cerevisiae* (Naumov et al. 1995а, 1996d). Молекулярно-генетический анализ сбраживающих мелибиозу штаммов *Saccharomyces*, выделенных из ферментационных процессов и природных источников, показал, что дрожжи *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* имеют только по одной копии гена *MEL* в отличие от некоторых популяций дрожжей *S. cerevisiae* (Наумова и др. 2011). Гены *MEL* секвенированы у дрожжей *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. mikatae* и *S. pastorianus* (Turakainen et al. 1993а; Naumov et al. 1996d; Turakainen et al. 1991; Naumova et al. 1996с; Наумова и др. 2003, 2011). Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей α -галактозидазных генов свидетельствует о видоспецифичности генов *MEL* дрожжей рода *Saccharomyces* (Наумова и др. 2011). Обращает на себя внимание адаптивная особенность субтеломерных генов ферментации сахаров у дрожжей *Saccharomyces*. Под влиянием селективных условий может происходить накопление полимерных генов

ферментации мальтозы (*MAL*), сахарозы (*SUC*) и мелибиозы (*MEL*), тогда как в некоторых популяциях накапливаются мутантные аллели (псевдогены) или делеции *mal*, *suc* и *mel* (Naumov et al. 1994b, 1995a, 1996c, Oda & Tonomura 1996).

ГЛАВА 3. МОЛОЧНЫЕ ДРОЖЖИ РОДА *KLUYVEROMYCES*

3.1. Роль пробиотических микроорганизмов

Известно, что молоко и кисломолочные продукты содержат сахар лактозу, который не усваивается у взрослых людей из-за отсутствия соответствующего фермента β -галактозидазы (лактазы). Лактаза расщепляет дисахарид лактозу на глюкозу и галактозу (рис.5), которые затем адсорбируются в тонком кишечнике. Наличие во многих пищевых продуктах лактозы способствует развитию вредной микрофлоры, приводящей к кишечным расстройствам и газообразованию. Одним из способов решения указанной проблемы является использование функциональных продуктов, содержащих пробиотические микроорганизмы. В последние годы в мире наблюдается значительный рост потребления пробиотических кисломолочных продуктов (Wassenaar & Klein 2008; Maccaferri et al. 2012).

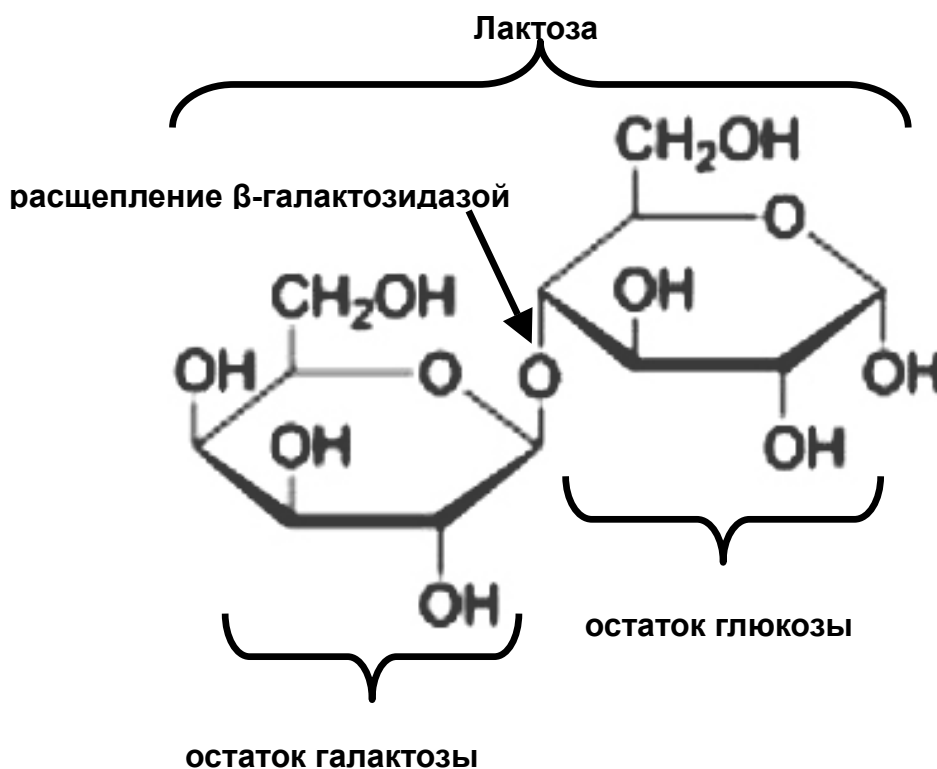


Рис. 5. Строение молекулы лактозы и ее гидролиз.

Показано, что пробиотики оказывают положительное воздействие на желудочно-кишечную экосистему, стимулируя иммунные механизмы слизистой оболочки через «соперничество» с потенциальными патогенными бактериями (Aragon et al. 2010; Spiller 2008; Ventura et al. 2009). В результате численность полезных анаэробных бактерий растет, а потенциально патогенных микроорганизмов уменьшается. В качестве пробиотических микроорганизмов часто используются молочнокислые бактерии, обладающие ферментом β -галактозидазой. Молочные дрожжи *Kluuveromyces* одни из немногих дрожжевых организмов, обладающих этим ферментом и способных утилизировать лактозу. Эти дрожжи являются компонентами молочнокислых продуктов и их отходов – молочной сыворотки. Способные гидролизовать и утилизировать лактозу дрожжи *Kluuveromyces* могут быть классифицированы как пробиотические микроорганизмы (Bolla et al. 2011; Farnworth 2005; Jianzhong et al. 2009).

3.2. Современная таксономия дрожжей рода *Kluuveromyces*

Таксономическое положение дрожжей *Kluuveromyces* подвергалось многочисленным ревизиям. Впервые они были описаны в роде *Saccharomyces* как виды *S. lactis*, *S. fragilis* и *S. marxianus*, позже последний вид был перенесен в род *Zygosaccharomyces* (Guilliermond & Negroni 1929). В монографии по аскоспоровым дрожжам (Stelling-Dekker 1931) род *Saccharomyces* был разделен на два подрода: *Saccharomyces* и *Zygosaccharomyces* на основании жизненного цикла диплонтот и гаплонтот. Эта классификация была принята в определителе дрожжей Lodder и Kregen-van-Rig (1952). Проведенная Кудрявцевым (1954) ревизия рода *Saccharomyces* привела к созданию двух новых родов *Fabospora* и *Zygofabospora*, в которые были помещены, соответственно, *F. fragilis* и *Zf. marxiana*. В роде *Zygofabospora* позднее был описан новый вид *Zf. krassilnikovii* на материале изолятов из сокотечений дуба (Kudrjawzew 1960). В составе рода *Saccharomyces* были описаны также виды *S. drosophilorum*, *S. phaseolosporus*, *S. dobzhanskii*, *S. wickerhamii* и *S. vanudenii* (Shehata et al. 1955; Phaff et al. 1956; van der Walt et al. 1963). В 1961 г. в роде *Saccharomyces* был описан вид *S. aestuarii* (Fell 1961). Boidin et al. (1962) переместили дрожжи с почковидными спорами из родов *Saccharomyces*, *Fabospora* и *Zygofabospora* в род *Guilliermondella*.

Используя для дифференциации видов гетерогенного рода *Saccharomyces* sensu Lodder et Kregen-van Rij 1952 критерий скрещиваемости, Wickerham (1955) выделил группу видов *S. lactis*, *S. fragilis*, *S. marxianus* и *Z. dozhanskii*, неродственных типовому виду *S. cerevisiae*. Названные дрожжи были помещены в отдельный род *Dekkeromyces* (Wickerham & Burton 1956).

Род *Kluveromyces* был создан van der Walt (1956a, b) на основе вида *Kl. polysporus*, характерной особенностью которого является формирование многоспоровых асков, содержащих до 70 и более спор. Позднее в роде *Kluveromyces* был описан еще один вид - *Kl. africanus*, выделенный из почвы в Африке, имеющий до 16 спор в аске (van der Walt 1956b). Изучение жизненного цикла дрожжей *Kl. polysporus* показало, что их многоспоровость связана с несинхронным многократным митотическим делением гаплоидных ядер. Подобные отклонения митоза редко отмечались и у немногоспоровых дрожжей *S. marxianus*. На этом основании был изменен первоначальный диагноз полиспорового рода *Kluveromyces*, и произошло включение в него немногоспоровых дрожжей, ранее относимых к родам *Fabospora*, *ZygoFabospora*, *Zygorenospora*, *Dekkeromyces* и *Guilliermondella* (van. der Walt 1965). В измененный род вошло 14 видов: *Kl. polysporus*, *Kl. marxianus*, *Kl. fragilis*, *Kl. lactis*, *Kl. drosophilum*, *Kl. dozhanskii*, *Kl. phaseolosporus*, *Kl. delphensis*, *Kl. africanus*, *Kl. wickerhamii*, *Kl. lodderi*, *Kl. aestuarii*, *Kl. vanudenii*, *Kl. phaffii*.

В определителе дрожжей (Lodder 1970) в составе рода *Kluveromyces* van. der Walt emend. van. der Walt уже имеется 18 видов, разделенных по морфологическим и физиологическим признакам на две группы. Первая группа включила гомоталлические виды с серповидными или бобовидными спорами: *Kl. delphensis*, *Kl. lodderi*, *Kl. phaffii*, *Kl. africanus*, *Kl. polysporus*, *Kl. fragilis*, *Kl. marxianus*, *Kl. wickerhamii*, *Kl. dozhanskii*, *Kl. drosophilum*, *Kl. phaseolosporus*. Вторая группа объединила гомоталлические и гетероталлические виды с круглыми или овальными спорами: *Kl. aestuarii*, *Kl. bulgaricus*, *Kl. cicerisporus*, *Kl. vanudenii*, *Kl. veronae*, *Kl. wikenii*, *Kl. lactis*.

С 70-х годов прошлого века в систематике дрожжей *Kluveromyces* стали использоваться молекулярные методы, основанные на характеристике белков и нуклеиновых кислот. Так, с помощью ДНК-ДНК реассоциации была показана

гетерогенность рода *Saccharomyces* sensu Lodder et Kregen-van Rij (1952). Показано, что виды *S. fragilis*, *S. lactis*, *S. marxianus*, *S. dozhanskii* и *S. wickerhamii*, перемещенные в род *Kluveromyces* (van. der Walt 1965), имеют низкий уровень ДНК-ДНК реассоциации с типовой культурой *S. cerevisiae*: 0-6% (Bicknell & Douglas 1970). ДНК-ДНК реассоциация между указанными видами не превышала 30%, за исключением комбинации видов *S. fragilis* и *S. marxianus*, имеющих 90%-ную гомологию. Методом ДНК-ДНК реассоциации видов рода *Kluveromyces* было установлено, что дрожжи *Kl. bulgaricus*, *Kl. cicerisporus*, *Kl. fragilis* и *Kl. wikenii*, имеющие более 90% гомологии с видом *Kl. marxianus*, являются его синонимами (Martini 1973; Vaughan Martini & Martini 1985, 1987b). Высокий уровень ДНК-ДНК реассоциации был обнаружен между *Kl. lactis* и *Kl. vanudenii* (97%), а так же между *Kl. lactis* и *Kl. drosophilum*, *Kl. phaseolosporus* (70%).

Данные ДНК-ДНК реассоциации хорошо согласуются с результатами гибридологического анализа (Наумов 1986а, 1987б), на основании которого в измененный род *Zygoxospora* (Kudriavzev 1960 emend. G.Naumov), из рода *Kluveromyces* были выделены гибридуемые виды с гапло-диплоидным циклом развития и фенотипически близкие к ним немногоспоровые виды: *Zf. marxianus* (типовой вид), *Zf. aestuarii*, *Zf. delphensis*, *Zf. dozhanskii*, *Zf. drosophilum*, *Zf. lodderi*, *Zf. phaseolospora*, *Zf. thermotolerans*, *Zf. waltii*, *Zf. wickerhamii*.

В определителе дрожжей Kurtzman & Fell (1998) род *Kluveromyces* включает 15 видов. По сравнению с определителем Lodder (1970) добавлены новые виды *Kl. blattae*, *Kl. bacillisporus*, *Kl. thermotolerans*, *Kl. waltii* и *Kl. yarowii*, а ряд видов переведены в синонимы *Kl. lactis* и *Kl. marxianus*.

Прогресс в области молекулярной биологии привел к использованию новых методов в систематике дрожжей и способствовал активному развитию молекулярной филогении дрожжей *Kluveromyces*. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 18S и 26S рРНК выявил полифилию рода *Kluveromyces* (Cai et al. 1996; James et al. 1997; Kurtzman & Robnett 1998). Внутри гетерогенного рода *Kluveromyces* со 100%-статистической поддержкой выделилась монофилитическая группа из пяти видов: *Kl. aestuarii*, *Kl. dozhanskii*, *Kl. lactis*, *Kl. marxianus* и *Kl. wickerhamii*. Близкое родство указанных видов было подтверждено ПДРФ-анализом 5.8S-ITS участка рДНК и секвенированием

митохондриального гена *COX2* (Belloch et al. 1998, 2000). В 1999 г. был описан новый вид *Kl. nonfermentas*, который, по результатам филогенетического анализа 5.8S-ITS участка рДНК, имеет наибольшее сходство с видом *Kl. aestuarii* (Nagahama et al. 1999). Указанные два вида имеют одинаковый источник выделения – морская вода (de Araujo et al. 1995). Гибридологическим анализом было установлено, что виды *Kl. dobzhanskii*, *Kl. lactis*, *Kl. marxianus* и *Kl. wickerhamii* обладают общей системой типов спаривания, позволяющей им скрещиваться во всех комбинациях (Наумов 1986а, 1987а, б, в; Naumov & Naumova 2002).

По результатам сравнительного анализа домена D1/D2 26S рДНК дрожжи *Kluyveromyces* попали в кладу “*Saccharomyces*” (Kurtzman & Robnett 1998). Мультигенный филогенетический анализ генов рибосомальной РНК, ряда однокопийных ядерных и митохондриальных генов разделил 75 видов клады “*Saccharomyces*” на 14 кластеров (Kurtzman & Robnett 2003). Виды *Kluyveromyces* попали в шесть различных кластеров. На базе 14 кластеров были предложены 14 родов, один из которых *Kluyveromyces*. Ревизированный род объединил четыре гибридизируемых вида (*Kl. lactis*, *Kl. marxianus*, *Kl. dobzhanskii* и *Kl. wickerhamii*) и филогенетически близкие виды *Kl. aestuarii* и *Kl. nonfermentas* (Kurtzman 2003). Принимая во внимание большое прикладное значение дрожжей *Kl. lactis* и *Kl. marxianus*, а также большое количество публикаций по этим видам, была предложена консервация рода *Kluyveromyces* с изменением типового вида *Kl. polysporus* на *Kl. marxianus* (Kurtzman et al. 2001). Остальные виды таксономического рода *Kluyveromyces* были разделены между родами *Kazachstania*, *Lachancea*, *Tetrapisispora* и *Vanderwaltozyma*.

3.3. *Kluyveromyces lactis*

Молочные дрожжи *Kl. lactis* являются вторым, после *Saccharomyces cerevisiae*, объектом фундаментальных и прикладных исследований. Эти дрожжи имеют большое биотехнологическое значение и часто используются для производства различных гетерологичных белков медицинского и пищевого значения (van Ooyen et al. 2006). Дрожжи *Kl. lactis* образуют антибактериальные (Скородумова 1951, 1969) и антидрожжевые (Gunge et al. 1981; Wésolowski et al. 1982; Lehmann et al. 1987; Голубев 2013а) токсины, имеющие медицинское

значение. Проведенное секвенирование генома *Kl. lactis* создало хорошую основу для изучения других видов рода *Kluyveromyces* (Bussereau et al. 2006).

Дрожжи *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* фенотипически очень схожи и не могут быть дифференцированы на основании стандартных физиологических тестов. В свое время *Kl. lactis*, наряду с *Kl. dobzhanskii*, рассматривали как разновидности дрожжей *Kl. marxianus* (van der Walt & Johannsen 1984). Необоснованность объединения в один вид дрожжей *Kl. lactis*, *Kl. dobzhanskii* и *Kl. marxianus* была продемонстрирована ДНК-ДНК реассоциацией и изоферментным анализом (Vaughan Martini & Martini 1985, 1987; Sidenberg & Lachance 1986). Было предложено рассматривать дрожжи *Kl. lactis* и *Kl. dobzhanskii* как самостоятельные виды.

На основании данных изоферментного анализа Sidenberg & Lachance (1986) предложили классифицировать дрожжи гетерогенного комплекса *Kl. lactis* в качестве двух разновидностей: *Kl. lactis* var. *lactis* и *Kl. lactis* var. *drosophilarum*. Имеющие идентичные электрофоретические спектры 7 ферментов и не усваивающие лактозу дрожжи *Kl. drosophilarum*, *Kl. phaseolosporus* и *Kl. vanudenii* были объединены в разновидность *Kl. lactis* var. *drosophilarum*. Штаммы этой разновидности выделяются из различных природных источников: сокотечения деревьев, почва, насекомые и др. Утилизирующие лактозу культурные штаммы были отнесены к *Kl. lactis* var. *lactis*. Самостоятельный видовой статус дрожжей *Kl. lactis* был подтвержден молекулярным кариотипированием (Sor & Fukuhara 1989; Belloch et al. 2002) и ПДРФ-анализом IGS2-участка рДНК (Nguyen et al. 2000b). Предложенное разделение дрожжей *Kl. lactis* на две разновидности было принято в последних определителях дрожжей (Lachance 1998, 2011).

Разделение вида *Kl. lactis* на две разновидности, основанное на физиологических и экологических различиях, является достаточно условным. С помощью ПДРФ-анализа межгенного спейсера IGS2-участка рДНК установлено, что *Kl. lactis* var. *drosophilarum* имеет сложный состав и включает, по крайней мере, восемь генетических популяций (Naumova et al. 2004; Наумова и др. 2005б). Европейские дрожжи популяции «krassilnikovii» не имеют генетических механизмов изоляции от культурных молочных дрожжей *Kl. lactis* var. *lactis* и рассматриваются в качестве прародителей последних (Наумов 2000б; Naumov &

Naumova 2002). Дрожжи популяции «krassilnikovii» и *Kl. lactis* var. *lactis* имеют одинаковые молекулярные кариотипы и неразличимы по нуклеотидным последовательностям 5.8S-ITS района рДНК, но могут быть дифференцированы по *AluI*-профилям более варибельного межгенного спейсера IGS2 рДНК (Naumov & Naumova 2002; Belloch et al. 2002; Наумова и др. 2005б).

Южноафриканские дрожжи «vanudenii» также не имеют генетических механизмов изоляции с *Kl. lactis* var. *lactis*, но отличаются от них и остальных шести популяций по молекулярным кариотипам. В Дальневосточной Азии обнаружена популяция «восточная», штаммы которой частично генетически изолированы от *Kl. lactis* var. *lactis* и обладают уникальным кариотипическим профилем (Naumov & Naumova 2002; Naumova et al. 2004). Штаммы этой популяции имеют 64-68% ДНК-ДНК реассоциации с *Kl. lactis* var. *lactis* (Fuson et al. 1987). В Северной Америке дифференцировано пять генетических популяций, имеющих специфические IGS2-рестрикционные профили: «*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*pseudovanudenii*», «новая» и «водная». Указанные популяции частично генетически изолированы друг от друга и от *Kl. lactis* var. *lactis*, а также отличаются по молекулярным кариотипам (Naumov & Naumova 2002). Ассоциированные с молочными продуктами дрожжи *Kl. lactis* var. *lactis* недавно обнаружены в природных условиях – в почве под зарослями недотроги *Impatiens glandulifera* Royle в лесопарке (Наумов и др. 2014). При наступлении заморозков недотрога полностью отмирает и её надземная часть быстро лизируется, тем самым обогащая верхние слои почвы доступными для дрожжей источниками углевода. Авторы связали выделение из почвы штаммов *Kl. lactis* var. *lactis* с различными грызунами в момент кормления потомства молоком.

3.4. *Kluveromyces marxianus*

Характерной особенностью дрожжей *Kl. marxianus* является их термоустойчивость. Они способны выживать при температуре 52°C (Banat & Marchant 1995). Кроме того, *Kl. marxianus* способны ферментировать ксилозу, которая является основным компонентом лигноцеллюлозных гидролизатов. В этой связи в мире наблюдается повышенный интерес к изучению этих дрожжей как потенциальных продуцентов биоэтанола из лигноцеллюлозных отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности (Anderson 1986; Limtong 2007;

Suryawati 2008; Suzuki et al. 2014). Недавно проведено секвенирование полных геномов двух термоустойчивых штаммов *Kl. marxianus* DMB1 и КСТС 17555, представляющих биотехнологический интерес для производства биоэтанола (Jeong et al. 2012; Suzuki et al. 2014). Дрожжи *Kl. marxianus* являются перспективными в качестве потенциальных пробиотических микроорганизмов. Недавно проведенное исследование изолированного из сыворотки коровьего молока штамма *Kl. marxianus* B0399 показало его пробиотические свойства (Maccafferri et al. 2012). Дрожжи *Kl. marxianus* способны выживать в пищеварительной системе человека, сохраняя жизнеспособность и ферментационные свойства. При этом они стимулируют развитие полезных бактерий *Bifidobacterium* и подавляют развитие патогенной микрофлоры.

Дрожжи *Kl. marxianus*, утилизирующие лактозу молочной сыворотки, используются при получении белковых обогатителей кормов, ферментов, этанола и слабоалкогольных напитков, в хлебопечении, при производстве мороженого (Голубев и Голубев 2004; Голубев 2013б; Rubio-Texeira 2006; Fonseca et al. 2008; Meyrath & Bayer 1979; Carlotti et al. 1991; Грачева и Кривова 2000).

Kl. marxianus является типовым видом рода *Kluyveromyces* (Lachance 2011). Этот вид объединяет штаммы различного экологического происхождения, имеющие почти 100%-ную ДНК-ДНК реассоциацию (Martini 1973; Vaughan Martini & Martini 1985, 1987). Многие природные изоляты *Kl. marxianus*, включая типовую культуру *Kl. marxianus* CBS 712, способны только ассимилировать или в редких случаях сбраживать лактозу. Штаммы таксономических видов *Kl. fragilis* и *Kl. cicerisporus* выделяются из молочных продуктов и млекопитающих и, как правило, способны сбраживать лактозу. Южноафриканские эндемичные дрожжи *Kl. wikenii* выделяются из алкогольных ферментационных процессов и не способны даже усваивать лактозу. Таким образом, вид *Kl. marxianus* физиологически гетерогенен и включает три популяции 1) собственно “marxianus” – природные космополитные дрожжи; 2) “fragilis” – молочные, также космополитные дрожжи; 3) “wikenii” – эндемичные дрожжи из алкогольных ферментаций в Южной Африке (Наумов 2006).

3.5. Полимерные β -галактозидазные гены *LAC*, контролирующие ферментацию лактозы

Фермент β -галактозидаза (К.Ф 3.2.1.23) относится к гликозидазам (α -гликозидгидролазам) и расщепляет терминальные β -D-галактозидные связи, отщепляя остатки галактозы с нередуцирующего конца галактозидов (Грачева и Кривова 2000). Существует несколько типов β -галактозидаз: внутриклеточные β -галактозидазы, характерные для дрожжевых организмов, имеют молекулярную массу выше 200000 и субъединичное строение и внеклеточные β -галактозидазы, которые являются гликопротеидами и, в отличие от внутриклеточных, практически не содержат углеводного компонента. Субстратом для β -галактозидаз являются β -галактозиды, включая лактозу и ее производные. В зависимости от природы фермента и его специфичности искусственные и естественные субстраты могут расщепляться по-разному. Лактоза – ценный углевод, однако она плохо растворима, несладкая и не всегда усваивается животными организмами. β -галактозидаза расщепляет этот сахар до галактозы и глюкозы (рис. 5), и эта смесь уже имеет сладкий вкус и хорошо растворима в воде.

Фермент β -галактозидаза широко распространен в растительных и животных тканях (в тонком кишечнике, слюне, плазме и сыворотке крови), однако среди дрожжей лактозу способны сбраживать только около 1% из более чем 700 известных видов. Способностью утилизировать лактозу обладают некоторые виды рода *Kluyveromyces*: *Kl. lactis* и *Kl. marxianus* (Грачева и Кривова 2000; Barnett et al. 2000; Голубев и Голубев 2004).

У дрожжей *Kluyveromyces* лактоза гидролизуется ферментом β -галактозидазой, которая имеет внутриклеточную локализацию, поэтому необходимо наличие соответствующих пермеаз для транспорта сахара в клетку. Система лактозных генов у молочных дрожжей *Kl. lactis* var. *lactis* хорошо изучена (Dickson & Riley 1989; Leonardo et al. 1987; Boze et al. 1987 a,b; Gödecke et al. 1991). Наряду с тесносцепленными структурными генами β -галактозидазы *LAC4* и пермеазы лактозы *LAC12*, за ферментацию лактозы отвечают структурные галактозные гены *GAL1* (киназы), *GAL7* (трансферазы) и *GAL10* (эпимеразы) и галактозо-лактозные регуляторные гены *LAC9* и *LAC10* (рис. 6). На рис. 6. представлена схема строения лактозного локуса у дрожжей *Kl. lactis* var. *lactis*.

Лактозный кластер *LAC4*—*LAC12* у *Kl. lactis* расположен в теломерном районе хромосомы II штамма *Kl. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1118 (Fairhead & Dujon 2006).

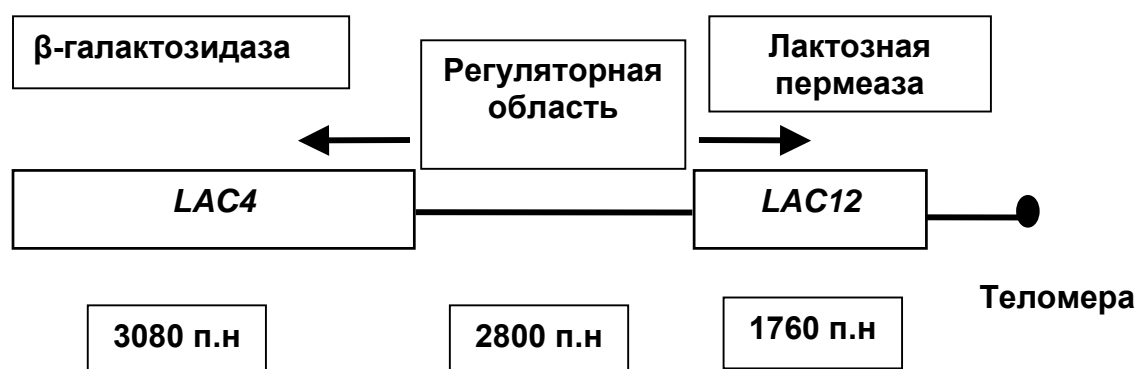


Рис. 6. Строение локуса *LAC4*—*LAC12* у штамма *Kl. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140.

Herman и Halvorson (1963) обнаружили полимерные гены *LAC1* и *LAC2* у сбраживающих лактозу штаммов *Kl. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1118 и NRRL Y-1140. У гибридов этих штаммов наблюдалось в мейозе дигенное полимерное расщепление по способности ферментировать лактозу.

Сцепление генов *LAC4* и *LAC12* в локусах *LAC1* и *LAC2* было установлено тетрадным анализом гибридов штаммов NRRL Y-1118 (*LAC1*) и NRRL Y-1140 (*LAC2*) с природными штаммами *Lac⁻*, не обладающими этими генами (Наумов 2008). Установлено, что локус *LAC2* расположен в хромосоме III. Недавно проведенный молекулярный скрининг генотипов *LAC4* у различных штаммов *Kl. lactis* var. *lactis*, позволил обнаружить новый локус *LAC3*, расположенный в хромосоме IV, а также выявить штаммы, обладающие несколькими локусами *LAC* (Наумов и Наумова 2014).

Ближайшие родственники молочных дрожжей *Kl. lactis* var. *lactis* природные штаммы *Kl. lactis* var. *drosophilorum* не только не способны усваивать лактозу, но не имеют даже молчащих последовательностей лактозных генов *LAC4* и *LAC12* (Наумов и др. 2006).

У вида *Kl. marxianus* усваивающие лактозу штаммы встречаются как среди культурных молочных дрожжей, так и среди штаммов природного происхождения (Наумов 2010). Дрожжи таксономического вида *Kl. wikenii*, относимого в

настоящее время к синонимам *Kl. marxianus*, не способны усваивать лактозу. С помощью комплементационного анализа при гибридизации с *lac*-тестерами *Kl. lactis* var. *lactis* были определены генотипы генов *LAC* штаммов *Kl. marxianus*, различного происхождения (Наумов 2006). Было установлено, что неспособность ряда природных штаммов *Kl. marxianus* сбраживать лактозу связана с отсутствием гена активной пермеазы *LAC12*, при этом указанные штаммы обладали активным геном *LAC4*. На основании генетического анализа Наумов (2006) разделил изученные штаммы на три группы. Штаммы первой группы (природные штаммы *Kl. marxianus*) обладают низкоактивной лактозной пермеазой – генотип *lac12L*. Во второй группе объединились штаммы таксономического вида *Kl. wikenii*, у которых лактозная пермеаза полностью неактивна, и соответствующий ген отсутствует или поврежден – генотип *lac12*. Молочные дрожжи (таксономический вид *Kl. fragilis*), активно сбраживающие лактозу составили третью группу – генотип *LAC12*. На специальной среде с антимицином А была установлена зависимость от дыхания лактозных пермеаз у штаммов из трех групп (Наумов 2006). По этому признаку в виде *Kl. marxianus* выделяются три внутривидовых популяции:

- 1) «*fragilis*» – молочные культурные штаммы, обладающие сильной лактозной пермеазой, которая не зависит от дыхания;
- 2) собственно «*marxianus*» – природные дикие штаммы, имеющие слабую пермеазную активность, зависящую от дыхания;
- 3) «*wikenii*» – эндемичные дрожжи из алкогольных ферментаций в Южной Африке, которые не имеют активной пермеазы лактозы.

Дрожжи вида *Kl. wickerhamii* представлены исключительно природными штаммами, способными только ассимилировать, но не сбраживать лактозу из-за зависимого от дыхания низкоаффинного транспорта лактозы (Наумов 2005а).

По-видимому, domestикация дрожжей *Kl. lactis* var. *lactis*, произошла после приобретения генов *LAC4* и *LAC12*, что позволило им размножаться в кисломолочных продуктах (Наумов 2005б). Принимая во внимание, что эти гены полностью отсутствуют у их ближайших родственников (популяция “*krassilnikovii*”), Наумов (2005б) высказал предположение о том, что гены *LAC4–LAC12* дрожжей *Kl. lactis* var. *lactis* происходят от вида *Kl. marxianus*, штаммы которого также встречаются в молочных продуктах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Объекты исследования и методы культивирования дрожжей

Изученные штаммы дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluveromyces* и их происхождение приведены в таблицах 1 и 2. Штаммы были получены из следующих коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино; ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва; ВНИИГП – Всероссийский научно-исследовательский институт гидролизной промышленности, Москва; ВНИИПБВП – ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности РАСХН, Москва; ГНУ ВНИИПБТ – Государственное Научное Учреждение Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Пищевой Биотехнологии РАСХН, Москва; ИНМИ – Институт микробиологии РАН, Москва; Котласский ЦБК – Котласский целлюлозно-бумажный комбинат, Коряжма; КТИПП – Киевский технологический институт пищевой промышленности; УкрНИИСП – Украинский НИИ Сахарной Промышленности, Киев; УкрНИИСБПП – Украинский НИИ спирта и биотехнологии продовольственных продуктов, Киев; CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Утрехт, Голландия; МСУС – Microbiological Collection of Yeast Cultures of the Department of Microbiology in the Agronomic School of Madrid, Испания; UFRJ – Colecao de Culturas de Levaduras, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Бразилия; NBRC – NITE Biological Resource Center, Осака, Япония; NRIC – Department of Food Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Япония; NRRL – Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Пеория, Иллинойс, США.

Дрожжи культивировали при 28°C на полной среде YPD следующего состава (г/л): бакто-агар фирмы “Difco” (США) – 20; глюкоза фирмы “Merck” (Германия) – 20; дрожжевой экстракт “Difco” – 10; бакто-пептон “Difco” – 20. Для диагностики дрожжей использовались следующие основные сахара: мальтоза фирмы «Sigma»

Таблица 1. Изученные штаммы дрожжей рода *Saccharomyces* и их происхождение

Штамм	Источник и место выделения	Ферментация сахаров*			Генотип		Регистрационный номер последовательности <i>SUC</i> в GenBank
		<i>MAL</i>	<i>SUC</i>	<i>MEL</i>	<i>SUC</i>	<i>MAL</i>	
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>							
ВКМ У-1830	Виноград, Мичуринск	+1	+1	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1MAL2</i> <i>MAL3MAL4</i> <i>MAL6</i>	-
S288с = X2180	Генетическая линия	-	+2	-	<i>SUC2</i>	-	V01311
С.В.11	Дериват штамма NCYC 74	-	-	+1	-	-	-
№1	Сухие дрожжи, Китай	+1	+1	+1	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i> <i>MAL4 MAL6</i>	-
№2	То же	+1	+1	+1	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i> <i>MAL4 MAL6</i>	-
№4	То же	+2	+2	+1	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i> <i>MAL4 MAL6</i>	-
№5	То же	+2	+1	+1	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i> <i>MAL4 MAL6</i>	-
№6	То же	+2	+2	+1	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i> <i>MAL4 MAL6</i>	-
ВКПМ У-187	Спиртовые дрожжи, УкрНИИСБПП	+1	+2	-	<i>SUC2 SUC9</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
ВКПМ Y-408	Спиртовые дрожжи, Россия	+1	+1	-	<i>SUC1 SUC2 SUC3 SUC7 SUC9</i>	<i>MAL1MAL2 MAL3MAL4</i>	-
ВКПМ Y-480	Спиртовые дрожжи, Институт микробиологии и вирусологии, Латвия	+1	+2	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
ВКПМ Y-563	Спиртовые дрожжи, Украина	+2	+1	+1	<i>SU1? SUC2 SU3? SUC5</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
ВКПМ Y-564	Спиртовые дрожжи, УКРНИИСП	+1	+2	+2	<i>SUC1 SUC2 SUC5 SU9?</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
ВКПМ Y-622	Спиртовые дрожжи, Институт микробиологии и вирусологии, Латвия	+1	+2	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
ВКПМ Y-626	Спиртовые дрожжи	+2	+2	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
ВКПМ Y-1330	То же	+1	+1	-	<i>SUC1 SUC2 SUC5 SUC9 SUCxSUCy</i>	<i>MAL1MAL2 MAL3MAL4</i>	-
ВКПМ Y-318	Спиртовые дрожжи, КТИПП	+1	+2	-	<i>SUC1 SUC2 SUC5 SUCy</i>	<i>MAL1 MAL3 MAL4</i>	-
ВКПМ Y-1334	Спиртовые дрожжи	+2	+1	-	<i>SUC2 SUCx SUCy</i>	<i>MAL1MAL2 MAL3MAL4</i>	-
ВКПМ Y-1693	Спиртовые дрожжи, Котласский ЦБК	+1	+1	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
ВКПМ Y-2395	Раса В	+1	+1	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL4</i>	-
ВКПМ Y-2484	Раса 563, ВНИИПБВП	+1	+2	-	<i>SUC1 SUC2 SUC5 SUC7 SUC4/10</i>	<i>MAL1 MAL3 MAL4</i>	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
ВКПМ Y-795	Онежский гидролизный завод	+2	+2	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
ВКПМ Y-2080	Омская раса	+2	+1	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
ВКМ Y-380	Хлебо-картофельное зерно, Раса II, Россия	+1	+1	-	<i>SUC1 SUC2 SUC3 SUC8 SUCy</i>	<i>MAL1MAL2 MAL3MAL4</i>	-
ВКМ Y-381	Раса XII (Красноярская 9), Россия	+2	+2	-	<i>SUC1 SUC2 SUC3 SUC8 SUCx SUCy</i>	<i>MAL1MAL2 MAL3MAL4</i>	-
ВКМ Y-382	Раса XIII	+1	+1	-	<i>SUC1 SUC2 SUC3 SUCx</i>	<i>MAL1 MAL2 MAL4</i>	-
ВКМ Y-383	Раса Я	+1	+1	-	<i>SUC1 SUC2</i>	<i>MAL1</i>	-
ВКМ Y-1169	Раса XII, Германия	+1	+2	-	<i>SUC1 SUC2 SUC7 SUC8 SUCx SUCy</i>	<i>MAL1 MAL2 MAL3 MAL4</i>	-
ВКМ Y-1812	Раса M	+1	+2	-	<i>SUC1 SUC2 SUC7 SUCx</i>	<i>MAL1MAL2 MAL3</i>	-
ВКМ Y-1828	Раса XV	+1	+1	-	<i>SUC1 SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3 MAL4</i>	-
В	Спиртовые дрожжи, ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии	+1	+2	-	<i>SUC1 SUC2</i>	<i>MAL1 MAL4</i>	-
Г67	Спиртовые дрожжи, Россия	+2	+1	+2	<i>SUC1 SUC2 SUC9 SUCy</i>	<i>MAL1MAL2 MAL4 MAL6</i>	-
Г73	Спиртовые дрожжи, ГНУ ВНИИПБТ Россельхозакадемии	+1	+1	+1	<i>SUC1 SUC2 SUCx</i>	<i>MAL1 MAL2</i>	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
Г660	То же	-	-	-	<i>SUC1 SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
Г112	То же	-	-	-	<i>SUC1 SUC2</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
К81	То же	+1	+2	+1	<i>SUC1 SUC2 SUC7 SUC9 SUC4/10 SUCx SUCy</i>	<i>MAL1MAL2 MAL3 MAL4</i>	-
ХП7	Инбредная линия расы XII расы	+1	+1	-	<i>SUC5SUC2 SUC8</i>	<i>MAL1MAL2 MAL3</i>	-
BC-2	Бирюсинский гидролизный завод, Россия	-	+1	-	<i>SUC2</i>	<i>MAL1</i>	-
№148	Кормовые дрожжи, Украина	-	+1	-	<i>SUC2 SUC7</i>	<i>MAL1 MAL3</i>	-
1.99.-9А	Генетическая линия	+	+	-	<i>suc2⁰</i>	-	X13982
NBRC 2043	Пекарские дрожжи, Япония	+	+	-	<i>SUC2</i>	-	AB534206
NBRC 2375	То же	+	+	-	<i>SUC2</i>	-	AB534206
HP203	То же	+	+	-	<i>SUC2</i>	-	AB534208
NBRC 0224	Спиртовые дрожжи, Япония	+	+	-	<i>SUC2</i>	-	AB534214
NRIC 0057	Ферментированный рис, Филлипины	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534216
NRIC 0059	То же	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534217
NRIC 0060	То же	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534217
NRIC 0061	То же	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534218
Куокай 7	Саке, Япония	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534219
OC2	Вино, Япония	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534220

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
AK46B, AK 46A	Забродившая вишня, Япония	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB495285, AB495286
WS 06	Хлебное дерево, Самоа	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534221
NBRC 10514	Экссудат дерева, Япония	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534222
NBRC 10515	То же	д.о.	+	д.о.	<i>SUC2</i>	-	AB534223
NBRC 10516	То же	д.о.	+	-	<i>SUC2</i>	-	AB534224
SH4.108-2D	Генетическая линия	д.о.	+	-	<i>SUC1suc2Δ</i>	-	X07570
SH4.107-1A	То же	д.о.	+	-	<i>SUC3suc2Δ</i>	-	KJ158251
S51-6D	Генетическая линия	д.о.	+	-	<i>SUC5suc2Δ</i>	-	KJ158250
SH4 1.82-2B	То же	д.о.	+	-	<i>SUC4suc2Δ</i>	-	X07572
S22-6A	То же	д.о.	+	-	<i>SUC7suc2Δ</i>	-	KJ158249
S0-2A	Сегрегант гибрида спиртовой расы XII	+	+	-	<i>SUC8suc2Δ</i>	-	KJ158248
S20-6A	Сегрегант гибрида штамма ВКМ У-1831. Поврежденные яблоки, Россия	+	+	-	<i>SUC9suc2Δ</i>	-	KJ158247
S101-4A	Сегрегант гибрида штамма DVPG 1340. Почва, Голландия	-	+	-	<i>SUC10suc2Δ</i>	-	KJ158246
SCO-39B	Сегрегант гибрида спиртовой расы SH 4.108.-2D	-	+	-	<i>suc2Δ</i>		
<i>Saccharomyces paradoxus</i>							
CBS 432 (T)	Санкт-Петербург	+	+	-	<i>SUCp</i>	-	AABY01000004
NBRC 1804	Кора дуба, Япония	-	+	-	<i>SUCp</i>	-	AB534227

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
NBRC 1805	То же	-	+	-	<i>SUCp</i>	-	AB534228
NBRC 10609	Почва, Южная Африка	-	+	-	<i>SUCp</i>	-	AB534229
NBRC 102005	<i>Quercus mongolica</i> , Дальний Восток	-	+	-	<i>SUCp</i>	-	AB534230
NBRC 102006	Экссудат дуба <i>Q. robur</i> , Татарстан	-	+	-	<i>SUCp</i>	-	AB534226
NBRC 0259	Экссудат дуба, Голландия	+	+	-	<i>SUCp</i>	-	AB534226
AK43	Цветок, Япония	-	-	-	<i>SUCp</i>	-	AB534231
<i>Saccharomyces arboricola</i>							
CBS 10644 (T)	Кора дуба <i>Q. fabric</i> , Китай	-	+	-	<i>SUCa</i>	-	KJ158245
AS 2.3318	Кора каштана <i>Castanopsis orthacantha</i> , Китай	-	+	-	<i>SUCa</i>	-	-
AS 2.3319	То же	-	+	-	<i>SUCa</i>	-	-
TJ14M01	Плодовое тело гриба <i>Auricularia polytricha</i> , Тайвань	-	+	-	<i>SUCa</i>	-	-
<i>Saccharomyces bayanus</i>							
CBS 7001	Ручейник <i>Mesophylax adopersus</i> , Испания	+	+	+	<i>SUCb</i>	-	AACA01000015
ВКМ Y-1146	Виноград, Россия	+	+	+	<i>SUCb</i>	-	-
<i>Saccharomyces cariocanus</i>							
UFRJ 50816 (T)	<i>Drosophila</i> sp., Рио-де-Жанейро, Бразилия	-	+	-	<i>SUCc</i>	-	AY885246

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Saccharomyces mikatae</i>							
NBRC 1815 (T)	Почва, Япония	-	+	+	<i>SUCm</i>	-	AABZ01000015
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>							
NBRC 1802 (T)	Растительный опад, Япония	-	+	-	<i>SUCk</i>	-	AACI01000133
<i>Kluyveromyces marxianus</i>							
CBS 834	Зерна кефира, Голландия	-	+	-	<i>INUkl</i>	-	AF135594

T – типовая культура. CBS7001 = MCYC 623, CBS 10644 = AS.3317;

* «+1», «+2» и «-» - соответственно способность штаммов сбраживать соответствующий сахар на первые, вторые сутки и отсутствие способности сбраживать данный сахар;

д.о. – данные отсутствуют.

Таблица 2. Изученные штаммы дрожжей *Kluyveromyces* и их происхождение

Штамм	Автор* и № в других коллекциях	Источник и место выделения	Ассимиляция сахаров**				Установленное видовое название
			Lac	Mal	Amg	Mez	
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Kluyveromyces lactis</i>							
Wm Y37	NRRL Y-1140	Сливки США	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i> ***
Wm 27	NRRL Y-1118	Сливки США	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i> ***
ВКМ Y-868(Т)	CBS 603	Мягкий сыр, Англия	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ Y-450	Цыганков М.Ф.	Чал, Туркмения	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-451	Цыганков М.Ф., чал 15	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-452	Цыганков М.Ф.	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-453	Неизвестно	Мацун, Армения	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-454	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-455	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-459	Кудрявцев В.И., №701	Творог, Елец	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-460	Кудрявцев В.И., №702	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-461	Неизвестно	Армения, Ереван	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-462	Кудрявцев В.И., твор. 1	Творог	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-464	Кудрявцев В.И., вар. 6	Варенец	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-465	Кудрявцев В.И., №1	Чал, Туркмения	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-466	Цыганков М.Ф.	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-467	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-468	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
ВКМ Y-469	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-470	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-471	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-472	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-473	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-474	То же	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-476	Цыганков М.Ф., №37	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-869	Кудрявцев В.И., Z85 сев	Кислое молоко, Кольский п-ов	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ Y-762	CBS 141	Сливки, США	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
CBS 762		Йогурт, страна неизвестна	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ Y-870	Цыганков М.Ф., чал 8	Чал, Туркмения	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ Y-896	CBS 743	Мягкий сыр, Италия	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ Y-1186	Кудрявцев В.И., CM14	Молоко, Киев, Украина	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ Y-1332	Скородумова А.М., 153/15	Творог, Кисловодск	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-1333	Скородумова А.М., 154/21	Скисшее молоко, Буденновск	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ Y-1334	Скородумова А.М., 155/22	То же	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ Y-1336	Скородумова А.М., 171/25	Молоко, Карачаево- Черкессия	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
ВКМ У-1337	Скородумова А.М., 159/28	Простокваша, Пятигорск	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ У-1338	Скородумова А.М., 160/29	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ У-1339	Скородумова А.М., 161/33	Сметана, Ленинград	+	+	-	-	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ У-1341	Скородумова А.М., 164/36	Молоко, Карелия	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ У-1342	Скородумова А.М., 165/120	Молокозавод, Тюменская обл.	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ У-1343	Романович Т.Г., № 166	Молоко, Гомельская обл., Белоруссия	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ У-1868	Цыганков М.Ф.	Чал, Туркмения	+	+	+	+	<i>Kl. lactis</i>
ВКМ У-2454	ИБФМ У-583 = ССУ 21- 3-1	-	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>							
ВКМ У-876(Т)	CBS 712	H. Schnegg	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
<i>Zygofabospora krassilnikovii</i>							
ВКМ У-830	Кудрявцев В.И., №1	Воздух	-	+	+	+	<i>Kl. lactis</i> ***
ВКМ У-831	Кудрявцев В.И., Калуга 2	Сокотечение дуба, Калуга	-	+	+	+	<i>Kl. lactis</i> ***
ВКМ У-834	Кудрявцев В.И., Калуга 1	То же	-	+	+	+	<i>Kl. lactis</i> ***
ВКМ У-835	Кудрявцев В.И., Л-1	Гидролизный завод, Лабвинск	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ У-836	Кудрявцев В.И., СД-8	Гидролизный завод, Саратов	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
ВКМ Y-837	Кудрявцев В.И., Т-4	Гидролизный завод, Тавда	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-1890	Кудрявцев В.И.	Сокоотечение дуба, Россия	-	+	+	+	<i>Kl. lactis</i> ***
<i>Zygodospora marxiana</i>							
ВКМ Y-832	Кудрявцев В.И., №734	Почва, Москва	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-833	Кудрявцев В.И., №739	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-2013	ССУ 50-2-4	Сахарная свекла, Словакия	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
<i>Fabospora fragilis</i>							
ВКМ Y-126	Кудрявцев В.И., №2	Кислое молоко, Россия	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-431	Кудрявцев В.И., 84 сев	Молоко, Кольский п-ов	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-1335	Скородумова А.М., 156/24	Молоко, Карачаево- Черкессия	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-432	Mrak E.M., №104	Испорченные винные ягоды, США	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКМ Y-433	Mrak E.M., №106	То же	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>
ВКПМ Y-4065	CBS 397	Йогурт, Нидерланды	+	-	-	-	<i>Kl. marxianus</i>

* Описание штаммов Скородумовой А.М. можно найти в публикации (Скородумова 1951)

** «+» и «-» – соответственно ассимиляция и отсутствие ассимиляции лактозы (Lac), мальтозы (Mal), α-метил-глюкозида (Amg) и мелицитозы (Mez).

*** Полное видовое название *Kl. lactis* var. *drozophilum* (европейская популяция «krassilnikovii»).

(США), лактоза фирмы «Merk» (Германия), α -метил-глюкозид фирмы «Calbiochem» (США) и мелицитоза фирмы «Serva» (Нидерланды), сахароза фирмы «Merk» (Германия), («РЕАХИМ», Россия) и мелибиоза фирмы «Merk» (Германия) («РЕАХИМ», Россия).

4.2. Физиологическая характеристика штаммов

4.2.1. Способность дрожжей сбраживать сахара определяли по выделению углекислого газа в жидкой среде YP в бродильных пробирках с поплавками при 28°C для *S. cerevisiae* и 37°C для *Kluyveromyces*. Состав ферментационной среды YP тот же, что и среды YPD, но без агара, а вместо глюкозы использовали, соответственно, 2% мальтозу, лактозу, сахарозу, мелицитозу, α -метил-глюкозид или мелибиозу. Штаммы фенотипа Mal⁺, Lac⁺, Suc⁺, Mez⁺, Amg⁺ и Mel⁺ сбраживают соответствующие сахара обычно через сутки и в редких случаях через 2–3 суток. Дрожжи Mal⁻, Lac⁻, Suc⁻, Mez⁻, Amg⁻ и Mel⁻ не сбраживают указанные сахара через 10 суток.

4.2.2. Скорость сбраживания сахаров определяли по количеству выделяемого углекислого газа. Опыты проводили в двух повторностях. В пробирки с 5 мл YP среды засеивали биомассу дрожжей на кончике микробиологической петли и инкубировали в течение 48 часов при 28°C.

Подсчет дрожжевых клеток осуществляли микроскопированием с использованием камеры Горяева. Работа с камерой предусматривает следующий порядок ее заполнения: вначале углубление с сеткой покрывают шлифованным покровным стеклом и, прижимая, смещают покровное стекло в противоположные стороны до появления колец Ньютона. После этого камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов, предварительно окрашенной метиленовым синим для выявления мертвых клеток. Подсчет клеток начинали через 3-5 минут после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании были видны в одной плоскости. Число клеток подсчитывали с объективом 40x за вычетом мертвых клеток.

Затем инокулят в концентрации из расчета 10^6 клеток на мл засеивали в колбы со 100 мл стерильной среды YP, содержащей 2%-ную глюкозу или 2%-ную лактозу. Ферментацию проводили при 28°C для *S. cerevisiae* и при 37°C для *Kluyveromyces* в течение 72 часов. Через каждые 24 часа колбы взвешивали и

определяли количество выделившегося углекислого газа (CO₂) за счет изменения веса колб. В качестве контроля использовали колбы со 100 мл YP среды без инокулята.

4.2.3. Тест на устойчивость штаммов к повышенной температуре

Термоустойчивость штаммов определяли с помощью простого ростового теста на чашках с твердой агаризованной средой YPD при температурах 38°C, 40°C, 42°C, 43°C и 44°C. Штаммы, хорошо растущие при 40°C, были дополнительно проверены на термоустойчивость с тепловым шоком согласно (Ishchuk et al. 2009). Для этого биомассу односуточной (двухсуточной) культуры дрожжей суспендировали в 150 мкл стерильной дистиллированной воды и подвергали тепловому шоку в 46°C, 48°C, 49°C или 50°C (температура теплового шока на 5–6 градусов превышает тестируемую температуру) в течение 15 минут. Затем пробирки охлаждали на льду в течение 5 минут и суспензию клеток рассеивали на чашки с твердой агаризованной средой YPD. Рост исследуемых штаммов при заданных температурах наблюдали в течение 48 часов. В качестве позитивного контроля использовали штамм *Ogatae parapolyomorpha* 1-IR, способный расти при 48°C.

4.3. ПЦР-анализ

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на ДНК-амплификаторах “Bio-Rad” (США) и «Терцик» («ДНК-технология», Россия).

4.3.1. Амплификация рибосомальных последовательностей

Для амплификации 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2, и межгенного спейсера 2 (IGS2) использовали следующие пары праймеров: ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), NTS2 (5'-AACGGTGCTTTCTGGTAG-3') и ETS1 (5'-TGTCTTCAACTGCTTT-3').

Амплификацию проводили непосредственно на дрожжевых клетках. Для этого небольшое количество биомассы дрожжей (на кончике микробиологической петли) суспендировали в 30 мкл буфера, содержащего 3 мМ MgCl₂, 0.3 мМ дНТФ, 50 пмоль каждого из праймеров. Полученную смесь выдерживали при 95°C в течение 15 мин для лизиса клеток, затем добавляли 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия). ПЦР (30 циклов) проводили в следующем режиме:

денатурация при 94°C – 30 с., отжиг праймеров при 56°C – 30 с., синтез ДНК при 72°C – 60 с. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60-65В в 0.5 x TBE буфере (45мМ трис, 10мМ ЭДТА, 45мМ борная кислота) в течение 1,5 часов и окрашивали бромистым этидием. В качестве маркера молекулярных весов использовали 1 kb DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

4.3.2 Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

ПЦР-амплифицированные 5.8S-ITS и IGS2 фрагменты подвергали ферментативному расщеплению, соответственно, с помощью эндонуклеаз *HpaII*, *HaeIII*, *HindIII* и *AluI* («Fermentas», Литва). В качестве контролей привлекали видовые тестеры дрожжей *S. cerevisiae* ВКМ Y-502, *S. arboricola* CBS 10644, *S. bayanus* ВКМ Y-1146, *S. cariocanus* UFRJ 50816, *S. kudriavzevii* NBRC 1802, *S. mikatae* NBRC 1815 и *S. paradoxus* CBS 432, а также *Kl. lactis* ВКМ Y-868 и *Kl. marxianus* CBS 712.

Рестрикцию проводили в течение ночи при 37°C. Разделение фрагментов рестрикции проводили в 2.5%-ном агарозном геле при 50–55 В в 0.5×TBE буфере в течение 3–3,5 часов. Гель окрашивали бромистым этидием в течение 2–3 часов, затем промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали 100 bp DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

4.3.3. Изоляция ДНК

Дрожжевую ДНК выделяли при помощи набора Genomic DNA Purification Kit ("Fermentas", Литва). Для этого дрожжи выращивали в течение двух суток при 28°C на чашках Петри с агаризованной YPD средой. Петлю дрожжей суточной культуры суспендировали в 200 мкл TE буфера (1 мМ трис HCl, pH 7.8, 0.1 мМ ЭДТА), затем добавляли 400 мкл лизисного буфера. Смесь инкубировали в течение 25 мин при 65°C для лизиса клеток; затем добавляли 600 мкл хлороформа/изоамилового спирта (в соотношении 24:1). После центрифугирования при 12000g в течение 2 минут, верхнюю фазу переносили в другую пробирку и добавляли 800 мкл Precipitation Solution и центрифугировали в течение 10 минут. К осадку добавляли 100 мкл NaCl, затем 300 мкл этанола (96%) и оставляли при минус 20° С на ночь. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали.

Осадок промывали охлажденным 70% этанолом, просушивали и растворяли в 50 мкл TE (1mM Трис HCl pH 7.8, 0.1 mM ЭДТА) буфера.

4.3.4. Амплификация генов ферментации сахаров

Для амплификации генов *MEL*, *SUC* и *MAL* дрожжей *Saccharomyces* использовали следующие пары праймеров – DM1/DM2: 5'-TTCGCAGATGGGTGGGACAA-3' и 5'-TAAGCTTGCTGGAACAGTTGTGTT-3', SD1/SR: 5'-ATGCTTTTGCAAGCTTTC-3' и 5'-GGTCATGTTACACAGATCC-3', MAL62F/MAL62R: 5'-ATAACGATGGCTGGGGTGATT-3' и 5'-AAAGCAGCAAACAGCGTCTT-3'. Для амплификации β-галактозидазных генов *LAC4* и *LAC12* дрожжей *Kluveromyces* использовали следующие пары праймеров – MR66/MR67: 5'-ATGCTTTTGCAAGCTTTC-3' и 5'-GGTCATGTTACACAGATCC-3', AC18/AC19: 5'-CTTGAGCTCAAAATGGCAGATCATTCGAGC-3' и 5'-CGGTCTAGAATGGCTTTAAACAGATTCTGC-3'. Амплификацию генов проводили на предварительно изолированной из дрожжей ДНК.

Полимеразную цепную реакцию осуществляли в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM каждого дНТФ, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы *Taq*-полимеразы (“Синтол”, Россия), 20–200 нг ДНК по следующей схеме: начальную денатурацию ДНК проводили при 94°C в течение 3 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.

4.4. Секвенирование β- фруктозидазных генов *SUC* и филогенетический анализ

Амплифицированные фрагменты генов *SUC* элюировали из геля при помощи набора DNA Extraction Kit (“Fermentas”, Литва) согласно протоколу фирмы изготовителя. Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-продуктов по двум цепям по методу Сэнгера проводили при помощи четырех праймеров: SD1 и SR, а также SUC26 (5'-AGATCAACCCATTGCTATCGC-3') и SUC27 (5'-CCTTCCAAATCTTATTGGGTC-3'), комплементарных участку внутренней области гена на автоматическом секвенаторе “Beckman-Coulter” (США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программы SeqMan package (“DNA Star Inc.”, США),

Доступные через интернет нуклеотидные и аминокислотные последовательности взяты из баз данных сайта GenBank на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Гомологию с известными нуклеотидными последовательностями генов *SUC* определяли в программе BLAST. Множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли вручную с использованием программы BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Индекса бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, подсчитывали для 1000 псевдореплик.

4.5. Молекулярное карiotипирование и Саузерн-гибридизация

4.5.1. Выделение интактной хромосомной ДНК

Дрожжи выращивали в 25 мл жидкой YPD среды при 28°C в течение 12–16 часов, осаждали центрифугированием (5-7 мин. при 2000 об/мин) и осадок промывали трижды раствором ЭДТА/трис (50 мМ ЭДТА, 10 мМ трис, рН 7.5), затем суспендировали в 200 мкл раствора ЭДТА/трис, содержащего 4 мкг/мл энзиматического препарата Novozym 234 и держали на водяной бане при 42°C. К полученной клеточной суспензии добавляли 800 мкл 1% - ной легкоплавкой агарозы, охлажденной до 38–42°C, и переносили в специальную форму. Полученную смесь выдерживали на льду в течение 30–60 мин. Агарозные блоки инкубировали в 1 мл раствора LET (0.5 М EDTA, 10мМ Tris, рН 7,5) в течение 2-3 ч при 37°C . Затем инкубировали в буфере, содержащем 0.5 М ЭДТА, 10 мМ трис (рН 7.5), 1% N-лаурол-саркозин (рН 9.5), 1-2 мг/мл протеиназы К при 50°C в течение 8–10 ч. Агарозные блоки промывали в растворе ЭДТА/трис и хранили в этом же буфере при 4°C.

4.5.2. Пульс - электрофорез хромосомной ДНК

Образцы помещали в щели агарозного геля, электрофоретическое разделение хромосомных ДНК проводили на аппарате CHEF-DR III (“BioRad”, США). В качестве буфера использовали 0.5 x TBE, охлажденный до 14°C.

Пульс-электрофорез дрожжей *Saccharomyces* проводили в 1%-ном агарозном геле при 200В в следующем режиме: 15 часов при времени переключения полей 60

сек и 8 часов при времени переключения полей 90 сек. Для оптимального разделения хромосомных полос дрожжей рода *Kluyveromyces* использовали трехступенчатый режим кариотипирования: 1) 170 В, в течение 10 ч при времени переключения полей 40–120 с.; 2) 130 В, в течение 28 ч при времени переключения полей 120–360 с.; 3) 100 В, в течение 9 ч при времени переключения полей 360–1200 с.

В качестве кариотипических стандартов использовали коммерческие препараты ДНК штаммов *S. cerevisiae* YNN 295 и *Wickerhamomyces canadensis* (syn. *Hasenula wingei*) YB-4662-VIA (Bio-Rad, США), имеющие известные размеры и порядок хромосом. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием (0.5 мкг/мл) в течение ночи, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в УФ-свете.

4.5.3. Саузерн-гибридизация хромосомных ДНК

Хромосомную ДНК переносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью аппарата "Vacuum blotter" ("BioRad", США) согласно инструкции фирмы изготовителя ДНК, фиксировали на мембране в течение 2-х часов отжигом при 80°C. В качестве зондов использовали ПЦР-амплифицированные фрагменты генов *SUC2* (штамм *S. cerevisiae* X2180-1A), *MAL62* (штамм *S. cerevisiae* ВКМ Y-1830) и *MEL1* (штамм *S. cerevisiae* С.В.11), *LAC4* (штамм *K. lactis* wm27) и *LAC12* (штамма *K. lactis* wm37). ПЦР-продукты элюировали из агарозного геля с помощью DNA Extraction Kit, согласно протоколу фирмы-изготовителя ("Fermentas", Литва).

Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием dUTP, меченого дигоксигенином (dig-II-dUTP) из набора "DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I" согласно инструкции фирмы "Roche" (Швейцария). Гибридизацию и проявление гибридизационных полос также проводили по инструкции указанной фирмы.

Гибридизацию проводили в гибридизационном буфере 5xSSC (0.15M NaCl, 0.015M цитрат натрия, pH 7.0), содержащем 0.1 % N-лаурол-саркозин, 0.02% SDS (додецилсульфат натрия), 1% блокирующий реагент в течение 12-16 часов при 68°C. После гибридизации фильтры сначала дважды отмывали в 2 x SSC, содержащем 0.1% SDS по 10 минут при комнатной температуре, а затем дважды по 15 минут при 68°C в 0.1 x SSC, содержащем 0.1% SDS. Детекцию

гибризационных сигналов проводили по инструкции фирмы Roche. Для проявления сигналов гибридизации фильтры экспонировали в проявляющем буфере (0.1М трис-НСl, 0.1М NaCl и 50мМ MgCl₂, рН 9.2) в темноте в течение 4-16 часов, содержащем красители: нитросиний тетразолий (nitroblue tetrazolium salt) и 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt) до появления пятен гибридизации. Затем мембрану в течение 5 минут промывали буфером, останавливающим реакцию (10мМ Tris – HCl, 1мМ EDTA (рН 8.0).

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И СЕЛЕКЦИЯ СПИРТОВЫХ ШТАММОВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Современная технология производства спирта – многоэтапный процесс, включающий процессы сахарификации измельченного биологического сырья рекомбинантными грибными ферментами при 43–50°C и последующей микробиологической ферментации сахаристого раствора дрожжами-сахаромицетами при оптимальной для их роста мезофильной температуре (28–30°C) (Banat et al. 1998; McMillan et al. 1999; Wingren et al. 2003). Для производства спирта используют крахмалосодержащее (рожь, пшеница, картофель, кукуруза) и сахаристое (сахарный тростник, сахарная свекла) сырье. 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 сбраживать мальтозу, сахарозу и мелибиозу.

Наиболее оптимальным и экономически обоснованным при производстве спирта является объединение процессов сахарификации и ферментации, что способствует более эффективной работе гидролитических ферментов, которые в этом случае не подвергаются ингибированию конечными продуктами гидролиза – моно- и дисахаридами, конвертируемыми непосредственно в спирт дрожжами *S. cerevisiae*.

В этой связи, актуальным является отбор и селекция термоустойчивых штаммов *S. cerevisiae*, обладающих хорошей ферментационной активностью.

5.1. Молекулярная идентификация спиртовых штаммов

С помощью ПЦР–ПДРФ–анализа 5.8S-ITS участков рДНК, молекулярного кариотипирования и Саузерн-гибридизации нами были изучены особенности геномов спиртовых дрожжей *Saccharomyces*, в основном отечественного происхождения.

Объектом исследования служили 36 спиртовых штаммов, полученных из Института пищевой биотехнологии (ГНУ ВНИИПБТ, Москва), коллекций ВКМ (ИБФМ РАН, Пущино) и ВКПМ (ГосНИИгенетика, Москва), а также сухие промышленные дрожжи (табл.1). Согласно морфологии колоний, вегетативных

клеток, аскоспор и способности ферментировать глюкозу все изученные штаммы относятся к роду *Saccharomyces*.

5.1.1. ПДРФ–анализ 5.8S - ITS фрагментов рДНК

В настоящее время род *Saccharomyces* включает семь биологических видов *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* (Naumov et al. 2000a; Kurtzman 2003; Wang & Bai 2008; Vaughan-Martini & Martini 2011). Эти виды фенотипически не различимы и не могут быть дифференцированы на основании стандартных физиологических тестов.

Указанные виды *Saccharomyces* различаются последовательностями внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 рДНК и могут быть дифференцированы на основании анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции этого участка (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. 2000a; Wang & Bai 2008; Naumov et al. 1992; Fischer et al. 2000).

Для определения видовой принадлежности 36 спиртовых штаммов был использован ПЦР-ПДРФ-анализ 5.8S-ITS фрагментов. В качестве контролей привлекали видовые тестеры *S. cerevisiae* ВКМ Y-502, *S. arboricola* CBS 10644, *S. bayanus* ВКМ Y-1146, *S. cariocanus* UFRJ 50816, *S. kudriavzevii* NBRC 1802, *S. mikatae* NBRC 1815 и *S. paradoxus* CBS 432.

Мы провели амплификацию 5.8S-ITS-фрагментов у 7 видовых тестеров и 36 анализируемых штаммов, отнесенных по стандартным морфологическим и физиологическим тестам к роду *Saccharomyces* (табл.1). Размер амплифицированных 5.8S-ITS-фрагментов был одинаковым у всех изученных и контрольных штаммов и составлял примерно 850 п.н., что подтверждает принадлежность изучаемых дрожжей к роду *Saccharomyces*. Продукты ПЦР анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазами *Hpa*II и *Hae*III (рис. 7).

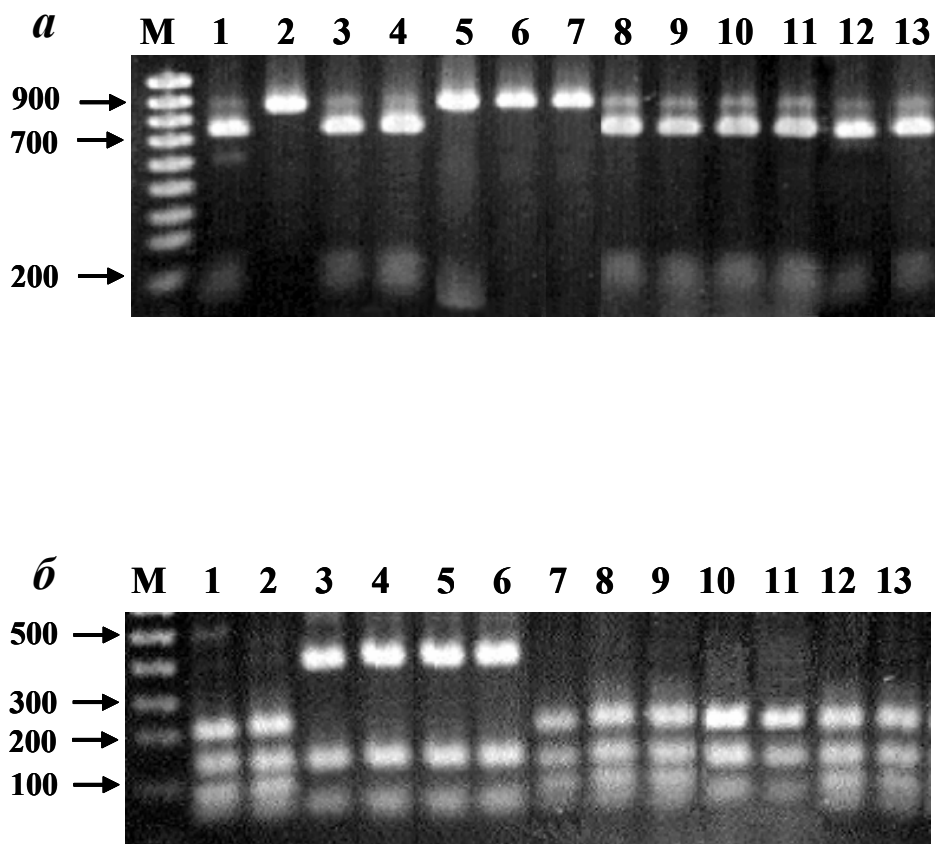


Рис. 7. Рестрикционный анализ амплифицированных 5.8S-ITS-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеаз *HpaII* (а) и *HaeIII* (б). Дорожки: 1 – *S. cerevisiae* ВКМ Y-502; 2 – *S. paradoxus* CBS 432; 3 – *S. bayanus* ВКМ Y-1146; 4 – *S. kudriavzevii* NBRC 1802; 5 – *S. mikatae* NBRC 1815; 6 – *S. arboricola* CBS 10644; 7 – *S. cariocanus* UFRJ 50816; *S. cerevisiae*: 8 – ВКМ Y-380; 9 – ВКМ Y-381; 10 – ВКПМ Y-187; 11 – ВКПМ Y-795; 12 – Г67; 13 – К81. М – маркер молекулярных весов (п.н.) “100 bp DNA Ladder” (“Fermentas”, Литва).

Все изученные штаммы по рестриктазным профилям с двумя эндонуклеазами разделились следующим образом. Типовые культуры *S. cerevisiae* ВКМ Y-502, *S. paradoxus* CBS 432, *S. cariocanus* UFRJ 50816 и 36 анализируемых штаммов имели идентичные *Hae*III-профили с четырьмя фрагментами размером примерно 320, 230, 170 и 130 п.н. (рис. 7б, дорожки 1, 2, 7–13), тогда как тест-штаммы *S. bayanus* ВКМ Y-1146, *S. kudriavzevii* NBRC 1802, *S. mikatae* NBRC 1815, *S. arboricola* CBS 10644 характеризовались наличием трех *Hae*III-фрагментов размером 490, 230 и 130 п.н. (рис. 7б, дорожки 3–6). При *Hpa*II-рестрикции у тест-штаммов *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii* NBRC 1802 и у исследуемых штаммов имеется два фрагмента размером примерно 730 и 120 п.н. (рис. 7а, дорожки 1, 3, 4, 8–13). Штаммы *S. paradoxus*, *S. mikatae* NBRC 1815, *S. arboricola* CBS 10644, *S. cariocanus* UFRJ 50816 характеризуются отсутствием *Hpa*II-сайта рестрикции (рис. 7а, дорожки 2, 5–7). Таким образом, согласно *Hpa*II и *Hae*III профилям все 36 изученных штаммов относятся к виду *S. cerevisiae*.

5.1.2. Молекулярное кариотипирование

Мы сравнили молекулярные кариотипы 36 спиртовых штаммов. Кариотипические паттерны изучаемых штаммов представлены на рис. 8 и 9. Размеры отдельных хромосомных полос определяли по кариотипу стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, имеющему известные размеры и порядок хромосом. Кариотипический профиль стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295 характеризуется наличием пятнадцати хромосомных полос, две из которых VII и XV мигрируют в одном дублете (рис. 8 и 9, дорожка 1).

Кариотипический анализ подтвердил принадлежность всех изученных штаммов к виду *S. cerevisiae*. В то же время сравнительный анализ паттернов выявил значительный полиморфизм размеров хромосомных полос. Согласно интенсивности окрашивания бромистым этидием, некоторые электрофоретические полосы содержат больше одной хромосомы. Так практически у всех изученных штаммов хромосомы XIII и XVI мигрировали в дуплете. Двойными также были полосы, содержащие пары хромосом V/VIII, VII/XV. У штаммов ВКМ Y-380, ВКМ Y-381, ВКМ Y-1169, ВКМ Y-1812, Г67 (рис. 8, дорожки 8, 9, 12, 13, 16) и ВКПМ Y 563, ВКПМ Y-1330, ВКПМ Y-318, ВКПМ Y-1334, №148, XII₇₋₂ (рис. 9, дорожки 6,

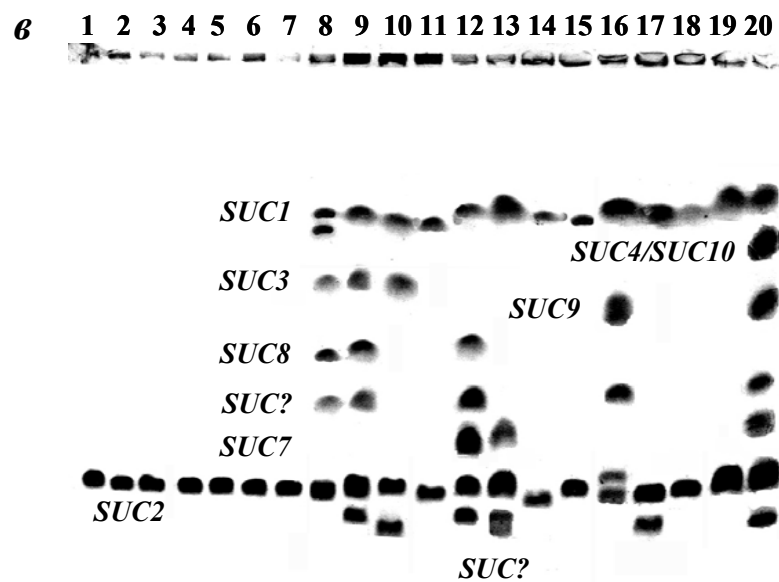
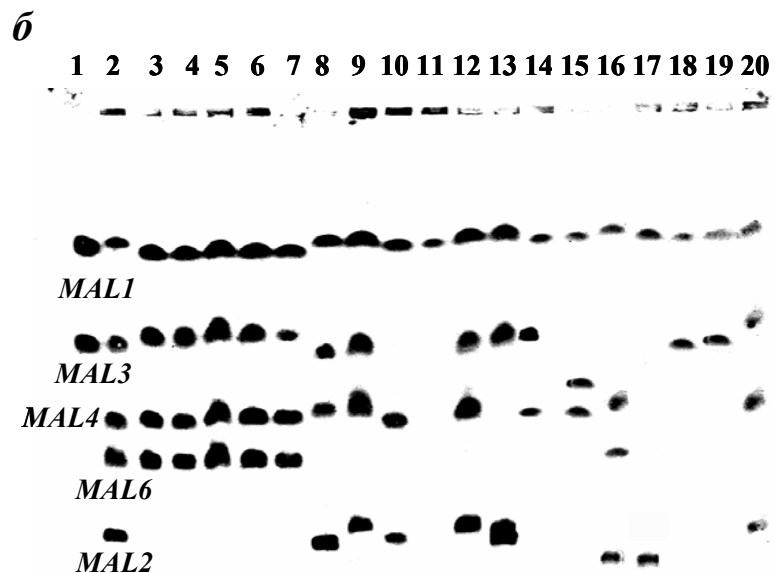
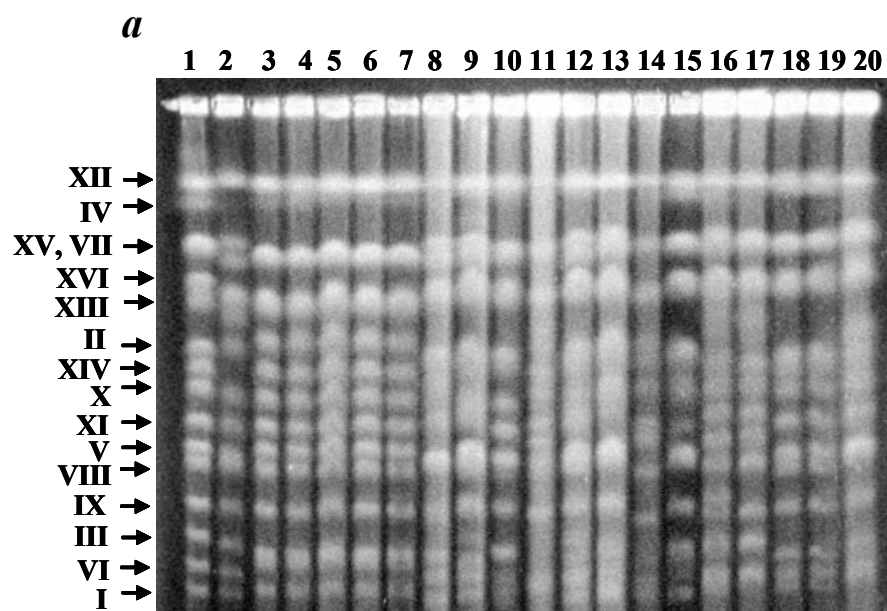


Рис. 8. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, полученных из коллекций ВКМ и ВНИИПБТ (а) и Саузерн-гибридизация с зондами *MAL62* (б) и *SUC2* (в). Дорожки: 1 – YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – ВКМ Y-1830 (б)/X2180-1A (в); 3 - №1; 4 – №2; 5 – №4; 6 – №5; 7 – №6; 8 – ВКМ 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.

10–12, 19 и 20) указанные хромосомы разделились. Шесть штаммов из коллекции ВКМ Y (381, 382, 383, 1169, 1812, 1828), четыре штамма из ВНИИПБТ (В, Г67, Г73, К81) и восемь штаммов из коллекции ВКПМ Y (187, 563, 1330, 318, 1334, 2395, 795, 2080) имеют в своем кариотипе более 16 хромосомных полос. Паттерны этих штаммов характеризуются наличием четырех хромосомных полос размером 245–370 т.п.н., и дополнительных хромосом размером 580–945 т.п.н. (рис. 8, дорожки 9–17, 20 и рис. 9, дорожки 3, 6, 10–12, 14, 16 и 17).

Штаммы Г660 и Г112 имеют практически идентичные кариотипы с 12 хромосомными полосами размером от 245 до 2200 т.п.н. (рис. 8а, дорожки 18 и 19).

Пять штаммов сухих дрожжей (№1, №2, №4–№6) также имеют идентичные кариотипы (рис. 8а, дорожки 3–7). Большое сходство кариотипов этих дрожжей может быть связано с одинаковым источником их выделения (табл.1).

Результаты кариотипического анализа свидетельствуют о значительном хромосомном полиморфизме спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*. Согласно молекулярным кариотипам многие штаммы содержат дополнительные хромосомы и, по-видимому, являются анеуплоидными.

5.2. Саузерн-гибридизация

С помощью Саузерн-гибридизации мы изучили хромосомный полиморфизм генов *SUC*, *MAL* и *MEL* у 36 изученных спиртовых штаммов.

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 *MAL61*(GENE1), мальтазу *MAL62*(GENE2) и регуляторный транскрипционный активатор *MAL63*(GENE3) (Chow et al. 1989). Для ферментации мальтозы необходимо наличие всех трех генов в любом локусе. На рис. 4 представлено строение локуса *MAL6* у дрожжей *S. cerevisiae*.

Хромосомные ДНК штаммов, представленных на рис. 8 и 9, Саузерн-блотом были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану и прогибридизированы с тремя зондами GENE1, GENE2 и GENE3 (рис. 4). У большинства изученных штаммов гибридизационные профили с тремя зондами были идентичными. На рис. 8б и 9б представлены результаты гибридизации с зондом GENE2. В качестве контроля использовали штамм ВКМ Y-1830, обладающий всеми пятью

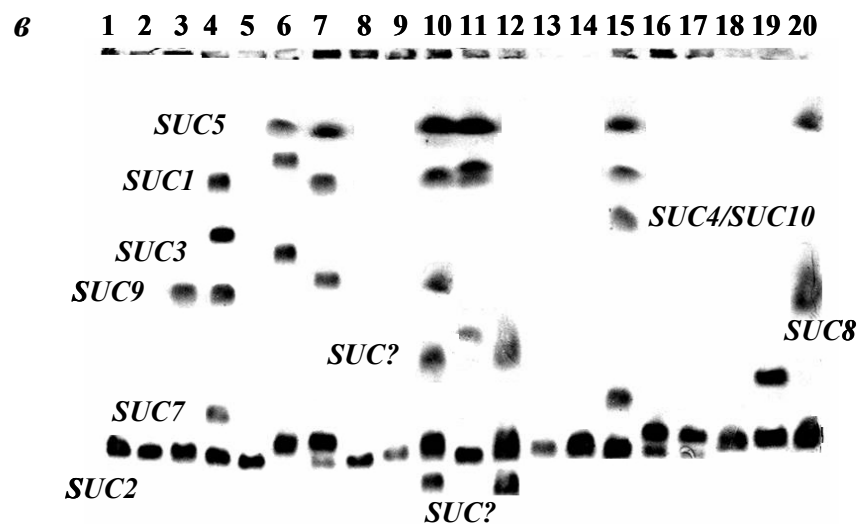
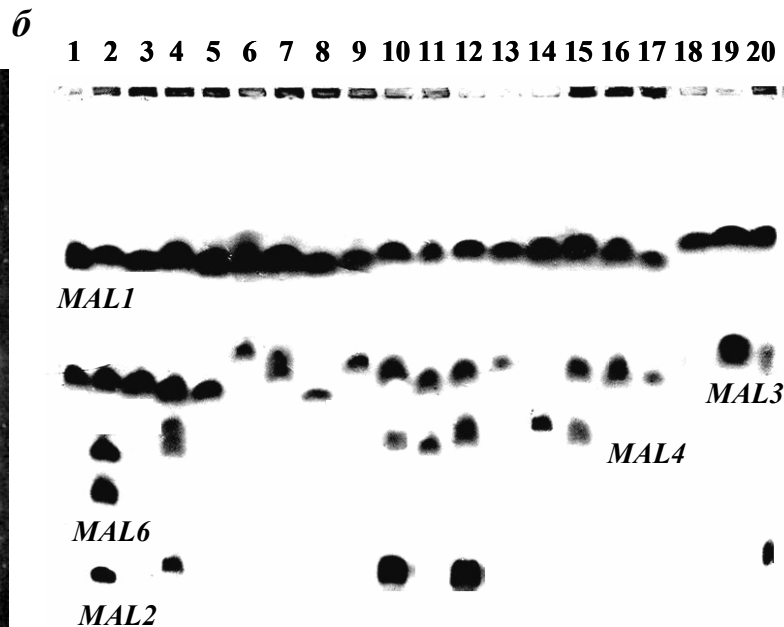
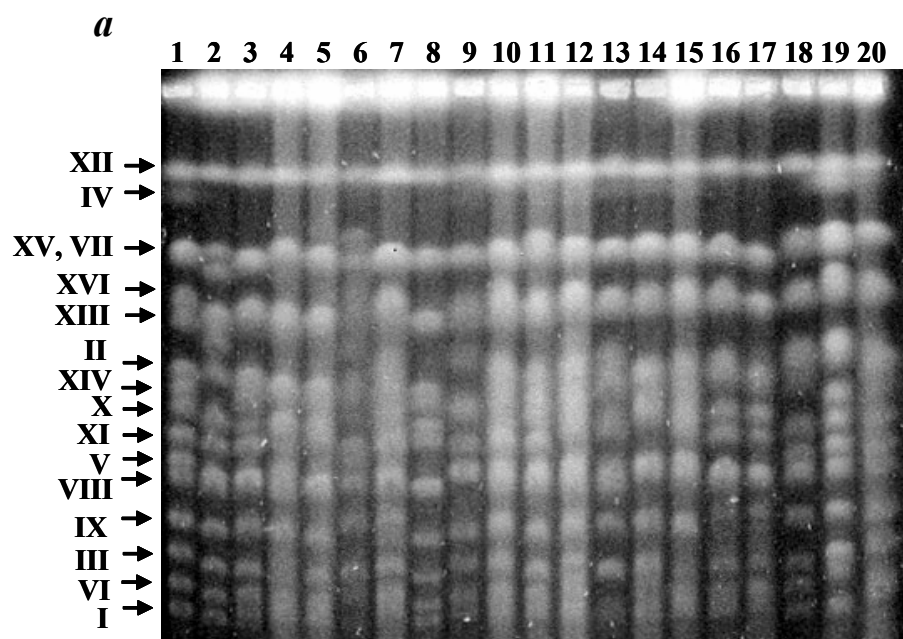


Рис.9. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК дрожжей *S. cerevisiae*, полученных из коллекций ВКПМ (а) и Саузерн-гибридизация с зондами *MAL62* (б) и *SUC2* (в). Дорожки: 1– *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – ВКМ Y-1830 (б)/X2180-1А (в); 3 – ВКПМ Y-187; 4 – ВКПМ Y-408; 5 – ВКПМ Y-480; 6 – ВКПМ Y-563; 7 – ВКПМ Y-564; 8 – ВКПМ Y-622; 9 – ВКПМ Y-626; 10 – ВКПМ Y-1330; 11 – ВКПМ Y-318; 12 – ВКПМ Y-1334; 13 – ВКПМ Y-1693; 14 – ВКПМ Y-2395; 15 – ВКПМ Y-2484; 16 – ВКПМ Y-795; 17 – ВКПМ Y-2080; 18 – ВС-2; 19 – №148; 20 – XII₇-2. Порядок хромосом приведен согласно штамму YNN 295.

известными локусами *MAL*, расположенными в теломерных районах различных хромосом: *MAL1* (хромосома VII), *MAL2* (III), *MAL3* (II), *MAL4* (XI) и *MAL6* (VIII) (рис. 8б и 9б, дорожка 2). Большинство изученных спиртовых штаммов обладают несколькими локусами *MAL*. При этом, локус *MAL1* присутствует у всех изученных штаммов, а 29 штаммов также обладают локусом *MAL3*. Новых локусов *MAL* у изученных штаммов нами не обнаружено. У штаммов Г660, Г112, ВС-2 и №148, которые не способны сбраживать мальтозу, отсутствовала гибридизация с зондом GENE3 (рисунок не приводится).

На рисунках 8в и 9в 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 др. 2010а, б). Саузерн-гибридизация с зондом *SUC2* выявила значительный полиморфизм гибридизационных профилей у изучаемых штаммов (рис. 8в и 9в). У разных штаммов обнаружено от одного до семи гибридизационных сигналов. Все 36 штаммов обладают геном *SUC2*, локализованным в хромосоме IX. Штаммы ВКМ Y-381, ВКМ Y-1812, Г67, Г112, К81 и ВКПМ Y-564, ВКПМ Y-1330, ВКПМ Y-1334, ВКПМ Y-795, ВКПМ Y-2080 имеют по два гибридизационных сигнала в районе хромосомы IX стандартного штамма YNN 295 (рис. 8в, дорожки 9, 13, 16, 19, 20 и рис. 9в, дорожки 7, 10, 12, 16 и 17). У 19 штаммов зонд *SUC2* гибридизовался к хромосоме VII, в которой расположен ген *SUC1* (рис. 8в, дорожки 8–20 и рис. 9в, дорожки 4, 6, 7, 10, 11 и 15). Причем, штамм ВКМ Y-380 обладает дополнительной хромосомой VII (рис. 8в, дорожка 8). У штаммов ВКМ Y-380, ВКМ Y-381, ВКМ Y-1169, Г67, К81 и ВКПМ Y-1330, ВКПМ Y-318, ВКПМ Y-1334 зонд *SUC2* гибридизовался к хромосомной полосе, соответствующей по размеру хромосоме V стандартного штамма YNN 295 (рис. 8в, дорожки 8, 9, 12, 16, 20 и рис. 9в, дорожки 10–12). Указанные восемь штаммов, по-видимому, обладают ранее неизвестным геном *SUC*. Еще один новый ген *SUC*, локализованный в хромосоме VI, обнаружен у штаммов ВКМ Y-381, ВКМ Y-382, ВКМ Y-1169, ВКМ Y-1812, Г73, К81 и ВКПМ Y-1330, ВКПМ Y-1334 (рис. 8в, дорожки 9, 10, 12, 13, 17, 20 и рис. 9в, дорожки 10 и 12). Таким образом, полученные результаты указывают на накопление

полимерных генов *SUC* у спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*.

Известно, что большинство штаммов дрожжей *S. cerevisiae* не сбраживают мелибиозу и даже не имеют молчащей последовательности *MEL* (Naumov et al. 1995 a, b). Из 36 изученных штаммов гибридизационные сигналы с зондом *MEL1* были обнаружены только у 10 штаммов (рис. 10а, дорожки 3–12). В качестве контроля гибридизации был использован штамм *S. cerevisiae* С.В.11, обладающий геном *MEL1*, расположенным в хромосоме II (рис. 10б, дорожка 2).

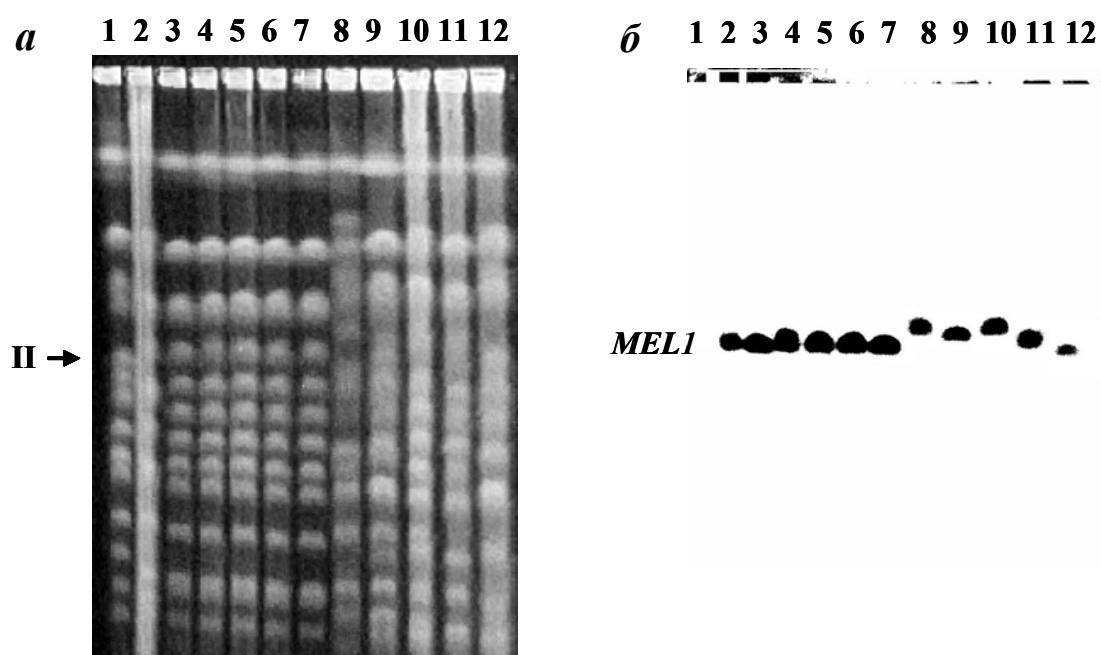


Рис. 10. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК штаммов *S. cerevisiae*, сбраживающих мелибиозу (а) и Саузерн-гибридизация с зондом *MEL1* (б). Дорожки: 1 – *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – С.В.11 (контроль); 3 – №1; 4 – №2; 5 – №4; 6 – №5; 7 – №6; 8 – ВКПМ Y-563; 9 – ВКПМ Y-564; 10 – Г67; 11 – Г73; 12 – К81.

Согласно проведенному анализу, все 10 спиртовых штаммов имеют только один ген *MEL*. У 6 штаммов (№1, №2, №4–№6 и К81) зонд *MEL1* гибридизовался к хромосомной полосе, соответствующей по размеру хромосоме II контрольного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, тогда как у штаммов ВКПМ Y-563, ВКПМ Y-564, Г67 и Г73 гибридизационный сигнал расположен несколько выше (рис. 10б, дорожки 8–11). По-видимому, у последних штаммов хромосома II имеет больший размер, чем у стандартного штамма. Известно, что в результате мейотического кроссинговера могут происходить изменения размеров хромосом. Таким образом,

все 10 спиртовых штаммов обладают только одним α -галактозидазным геном *MEL1*.

5.3. Физиологические особенности изученных штаммов

5.3.1. Ферментация мальтозы, сахарозы и мелибиозы

У изученных штаммов была проверена способность сбраживать сахарозу, мальтозу и мелибиозу. Анализируемые штаммы различались по ферментационным спектрам и скорости сбраживания сахаров (табл. 1). Только 10 штаммов из 36 обладали способностью ферментировать мелибиозу, из них 8 сбраживали этот сахар на первые сутки: №1, №2, №4, №5, №6, ВКПМ У-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 У-408, ВКПМ У-1330, ВКПМ У-1693, ВКПМ У-2395, ВКМ У-380, ВКМ У-383, ВКМ У-1169, ВКМ У-382, ВКМ У-1828 и XII-7), а первые три из приведенного списка через сутки сбраживали и мелибиозу. Все три сахара с разной скоростью ферментировали 10 штаммов: №1, №2, №4, №5, №6, ВКПМ У-563, ВКПМ У-564, Г67, Г73 и К81.

5.3.2. Термоустойчивость

У 36 изученных штаммов была определена способность расти при повышенных температурах. Все штаммы 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 У-187, ВКПМ У-564, ВКМ У-380, ВКМ У-1812 и XII-7. Указанные штаммы были проверены на способность расти при температуре 40°C после теплового шока в 46°C, а так же при температурах 42°C и 44°C, после теплового шока 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 температуре выше 40°C.

5.3.3. Ферментационная активность

По результатам ферментационных тестов, Саузерн-анализа и тестов на термоустойчивость отобраны штаммы, сбраживающие сахарозу и мальтозу, и устойчивые к повышенным температурам, у которых была определена интенсивность ферментации в жидкой среде УР с 2%-ной глюкозой (рис. 11).

Интенсивность брожения определяли у 10 штаммов по количеству выделенного углекислого газа, так называемым весовым методом.

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 XII₇-2. Указанные семь штаммов показали наилучшие результаты и через 72 часа. Выделяются четыре штамма, обладающие хорошей ферментационной активностью: ВКПМ Y-187, №5, XII₇-2 и Г67 (рис. 11). Следует отметить, что последний штамм обладает полимерными генами *MAL* и *SUC*, а также геном *MEL1* (рис. 8, дорожки 16, 10 и рис. 9, дорожка 10). В то же время, ни один из изученных спиртовых штаммов не способен расти при температуре выше 40°C. Поэтому была поставлена задача поиска термоустойчивых штаммов *S. cerevisiae*.

5.4. Селекция спиртовых штаммов дрожжей *S. cerevisiae*

5.4.1. Скрининг термоустойчивых штаммов

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 эти штаммы представлены фертильными моноспоровыми культурами. Их видовая принадлежность была ранее установлена в нашей лаборатории на основании генетического анализа (Naumov et al. 2001b; Наумов и Наумова 2011). Все изученные штаммы были оттестированы по способности расти при повышенных температурах. Из 42 штаммов 16 хорошо росли при 42°C (табл. 3). Для штаммов CBS 7961, CBS 7962, U23, S8BM-32 и S11F3 было использовано по несколько сегрегантов. В результате 24 моноспоровые культуры были проверены на способность расти при температурах 42°C и 43°C после теплового шока, соответственно, в 48°C и 49°C. Хороший рост при 42°C отмечен у штаммов 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. Все 10 указанных штаммов сбраживали сахарозу через сутки, а последние шесть также сбраживали мальтозу. При 43°C рост отмечен только у двух 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.

У 10 штаммов, растущих при 42°C после теплового шока, была определена

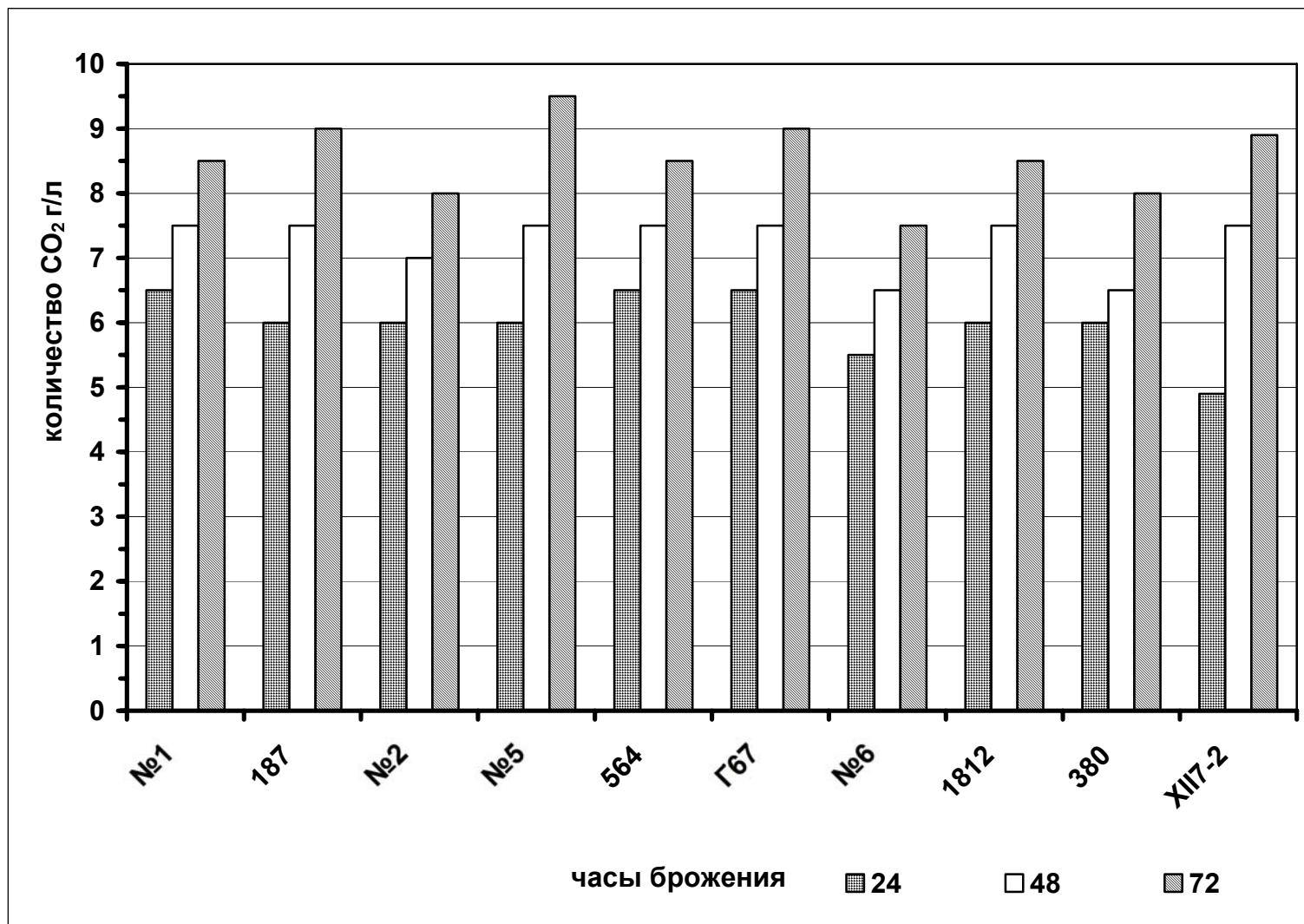


Рис. 11. Интенсивность брожения спиртовых штаммов *S. cerevisiae*. Скорость сбраживания 2% глюкозы определяли по количеству выделяемого углекислого газа через 24, 48 и 72 часа.

Таблица 3. Термоустойчивые штаммы дрожжей *S. cerevisiae* и их происхождение

Исходный штамм	Моноспорная культура	Источник и место выделения
1	2	3
CBS 7961	7961-1D 7961-2B	Бродящий сконцентрированный сироп из сахарного тростника, Бразилия, Сан Пауло
CBS 7962	7962-4B, 7962-4-4	Тоже
JSM 2985	JSM 2985-4B	Ферментированная рыба, Тайланд
JSM 3529	JSM 3529-7B	Ферментированная креветка, Тайланд
ATCC 52922-4-1-1A	ATCC 52922-4-1-1A:-1C	Рисовое вино Тапуи, Филиппины
UWO (PS) 87-2421.1	87-2421.1-2A	<i>Opuntia megocantha</i> , Гавайи
T6	T6-2B	Бродящее виноградное сусло, Таджикистан
T8	T8-12B	Тоже
UWO (PS) 83-787	83-787-3	<i>Opuntia stricta</i> , остров Грейт-Инагуа, Багамы
CBS 2888	2888-2A	Почва, Южная Африка
ATCC 66348	66348-1D	Почва, Япония
U23	23-1B, 23-11A, 23-11B	Бродящее виноградное сусло, Узбекистан
S11F3	F3-6A, F3-6B, F3-6D	Сокотечение винной пальмы <i>Caruyota urens</i> , Шри-Ланка
S8BM-30	BM-30-2D	Тоже
S8BM-32	BM-32-4C, BM-32-4D	Тоже
CBS 4734	4734-7-1	Сахарный тростник, Бразилия
XII раса	XII ₇ -2	Инбредная линия спиртовой расы XII
Межштаммовые гибриды		
Гибриды	Происхождение	
H1-1	3529-7B x XII ₇ -2	
H1-2		
H2-1	87-2421.1-2A x XII ₇ -2	
H3-1	7962-4B x XII ₇ -2	
H3-2		
H4-1	52922-4-1-1A:-1C x XII ₇ -2	

интенсивность ферментации в жидкой среде УР с 2%-ной глюкозой (рис. 12). Скорость сбраживания глюкозы определяли по количеству выделенного углекислого газа в течение 72 часов. На первые сутки наиболее интенсивное брожение отмечено у штаммов 7962-4В, 52922-4-1-1А:-1С, 87-2421.1-2А и Т8-12В. На вторые сутки интенсивное брожение было так же отмечено у моноспоровых культур 3529-7В, 2985-4В и 83-787-3.

5.4.2. Межштаммовые гибриды *S. cerevisiae*

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) были отобраны четыре спиртовых (ВКПМ У-187, №5, XII₇ и Г67) и четыре термоустойчивых (7962-4В, 3529-7В, 52922-4-1-1А:-1С и 87-2421.1-2А) штамма. Все указанные термоустойчивые штаммы обладают высокой выживаемостью 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>). Спиртовая раса XII и ее моноспоровая культура XII₇-2 обладают тремя полимерными β-фруктозидазными генами – *SUC2*, *SUC5* и *SUC8* (Наумов и Наумова 2010 а) и способны расти при 40°C. В межштаммовых скрещиваниях в качестве второго родителя была использована моноспоровая культура спиртовой расы XII₇-2. Между термоустойчивыми штаммами и спиртовой расой в нашей лаборатории были получены следующие гибриды: 3529-7В x XII₇-2 (Н1-1, Н1-2), 87-2421.1-2А x XII₇-2 (Н2-1), 7962-4В x XII₇-2 (Н3-1, Н3-2) и 52922-4-1-1А:-1С x XII₇-2 (Н4-1). Гибриды были получены методом “спора-на-спору” (Наумов и др. 1986). Шесть полученных гибридов были изучены по способности расти при повышенных температурах (рис. 13). В отличие от спиртовой расы, все гибриды давали хороший

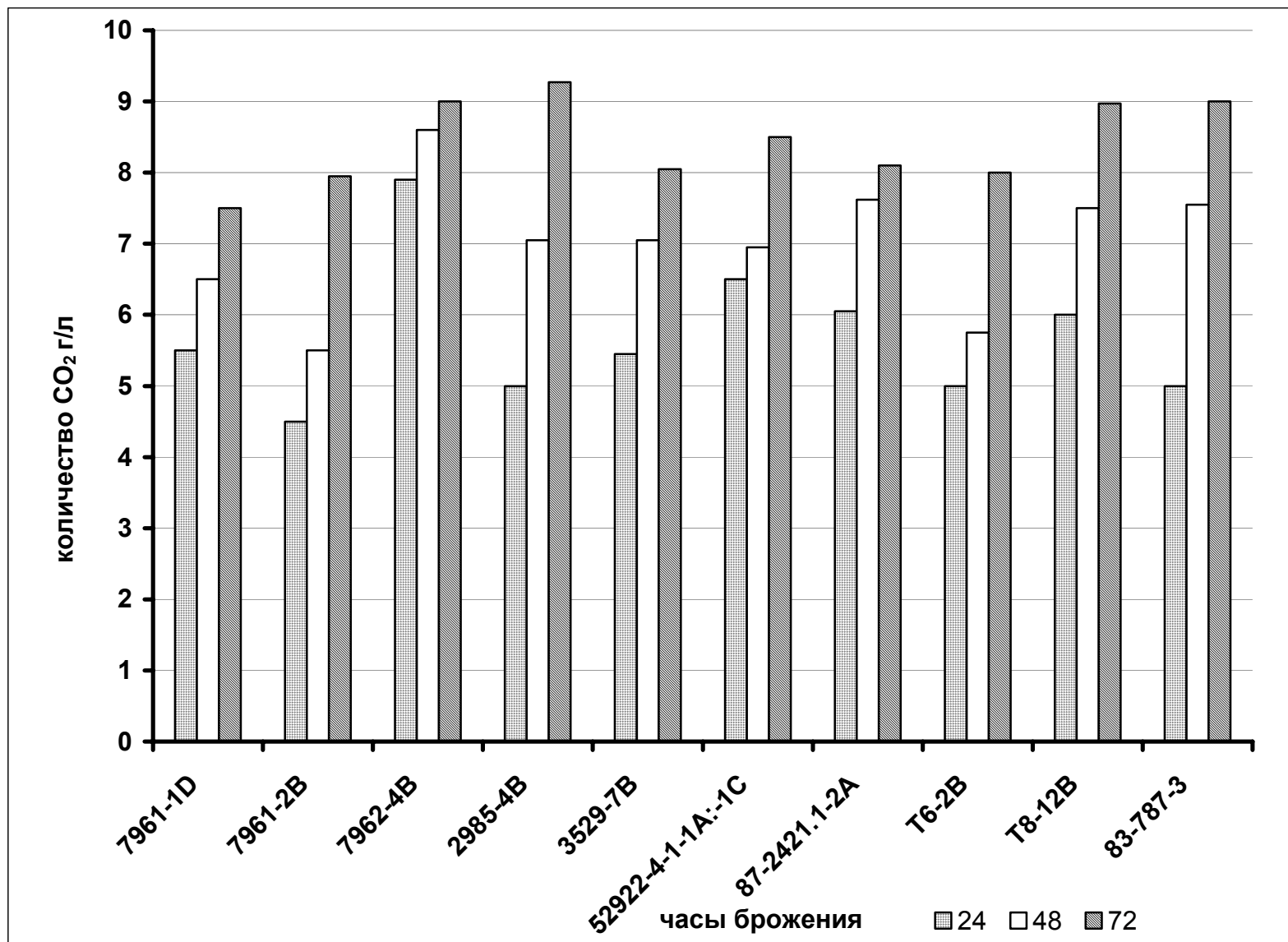


Рис. 12. Интенсивность брожения термоустойчивых штаммов дрожжей *S. cerevisiae*. Скорость сбраживания 2% глюкозы определяли по количеству выделяемого углекислого газа через 24, 48 и 72 часа.

рост при температуре 42°C, что может указывать на доминантное наследование признака термоустойчивости у штаммов 7962-4В, 3529-7В, 52922-4-1-1А:-1С и 87-2421.1-2А. По-видимому, благодаря эволюционной адаптации, эти штаммы способны выживать в экстремальных условиях в регионах с жарким климатом, в которых температура может превышать 35°C, при которой ингибируется рост обычных штаммов *S. cerevisiae*. При 43°C росли гибриды Н2-1 и Н4-1 (рис. 13, 3 и 6). Слабый рост также отмечен у гибрида Н1-1 (рис. 13, 1). Следует отметить, что родительские штаммы последнего гибрида (3529-7В и XII₇-2) не способны расти при 43°C (рис. 13, 9 и 11).

На рисунке 14 представлена ферментационная активность полученных гибридов и родительских штаммов. Полученные гибриды существенно различались по интенсивности ферментации глюкозы. Гибриды 3529-7В x XII₇-2 (Н1-1, Н1-2), бродили на первые сутки активнее, чем родительские штаммы. Однако на третьи сутки их ферментационная активность была существенно ниже, чем у спиртовой расы XII₇-2. Гибрид Н4-1 имел такую же ферментационную активность, как моноспоровая культура XII₇-2 (рис. 14), при этом был способен расти при 43°C как родительский штамм 52922-4-1А (рис. 13, 6 и 7). Наибольшую ферментационную активность имеют гибриды Н2-1, Н3-2 с участием термоустойчивых штаммов, соответственно, 87-2421-2А и 7962-4В (рис. 14). Первый гибрид рос при 43°C (рис. 13, 3). Второй гибрид с участием штамма 7962-4В (Н3-1) рос при 42°C (рис. 13).

5.5. Обсуждение

Изучены молекулярно-генетические и физиологические особенности спиртовых штаммов *S. cerevisiae*. Согласно кариотипическому анализу многие штаммы, вероятно, являются анеуплоидными. Обнаружено накопление полимерных генов *SUC* и *MAL* у спиртовых штаммов *S. cerevisiae*. Накопление полимерных генов ферментации сахаров может иметь адаптивное значение и приводить к увеличению ферментационной активности штаммов.

Из 36 изученных спиртовых штаммов были отобраны четыре, которые способны расти при 40°C и обладают хорошей ферментационной активностью: ВКПМ У-187, №5, XII₇ и Г67. Скрининг дрожжей *S. cerevisiae*, выделенных в

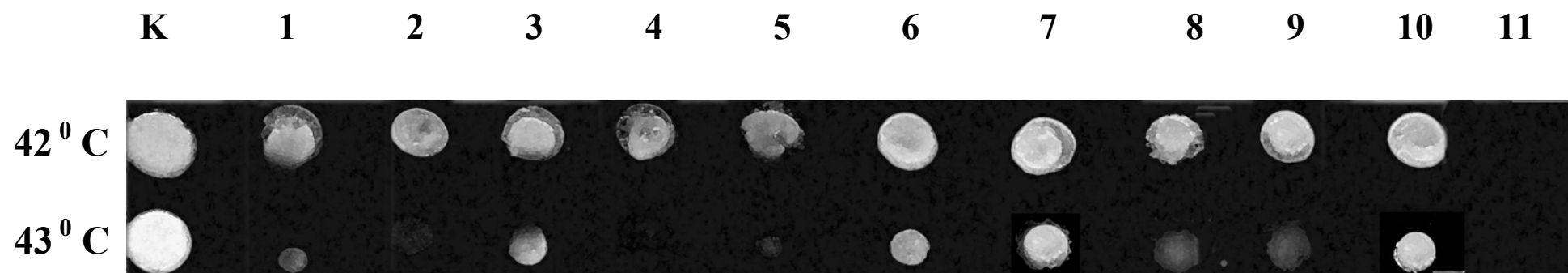


Рис. 13. Способность межштаммовых гибридов и родительских штаммов *S. cerevisiae* расти при температурах 42⁰С и 43⁰С. 1 – Н1-1; 2 - Н1-2; 3 – Н2-1; 4 – Н3-1; 5 – Н3-2; 6 – Н4-1; 7 – 52922-4-1-1А; 8 – 7962-4В; 9 – 3529-7В; 10 – 87-2421.1-2А; 11 – ХП7-2. К – контрольный штамм *Ogatae parapolyomorpha* 1-IR, способный расти при 48⁰С.

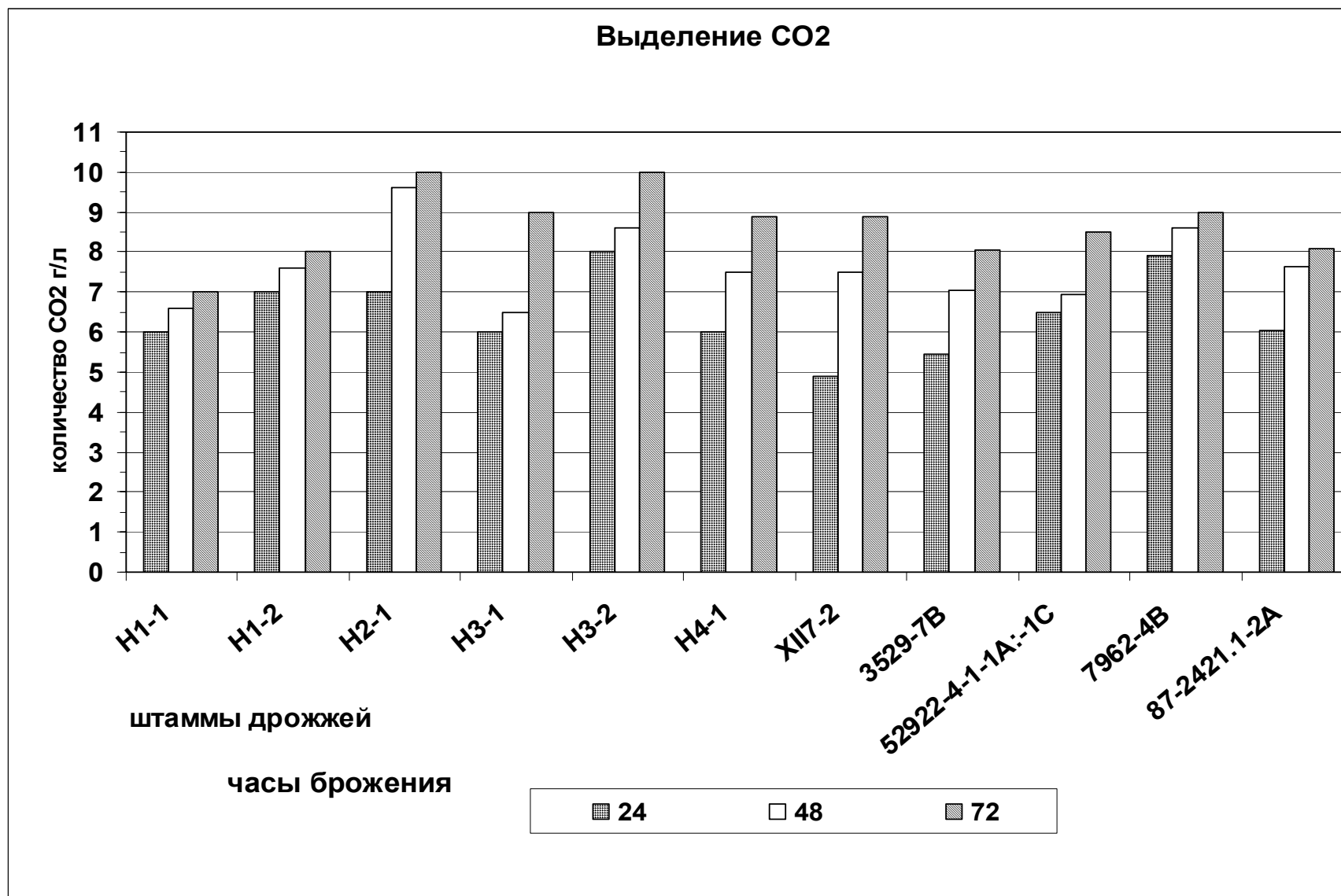


Рис. 14. Ферментационная активность межштаммовых гибридов и родительских штаммов *S. cerevisiae*. Скорость сбраживания 2% глюкозы определяли по количеству выделяемого углекислого газа через 24, 48 и 72 часа.

странах с жарким климатом, позволил отобрать штаммы, сочетающие термоустойчивость (рост при 42°C и 43°C) с хорошей ферментационной активностью.

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

ГЛАВА 6. 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 2010a,b). Ген *SUC2*, или его нефункциональный аллель *suc2⁰*, имеется у всех изученных природных и индустриальных штаммов *S. cerevisiae* (Carlson & Botstein 1983; Naumov et al. 1992; Naumov et al. 1996c; 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. 1996c; Ness & Aigle 1995; Denayrolles et al. 1997; Наумова и др. 2013).

Большинство изученных нами спиртовых штаммов *S. cerevisiae*, помимо гена *SUC2*, обладали дополнительными теломерными генами *SUC1*, *SUC3–SUC5*, *SUC7–SUC10* в различных комбинациях (рис. 15). На материале штаммов различного происхождения мы провели сравнительный анализ β-фруктозидазных генов *SUC* дрожжей *Saccharomyces*.

6.1. Хромосомный полиморфизм генов *SUC*

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. На рис. 16 представлены молекулярные кариотипы и гибридизационные профили различных видов рода *Saccharomyces*. Отдельные хромосомные полосы идентифицировали по кариотипу стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, имеющего известные размеры и порядок хромосом (рис. 16а, дорожка 1).

У дрожжей *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus* обнаружена только одна гибридизационная полоса, соответствующая по размеру

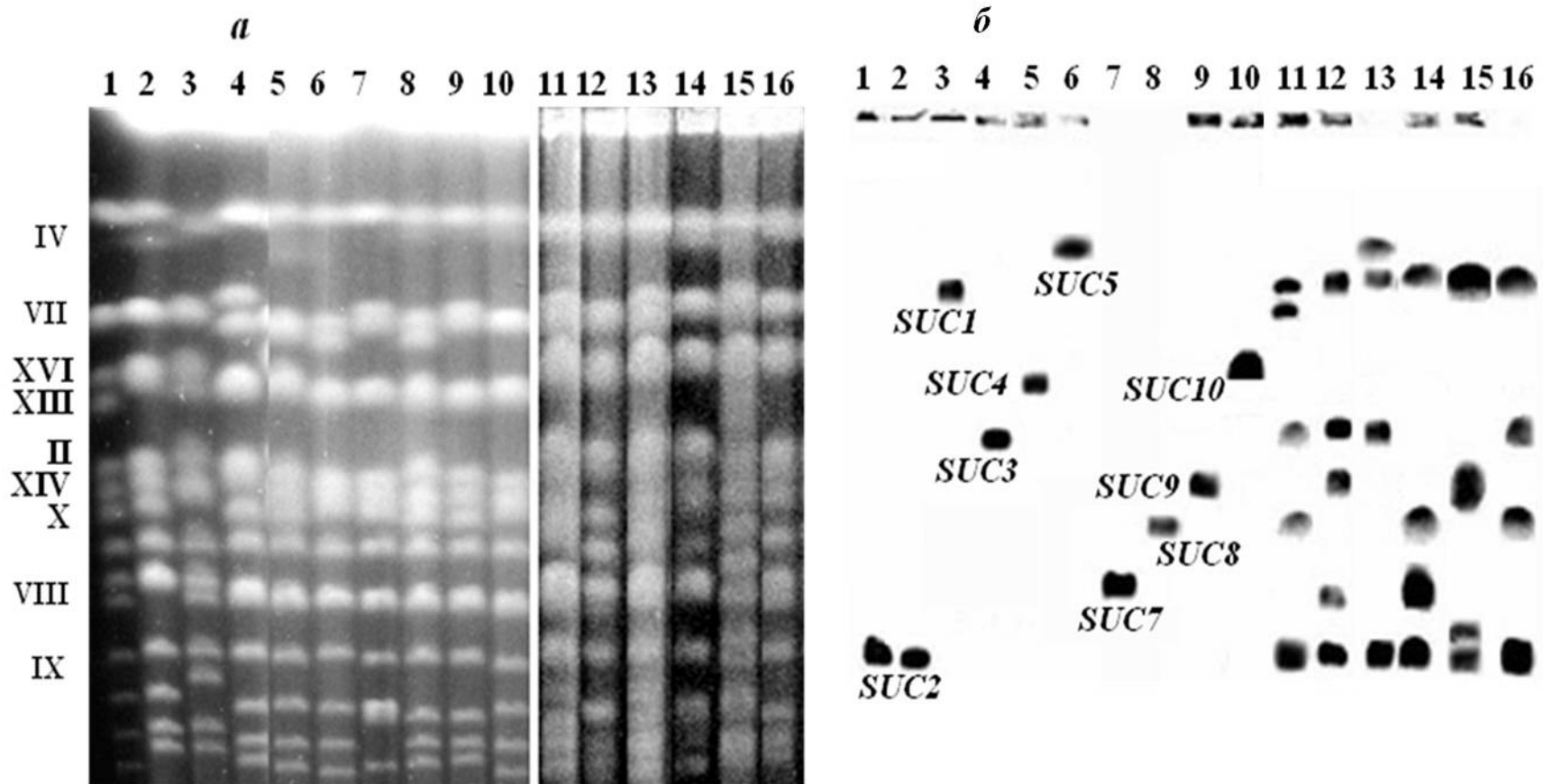


Рис. 15. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК дрожжей *S. cerevisiae* с зондом *SUC2*. Римскими цифрами указана нумерация хромосом, которая соответствует нумерации в стандартном штамме *S. cerevisiae* YNN 295. 1 – YNN 295; 2 – S288C; 3 – SH4 108-2D (*SUC1*); 4 – SH4.107-1A (*SUC3*); 5 – SH4 1.82.-2B (*SUC4*); 6 – S51-6D (*SUC5*); 7 – S22-6A (*SUC7*); 8 – S0-2A (*SUC8*); 9 – S20-6A (*SUC9*); 10 – S101-4A (*SUC10*); 11 – ВКМ Y-380; 12 – ВКПМ Y-408; 13 – ВКПМ Y-563; 14 – ВКМ Y-1169; 15 – Г67; 16 – ВКМ Y-381.

хромосоме IX стандартного штамма *S. cerevisiae* YNN 295, в которой расположен ген *SUC2* (рис. 16б, дорожки 3, 5–11). Ген *SUC2*, очевидно, является исходным (предковым), а теломерные гены *SUC* произошли от него (Carlson & Botstein 1983; Carlson & Celenza 1985). Единственный ортолог упомянутых пяти видов *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus*, по-видимому, представлен геном *SUC2*. У *S. cariocanus* гибридизационный сигнал расположен значительно выше, чем у остальных штаммов (рис. 16б, дорожка 4) в районе хромосомы XV стандартного штамма YNN 295 (рис. 16а). Известно, что молекулярный кариотип дрожжей *S. cariocanus* характеризуется наличием четырех реципрокных транслокаций, затрагивающих восемь из 16 хромосом (Fischer et al. 2000). Принимая во внимание, что одна из этих транслокаций затрагивает хромосомы IX и XV, можно предположить, что единственный β -фруктозидазный ген *S. cariocanus* также является *SUC2*.

Дополнительно к 36 спиртовым штаммам с помощью Саузерн-гибридизации было изучено более 100 штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, выделенных из промышленных ферментаций (хлебопечения, пивоварения, виноделия и др.) и из природных источников. Независимо от происхождения и способности ферментировать сахарозу, все изученные штаммы имели ген *SUC2*, расположенный в хромосоме IX. 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. Определение хромосомной локализации полимерных генов *SUC* у спиртовых штаммов мы проводили при помощи сконструированных ранее (Наумов и др. 2010 а, б) стандартных штаммов *S. cerevisiae*, каждый из которых обладает только одним теломерным геном *SUC* и имеет делецию гена *SUC2* (рис. 15б, дорожки 3–10).

Из восьми известных субтеломерных генов *SUC*, у спиртовых штаммов наиболее часто встречаются гены *SUC1*, *SUC3*, *SUC7* и *SUC9* (рис. 15б, дорожки 11–16).

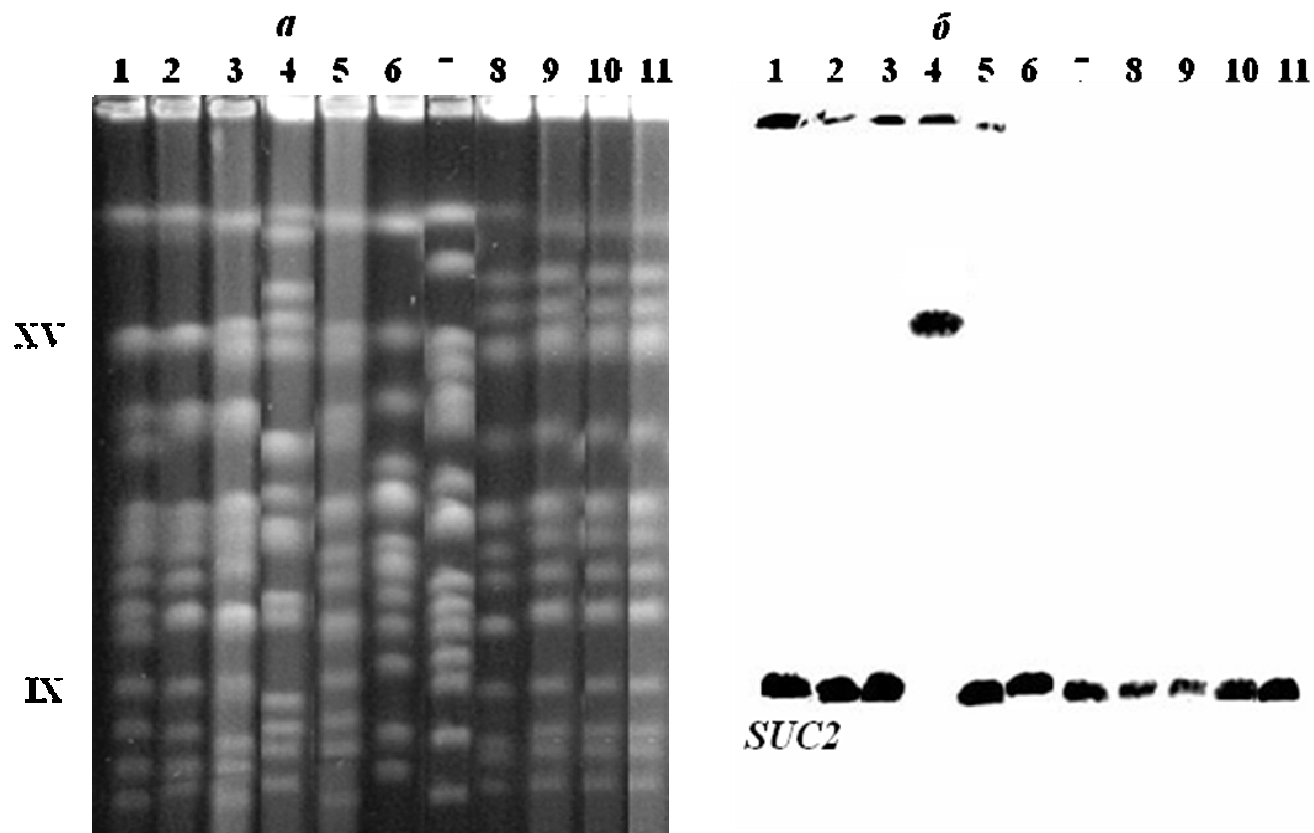


Рис. 16. Пульс-электрофорез (а) и Саузерн-гибридизация (б) хромосомной ДНК видов рода *Saccharomyces* с зондом *SUC2* *S. cerevisiae*. Римскими цифрами указана нумерация хромосом, которая соответствует нумерации в стандартном штамме *S. cerevisiae* YNN 295. 1 – *S. cerevisiae* YNN 295; 2 – *S. cerevisiae* 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.

6.2. Нуклеотидный полиморфизм генов *SUC* дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*

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* опубликованы (Hohmann & Gozalbo 1988). Мы определили последовательности остальных шести теломерных генов *SUC*.

При помощи праймеров SD1 и SR из ДНК штаммов SH4.107-1A, S51-6D, S22-6A, SO-2A, S20-6A и S101-4A были амплифицированы ПЦР-фрагменты, соответствующие генам *SUC3*, *SUC5*, *SUC7*, *SUC8*, *SUC9* и *SUC10*, длиной 1542 п.н., что покрывает большую часть кодирующей области генов *SUC*. Сравнение 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 теломерных генов *SUC* составляет не более 94.8%. Ранее также было показано большое сходство (более 99%) промоторных областей генов *SUC3*, *SUC4*, *SUC5* и *SUC7* (Hohmann & Gozalbo 1988).

В базе данных GenBank имеются нуклеотидные последовательности генов *SUC2* штаммов *S. cerevisiae*, выделенных из промышленных ферментаций и из природных источников в различных регионах мира. Гены *SUC2* из 17 штаммов *S. cerevisiae* различного происхождения (табл. 1) сходны на 98.9–100%. Филогенетическое древо (рис. 17) включает имеющиеся в базе данных GenBank последовательности генов *SUC* штаммов *S. paradoxus* (табл. 1). Следует отметить, что *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* – наиболее близкородственные виды рода *Saccharomyces* (Naumov et al. 2000a; Kellis et al. 2003; Liti et al. 2013). Распределение последовательностей *SUC* между двумя кластерами соответствует

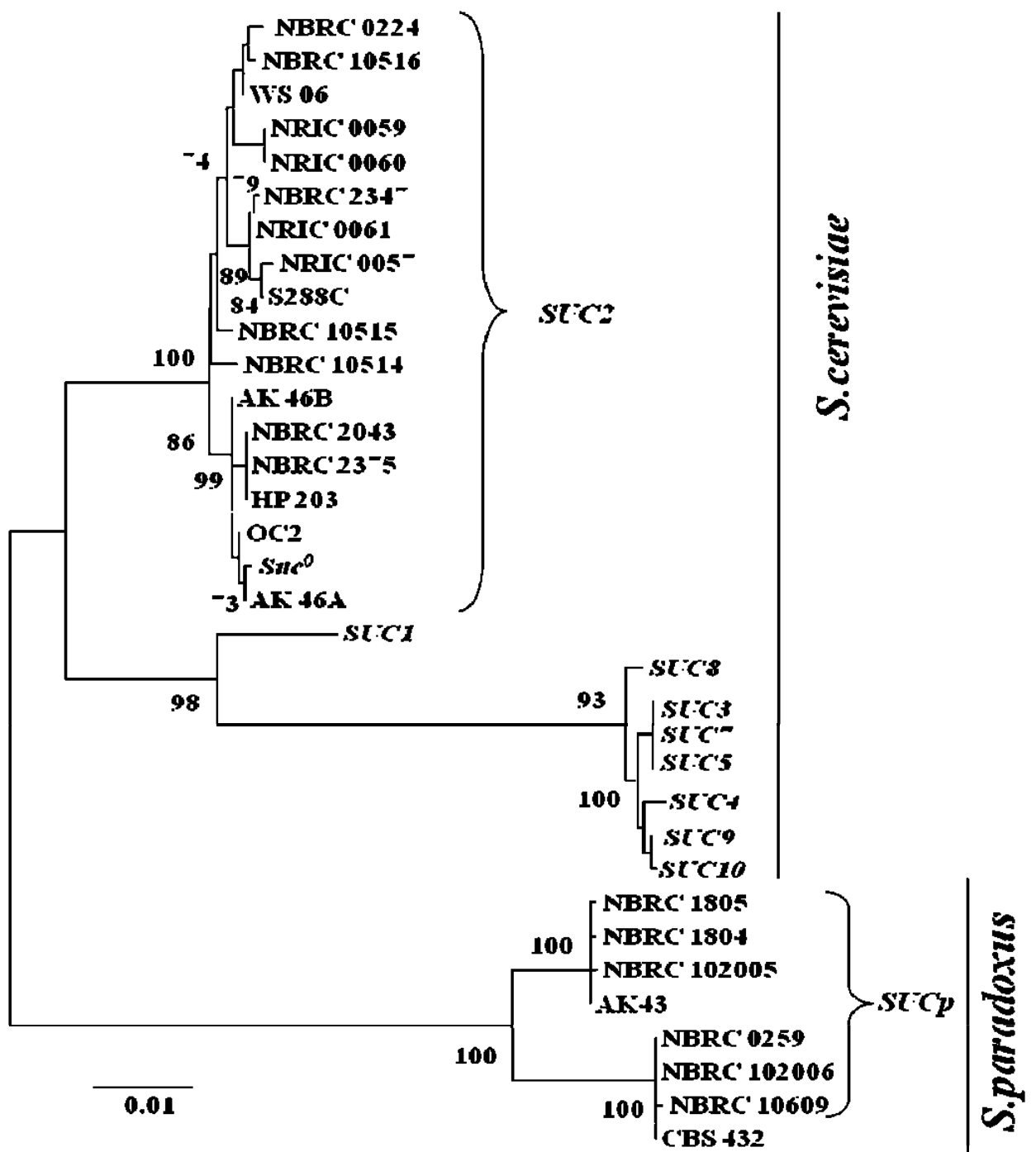


Рис.17. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *SUC* дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 10 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. NJ-Дерево построено с использованием программного пакета MEGA5. Штаммы, обладающие единичными генами *SUC1*, *SUC3*, *SUC4*, *SUC5*, *SUC7*, *SUC8*, *SUC9* или *SUC10*, приведены в табл. 1.

видовой принадлежности штаммов по другим маркерам (в основном – по рибосомным генам) (рис. 17). В первом кластере, включающем гены *SUC* дрожжей *S. cerevisiae*, выделяются две группы. Одна из них представлена генами *SUC2*, а вторая – восемью теломерными генами. Нуклеотидные последовательности генов *SUC2* различных штаммов *S. cerevisiae* и теломерных генов *SUC* сходны на 92.3–95.6%. Наиболее сходен с генами *SUC2* теломерный ген *SUC1*: 95.4–95.6%.

Во втором кластере объединены гены *SUCp* дрожжей *S. paradoxus*, нуклеотидные последовательности которых сходны на 97.6–100% (рис. 17). В этом кластере выделяются две подгруппы, соответствующие географическому происхождению штаммов (табл. 1). Уровень сходства генов *SUCp* штаммов *S. paradoxus*, изолированных в Дальневосточной Азии и других регионах мира, составляет 97.6–97.8%.

6.3 Нуклеотидная последовательность гена *SUCa* дрожжей *S. arboricola*

Определена нуклеотидная последовательность генов *SUCa* у штаммов *S. arboricola* CBS 10644 и TJ14M01 различного происхождения (табл. 1). Они идентичны и сходны с последовательностями генов *SUC* других видов *Saccharomyces* на 83.6–86.0%. Наименьший уровень сходства наблюдается при сравнении с теломерными 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 показывает, что в них нет делеций и вставок и что транзиций больше, чем трансверсий. Значения коэффициента, выражающего соотношение транзиций и трансверсий в генах *SUC* разных видов дрожжей *Saccharomyces*, составляет от 2.13 до 3.34. В последовательностях генов *ARG4*, *MRS1* и *NAM2* дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* транзиций в три раза больше чем трансверсий, и это, по мнению авторов, может свидетельствовать о недавней дивергенции этих видов (Delorme et al. 1988; Herbert et al. 1988; Herbert et al. 1992; Adjiri et al. 1994). Несколько меньшее соотношение транзиций и трансверсий в генах *SUC* может быть связано с более ранней их дивергенцией по сравнению с генами *ARG4*, *MRS1* и *NAM2*. Следует также отметить более низкий уровень сходства генов *SUC* по сравнению

со сходством генов *EF-1 α* и *RPB1* дрожжей *Saccharomyces* (Kurtzman & Robnett 2003; Oda et al. 2010).

Анализ спектра нуклеотидных замен показал, что наиболее часто встречаются транзиции типа С→Т, большинство из которых (80–89%) расположено в третьем положении кодона. Сходные результаты получены ранее при сравнении кодирующих областей генов *SUC1*, *SUC2* и *SUC4* дрожжей *S. cerevisiae* (Hohmann & Gozalbo 1989). Транзиции в третьем положении кодона, за исключением кодонов TGA→TGG и ATG→ATA, молчащие, т.е. 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*.

6.4. 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. 18), в качестве внешней группы использовали β -фруктозидазу (инулиназу) дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Все изученные β -фруктозидазы дрожжей *Saccharomyces* образовали отдельный кластер относительно внешней группы. Внутри этого кластера выделяются три группы штаммов. В первую входят последовательности SUC2 различных штаммов *S. cerevisiae* идентичные на 98.8–100%. Вторую группу образуют белки SUC1, SUC3, SUC4, SUC5 и SUC7–SUC10 с уровнем сходства 95.2–100%, причем последние семь практически идентичны (99.2–100%). К первым двум группам примыкает β -фруктозидаза SUCc дрожжей *S. cariocanus*. В третью группу входят белки SUCp дрожжей *S. paradoxus*,

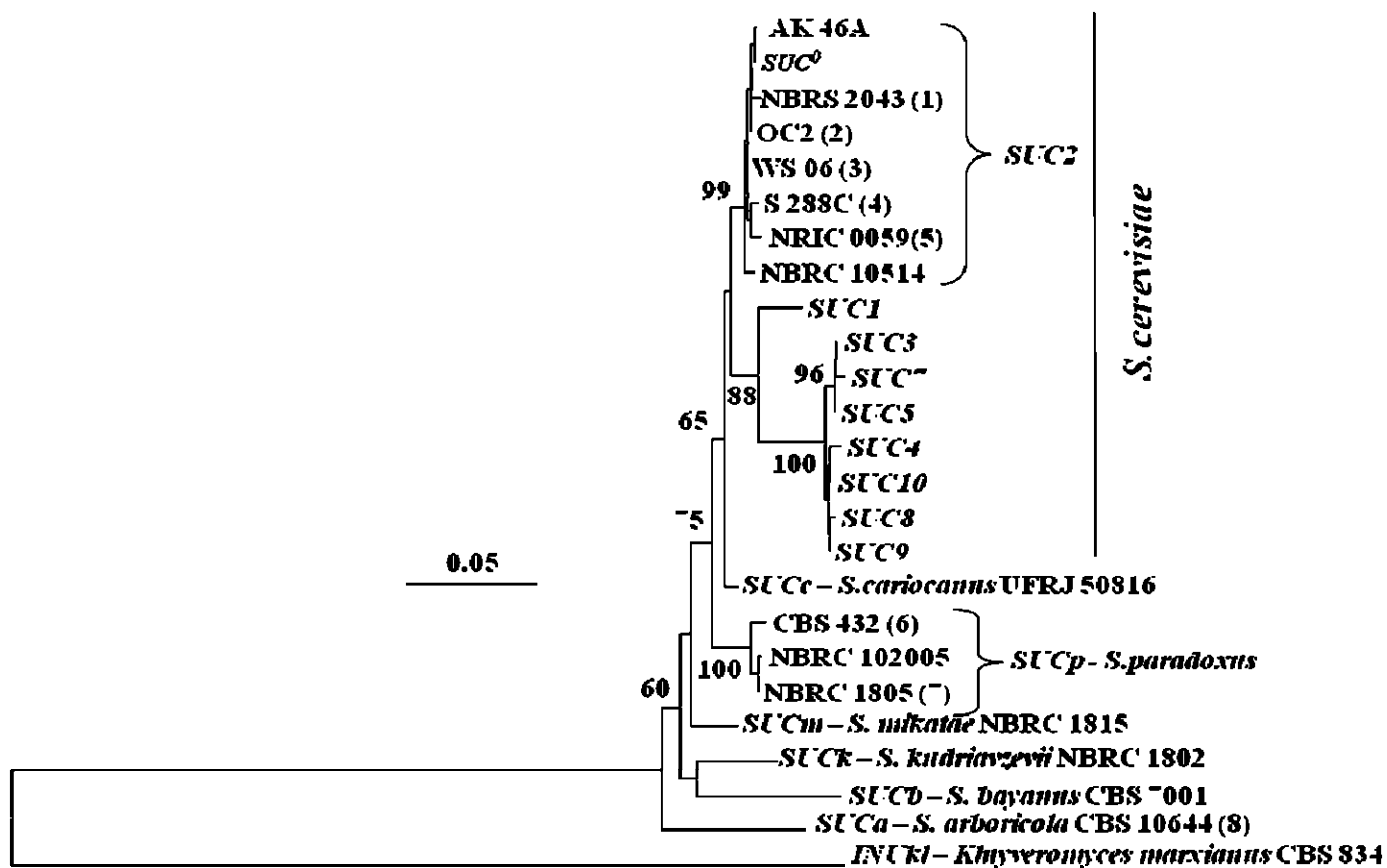


Рис. 18. Филогенетическое древо аминокислотных последовательностей β -фруктозидаз дрожжей рода *Saccharomyces*. В качестве внешней группы использована β -фруктозидаза *INUk1* дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приводятся значения бутстрепа >60%. Шкала соответствует 50 аминокислотным заменам на 1000 аминокислотных 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. NJ – Древо построено с использованием программного пакета MEGA5.

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*. Как показано ранее, указанные виды наиболее дивергированы в роде *Saccharomyces* также и по рибосомным генам (Naumov et al. 2010). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о видоспецифичности генов SUC дрожжей *Saccharomyces*.

6.5. Обсуждение

Для изучения молекулярного полиморфизма генов SUC, кодирующих β -фруктозидазу у дрожжей рода *Saccharomyces*, сравнивали нуклеотидные последовательности субтеломерных генов SUC3, SUC5, SUC7, SUC8, SUC9, SUC10 дрожжей *S. cerevisiae* и гена SUCa дрожжей *S. arboricola*, а также некоторых опубликованных ранее нуклеотидных последовательностей других генов SUC. Анализ спектра нуклеотидных замен показал, что преобладают молчащие транзиции C \rightarrow T, более 80% которых расположено в третьем положении кодона. Выведенные на основании этих последовательностей аминокислотные последовательности β -фруктозидаз сходны на 88–100%. Наиболее дивергированы белки SUCa (*S. arboricola*) и SUCb (*S. bayanus*), уровень сходства которых с остальными белками SUC не превышает 92%. 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 доместикации.

ГЛАВА 7. МОЛОЧНЫЕ ДРОЖЖИ-ПРОБИОТИКИ РОДА *KLUYVEROMYCES*

Дрожжи *Kl. marxianus* и *Kl. lactis* являются одними из немногих микроорганизмов, которые способны гидролизовать и утилизировать молочный сахар лактозу. Штаммы этих видов являются компонентами микрофлоры молочных продуктов и отходов молочного производства – молочной сыворотки.

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

7.1. Молекулярная идентификация штаммов

Объектом исследования служили штаммы, выделенные из различных кисломолочных продуктов в разных регионах России и стран СНГ (табл. 2). Большинство изученных штаммов были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под следующими видовыми названиями: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygothospora krassilnikovii*, *Zygothospora marxiana*, *Fabospora fragilis*. Наиболее полно эти штаммы представлены в каталоге (Кудрявцев 1976), а их первичное описание дано в определителе (Кудрявцев 1954). Принимая во внимание современную классификацию дрожжей *Kluyveromyces* (Lachance 2011), сначала 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 (рис. 19). Для выяснения таксономического положения исследуемых дрожжей мы провели ПЦР-анализ с последующей ПДРФ-рестрикцией. Для подбора эндонуклеаз мы сравнили рестрикционные карты нуклеотидных последовательностей 5.8-ITS-района рДНК типовых культур *Kl. marxianus* CBS 712 и *Kl. lactis* ВКМ Y-868 (рис. 19). Наиболее четко указанные виды можно дифференцировать ПДРФ-анализом 5.8-ITS-фрагментов с помощью эндонуклеазы *Hind*III. В 5.8-ITS-участке дрожжей *Kl. marxianus* имеется *Hind*III-сайт рестрикции (a/agctt), в то время как у *Kl. lactis* он

CBS 712	AAGATTATGAATGA AT AGATTAC T GGGGGAATCG T CTGAAC CA AGGCCTGCGCTTAATTGC 60
BKM Y-868 G-..... T.T
CBS 712	GCGGCC AG TTCTTGATT CT CTGCTATCAGTTTTCT AT TTCTCATCCTAAACACAATGGAG 120
BKM Y-868 T.A T T.C
CBS 712	TTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAA 180
BKM Y-868
CBS 712	CA AT ATTTT GT ATTATGAAAACTATT ATACTATA AAAATTTAATATTCAAACTTTCAAC 240
BKM Y-868	... C C-... TC.AG
CBS 712	AACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGA 300
BKM Y-868
CBS 712	ATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCA 360
BKM Y-868
CBS 712	GGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGA 420
BKM Y-868
CBS 712	TACTCGT CTC -GGGTAACTTGAAAAGTGGCTAGCCGTTGCC AT CTGCGTGAGCAGGGCTGC 480
BKM Y-868 T.TTC T
CBS 712	GTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTG 540
BKM Y-868
	↓ HindIII
CBS 712	GTAAGCT T -GGGTCAT AGAGACT CATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCTCCTT 600
BKM Y-868 GA AT-... T
CBS 712	GAGGCATACGGCTT TA ACC AAAACTCTCAAAGT 633
BKM Y-868-.....-... T

Рис. 19. Нуклеотидные последовательности 5.8S-ITS-района рДНК типовых культур *Kluyveromyces marxianus* CBS 712 и *Kl. lactis* BKM Y-868. Идентичные нуклеотидные последовательности обозначены точками. Нумерация последовательностей приводится по штамму CBS 712. Серым цветом выделен *HindIII*-сайт рестрикции.

отсутствует за счет трансверсии Т–G в 548 позиции (нумерация приводится по ITS-последовательности типовой культуры *Kl. marxianus* CBS 712) (рис. 19).

У 56 штаммов 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. (табл. 2). В качестве контролей использовали типовые культуры *Kl. lactis* (BKM Y-868) и *Kl. marxianus* (CBS 712).

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). Дальнейший анализ ПЦР-продуктов с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазой HindIII позволил определить видовую принадлежность изученных штаммов дрожжей, полученных под пятью видовыми названиями. По сходству рестрикционных профилей штаммы были разбиты на две четкие группы. ПДРФ профили некоторых штаммов представлены на рис. 20. Большинство штаммов имели практически идентичные рестрикционные профили и не отличались от типовой культуры *Kl. marxianus* CBS 712: два HindIII-фрагмента размером примерно 570 и 150 п.н. (рис. 20, дорожки 1–6). Типовая культура *Kl. lactis* ВКМ Y-868 и 15 изученных штаммов (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, ВКМ Y-830, ВКМ Y-831, ВКМ Y-834, ВКМ Y-1890 и CBS 762), не имеющих HindIII-сайта рестрикции, составили вторую группу (рис. 20, дорожки 7–9).

Согласно проведенному анализу, девять штаммов, хранящихся в коллекции ВКМ как *Zygodafospora 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* (табл. 2). Из 40 штаммов, полученных как *Kl. lactis*, 29 реидентифицированы молекулярным анализом как *Kl. marxianus*. Из семи штаммов *Zygodafospora 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 (табл. 2).

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). В свою очередь последний таксон состоит из восьми генетических популяций: европейской «krassilnikovii», африканской «vanudenii», азиатской «восточная» и пяти североамериканских популяций – «drosophilorum», «phaseolosporus», «pseudovanudenii», «водная» и «новая» (Naumova et al. 2004). По крайней мере, некоторые популяции имеют частичную генетическую изоляцию. Рестрикционным анализом межгенного спейсера IGS2 рДНК можно дифференцировать молочные дрожжи *Kl. lactis* var. *lactis* и, не сбраживающие

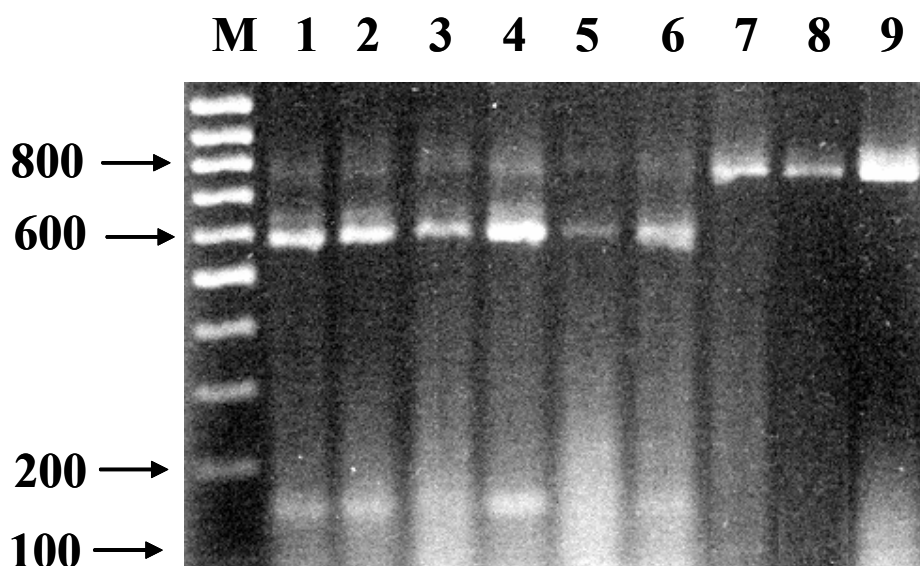


Рис. 20. ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов 5.8S-ITS-района рДНК штаммов *Kl. marxianus* и *Kl. lactis* с помощью эндонуклеазы *Hind*III. *Kl. marxianus*: 1 – CBS 712; 2 – ВКМ Y-453; 3 – ВКМ Y-470; 4 – ВКМ Y-833; 5 – ВКМ Y-1332; 6 – ВКМ Y-2013; *Kl. lactis*: 7 – ВКМ Y-868; 8 – ВКМ Y-1333; 9 – ВКМ Y-1890. М – маркер молекулярных весов (п.н.) 100 bp DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

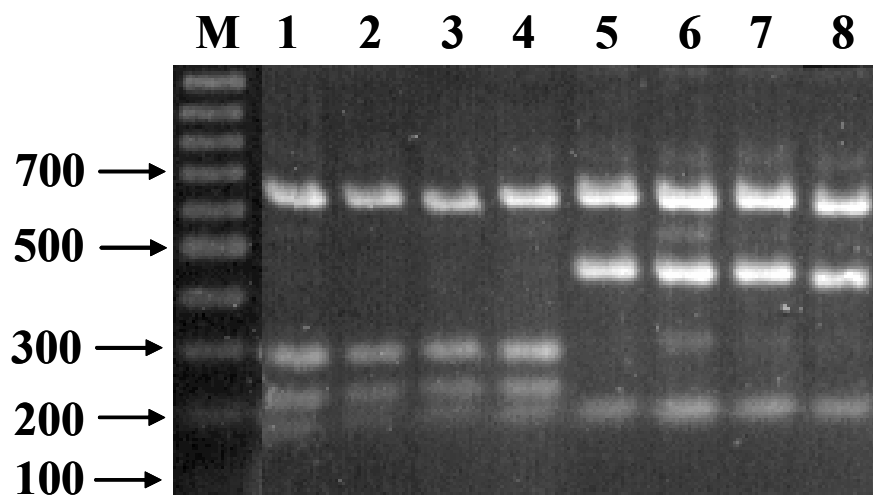


Рис. 21. ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 рДНК штаммов *Kl. lactis* var. *lactis* и *Kl. lactis* var. *drosophilorum* (европейская популяция «krassilnikovii») с помощью эндонуклеазы *Alu*I. *Kl. lactis* var. *lactis*: 1 – ВКМ Y-868; 2 – ВКМ Y-870; 3 – ВКМ Y-1333; 4 – ВКМ Y-1343; *Kl. lactis* var. *drosophilorum* (популяция «krassilnikovii»): 5 – ВКМ Y-830; 6 – ВКМ Y-831; 7 – ВКМ Y-834; 8 – ВКМ Y-1890. М – маркер молекулярных весов (п.н.) 100 bp DNA Ladder ("Fermentas", Литва).

лактозу, дикие дрожжи *K. lactis* var. *drosophilorum* (Naumova et al. 2004, Наумова и др. 2005a). С помощью праймеров NTS2 и ETS1 была проведена амплификация IGS2-участка рДНК у 15 штаммов, идентифицированных как *Kl. lactis*. Размер амплифицированного IGS2-фрагмента был одинаковым у всех изученных штаммов и типовой культуры *Kl. lactis* ВКМ У-868 и составил примерно 1200 п.н. Продукты ПЦР анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазой AluI (рис. 21). Согласно AluI-профилям штаммы ВКМ У-762, ВКМ У-869, ВКМ У-870, ВКМ У-896, ВКМ У-1186, ВКМ У-1333, ВКМ У-1334, ВКМ У-1339, ВКМ У-1343, ВКМ У-1868 и CBS 762 относятся к *Kl. lactis* var. *lactis*. Они имеют такие же рестрикционные профили как типовая культура ВКМ У-868 с четырьмя фрагментами размером около 650, 250, 200 и 100 п.н. (рис. 21, дорожки 1–4). Не усваивающие лактозу штаммы ВКМ У-830, ВКМ У-831, ВКМ У-834 и ВКМ У-1890 составили вторую группу, рестрикционный профиль этих штаммов характеризуется тремя фрагментами размером около 650, 450 и 100 п.н. (рис. 21, дорожки 5–8). Согласно ПДРФ – профилям последние штаммы относятся к европейской популяции «krassilnikovii» таксона *Kl. lactis* var. *drosophilorum*.

7.2. Физиологические особенности изученных штаммов

Ранее для дифференциации дрожжей *Kl. lactis* от *Kl. marxianus* предлагалось (Наумов и др., 1991; van der Walt 1970; Наумов 1988; Valderrama et al. 1999) использовать ассимиляцию некоторых α -глюкозидов: мальтозы, мелицитозы и α -метил-глюкозида.

Все изученные штаммы были проверены по ассимиляции указанных α -глюкозидов. По ассимиляционным спектрам 56 штаммов разделились на две группы (табл. 2). Все штаммы, идентифицированные молекулярным анализом как *Kl. marxianus*, не ассимилировали мальтозу, мелицитозу и α -метил-глюкозид. Во вторую группу вошли штаммы *Kl. lactis* var. *lactis* и *Kl. lactis* var. *drosophilorum* (европейская популяция «krassilnikovii»), ассимилирующие указанные α -глюкозиды (табл. 2). Таким образом, на основании молекулярных и физиологических признаков была определена видовая принадлежность 56 изученных штаммов *Kluyveromyces*.

7.3. Молекулярный полиморфизм дрожжей *Kl. marxianus*

7.3.1. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК

Для кариотипического анализа было выбрано 29 штаммов *Kl. marxianus* различного происхождения (табл. 4). Для достижения оптимального разделения хромосомных полос было использовано несколько электрофоретических программ, отличающихся временем переключения полей, силой тока и продолжительностью электрофореза.

Наилучшее разделение хромосомных полос было достигнуто при использовании следующего трехступенчатого режима: 1) 170 В, в течение 10 ч при времени переключения полей 40–120 с.; 2) 130 В, в течение 28 ч при времени переключения полей 120–360 с.; 3) 100 В, в течение 9 ч при времени переключения полей 360–1200 с.

Порядок и размер хромосомных полос штаммов *Kl. marxianus* устанавливали согласно кариотипическим стандартам *S. cerevisiae* YNN 295 и *Wickerhamomyces canadensis* YB-4662-VIA. Сравнительный анализ кариотипов 29 штаммов дрожжей *Kl. marxianus* выявил значительный внутривидовой полиморфизм размеров хромосомных полос. Изученные штаммы различались 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. 22.

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. 22, 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 (табл. 2) характеризуются 9–12 хромосомными полосами. Наибольшие отличия в кариотипах этих штаммов отмечены в районе нижних хромосом размером от 580 до 950 т.п.н. (рис. 22).

Таблица 4. Физиологическая характеристика отобранных штаммов дрожжей *Kl. marxianus*

Штамм	Источник и место выделения	Ферментация лактозы при 37 °С	Профиль гибридизации
ВКМ Y-126	Кислое молоко, Россия	+1	B
ВКМ Y-431	Молоко, Кольский п-ов	+1	E
ВКМ Y-432	Испорченные винные ягоды, США	+1	A
ВКМ Y-433	Испорченные винные ягоды, США	+1	A
ВКМ Y-452	Чал, Туркмения	+1	C
ВКМ Y-453	Мацун, Армения	+1	A
ВКМ Y-454	Мацун, Армения	+1	A
ВКМ Y-459	Творог, Елец	+1	C
ВКМ Y-460	Творог, Елец	+1	C
ВКМ Y-461	Армения, Ереван	+1	B
ВКМ Y-462	Творог	+1	E
ВКМ Y-464	Варенец	+1	A
ВКМ Y-471	Чал, Туркмения	+1	F
ВКМ Y-473	Чал, Туркмения	+1	F
ВКМ Y-474	Чал, Туркмения	+1	F
ВКМ Y-832	Почва, Москва	-	A
ВКМ Y-835	Гидролизный завод, Лабвинск	+2	H
ВКМ Y-836	Гидролизный завод, Саратов	+8	I
ВКМ Y-837	Гидролизный завод, Гавда	+8	J
ВКМ Y-1332	Творог, Кисловодск	+1	C
ВКМ Y-1335	Молоко, Карачаево-Черкессия	+1	A
ВКМ Y-1336	Молоко, Карачаево-Черкессия	+1	A
ВКМ Y-1337	Простокваша, Пятигорск	+1	D
ВКМ Y-1338	Простокваша, Пятигорск	+1	D
ВКМ Y-1341	Молоко, Карелия	+1	E
ВКМ Y-1342	Молокозавод, Тюменская обл.	+1	C
ВКМ Y-2013	Сахарная свекла, Словакия	+2	A
ВКМ Y-2454	–	+1	G
ВКПМ Y-4065	Йогурт, Нидерланды	+1	A

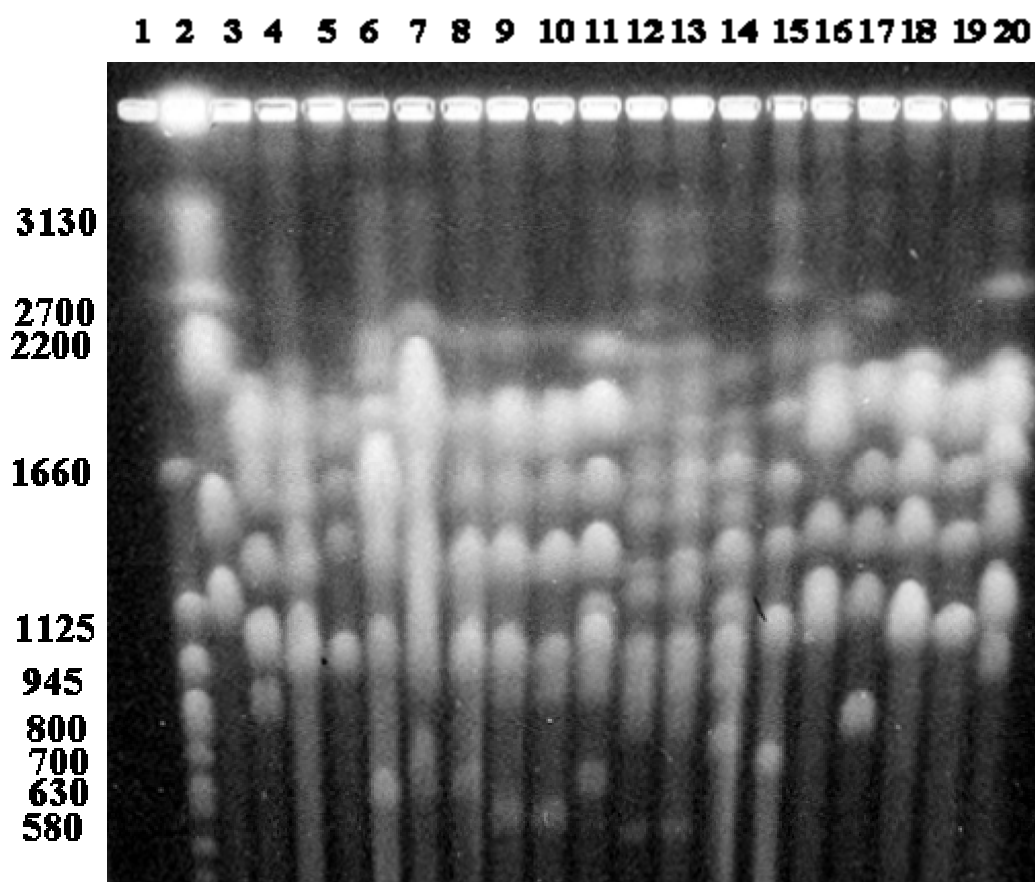


Рис. 22. Пульс-электрофорез хромосомных ДНК дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Дорожки: 1 – *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – NRRL Y-1140; 3 – ВКМ Y-432; 4 – ВКМ Y-454; 5 – ВКМ Y-1335; 6 – ВКМ Y-126; 7 – ВКМ Y-459; 8 – ВКМ Y-1342; 9 – ВКМ Y-1337; 10 – ВКМ Y-1338; 11 – ВКМ Y-1341; 12 – 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 по кариотипическому стандарту *S.cerevisiae* YNN 295 и *W. canadensis* YВ - 4662 - VIA.

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. 22, дорожки 9, 10 и 12, 13). В то же время, каждый из трех, выделенных на гидролизных заводах штаммов (ВКМ Y-835, ВКМ Y-836, ВКМ Y-837), имеют уникальные кариотипические профили (рис. 22, дорожки 15–17).

7.3.2. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК штаммов *Kl. marxianus* с зондами *LAC4* и *LAC12*

С помощью праймеров MR66/MR67 и AC18/AC19 была проведена амплификация генов *LAC4* и *LAC12* из ДНК штамма *Kl. lactis* NRRL Y-1140. Полученные ПЦР-продукты были использованы в качестве зондов при Саузерн-гибридизации хромосомных ДНК изучаемых штаммов *Kl. marxianus*.

Хромосомные ДНК 29 штаммов *Kl. marxianus* (рис. 22) были перенесены Саузерн-блотом на нитроцеллюлозную мембрану и прогибридизировали с зондами *LAC4* и *LAC12* (рис. 23 а, б). В качестве контроля привлекался штамм *Kl. lactis* NRRL Y-1140 (рис. 23, дорожка 2). По сходству гибридизационных профилей 29 штаммов разделились на несколько групп (табл. 4, рис. 23).

В первую группу, обозначенную нами как «А», попали десять штаммов: ВКМ Y-432, ВКМ Y-433, ВКМ Y-453, ВКМ Y-454, ВКМ Y-464, ВКМ Y-832, ВКМ Y-1335, ВКМ Y-1336, ВКМ Y-2013 и ВКПМ Y-4065. У всех этих штаммов обнаружена только одна гибридизационная полоса размером около 1660 т.п.н. (рис. 23, дорожки 3–5, 18–20).

Группа «В» включает в себя штаммы ВКМ Y-126 и ВКМ Y-461, у которых зонды *LAC4* и *LAC12* гибридизовались с двумя хромосомными полосами размером около 2200 и 2000 т.п.н. (рис. 23, 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 гибридизационными сигналами (рис. 23, дорожки 7 и 8).

В группу «D» попали штаммы ВКМ Y-1337 и ВКМ Y-1338, имеющие два гибридизационных сигнала, один из которых расположен в хромосоме размером 2200 т.п.н., а второй – в хромосоме размером 580 т.п.н. (рис. 23, дорожки 9 и 10).

Штаммы ВКМ Y-431, ВКМ Y-462 и ВКМ Y-1341, объединенные в группу «Е», характеризуются двумя гибридизационными сигналами, расположенными в хромосомах размером 2200 т.п.н. и 600 т.п.н. (рис. 23, дорожка 11).

В группу «F» попали штаммы *Kl. marxianus*, выделенные из чала в Туркмении: ВКМ Y-471, ВКМ Y-473 и ВКМ Y-474. У этих штаммов обнаружены

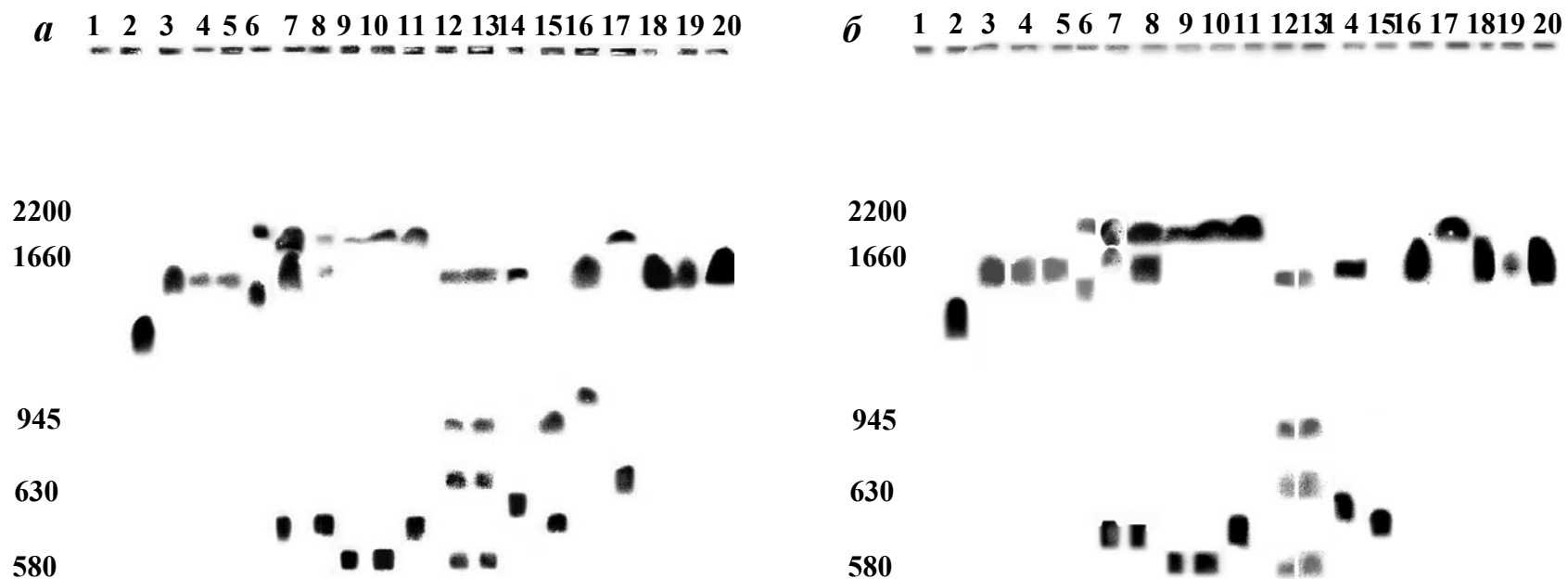


Рис. 23. Саузерн-гибридизация хромосомной ДНК штаммов *Kl. marxianus* с зондами *LAC4* (а) и *LAC12* (б). Дорожки: 1– *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – NRRL Y-1140; 3 - ВКМ Y-432 (А); 4 – ВКМ Y-454 (А); 5 – ВКМ Y-1335 (А); 6 – ВКМ Y-126 (В); 7 – ВКМ Y-459 (С); 8 – ВКМ Y-1342 (С); 9 – 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 по кариотипическому стандарту *S. cerevisiae* YNN 295 и *W. canadensis* YВ-4662–VIA. В скобках приводится гибридизационная группа.

четыре гибридизационных сигнала, локализованных в хромосомах размером около 580 т.п.н., 800 т.п.н., 945 т.п.н., 1600 т.п.н. (рис. 23, дорожки 12 и 13).

Штаммы ВКМ Y-2454, ВКМ Y-835, ВКМ Y-836 и ВКМ Y-837 имели индивидуальные гибридизационные профили, обозначенные, соответственно, как «G», «H», «I», «J» (рис. 23, дорожки 14–17). Несмотря на то, что все три последних штамма выделены на гидролизных заводах в России, их гибридизационные профили сильно различаются (рис. 23, дорожки 15–17). У этих штаммов обнаружено по два гибридизационных сигнала с зондом *LAC4*, но различной хромосомной локализации. С зондом *LAC12* у гидролизных штаммов обнаружено только по одной гибридизационной полосе (рис. 23б, дорожки 15–17).

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.

7.3.3. Ферментационная активность штаммов *Kl. marxianus*

Все 29 изученных штамма были проверены по способности ферментировать лактозу при 37⁰ С. Скорость брожения лактозы составила от 1 до 8 суток у разных штаммов (табл.4). Все штаммы молочного происхождения забродили через сутки, но с различной интенсивностью.

Интенсивное 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 лактозы в жидкой среде YP с 2% лактозой при 37⁰ С (рис. 24). Скорость сбраживания лактозы определяли по количеству выделенного углекислого газа в течение 48 часов.

Изученные 12 штаммов активно сбраживали лактозу в течение первых двух суток, а затем процесс останавливался. На первые сутки наиболее интенсивное 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 Y-464, ВКМ Y-1335 и ВКМ Y-1337. Выделяется штамм ВКМ Y-459, который выбродил лактозу уже на первые сутки. Этот штамм обладает тремя полимерными генами *LAC* (тип С, табл. 4). Наибольшей ферментационной активностью обладает штамм ВКМ Y-126, который имеет два гена *LAC* (тип В).

7.4. Молекулярные кариотипы и физиологические особенности дрожжей

Kl. lactis

Из 56 изученных штаммов *Kluyveromyces* на основании ПДРФ-анализа 15 были отнесены к виду *Kl. lactis*, из которых 11 штаммов изолированы из молочных продуктов (табл. 2). На рисунке 25 представлены молекулярные кариотипы указанных молочных штаммов. В качестве контролей использовали типовую культуру *Kl. lactis* ВКМ Y-868, а также генетические линии NRRL Y-1140 и NRRL Y-1118 (рис. 25, дорожки 2–4). Хромосомная ДНК большинства изученных молочных штаммов разделилась на шесть электрофоретических полос размером от 1050 до 3000 т.п.н. (дорожки 5–14). Исключением являются штаммы ВКМ Y-869 и ВКМ Y-896, хромосомная ДНК которых разделилась на пять полос (рис. 25а, дорожки 5 и 14). Согласно интенсивности окрашивания бромистым этидием, полоса размером около 2200 т.п.н. содержит две хромосомы. В целом изученные штаммы имеют похожие кариотипические паттерны. Основные различия между штаммами касаются хромосомных полос размером от 1500 до 2200 т.п.н.

Таким образом, кариотипический анализ подтвердил принадлежность молочных штаммов к *K. lactis* var. *lactis*.

Все молочные штаммы *K. lactis* были проверены на ферментационную активность и термоустойчивость. Штаммы ВКМ Y-762, ВКМ Y-869, ВКМ Y-870, ВКМ Y-896, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1339, ВКМ Y-1343, ВКМ Y-1868 и CBS 762 хорошо росли на агаризованной среде YPD при температуре 30°C. Однако при 37°C рост отмечен только у штаммов ВКМ Y-869, ВКМ Y-1868, ВКМ Y-1343 и CBS 762. У этих штаммов была определена интенсивность ферментации лактозы

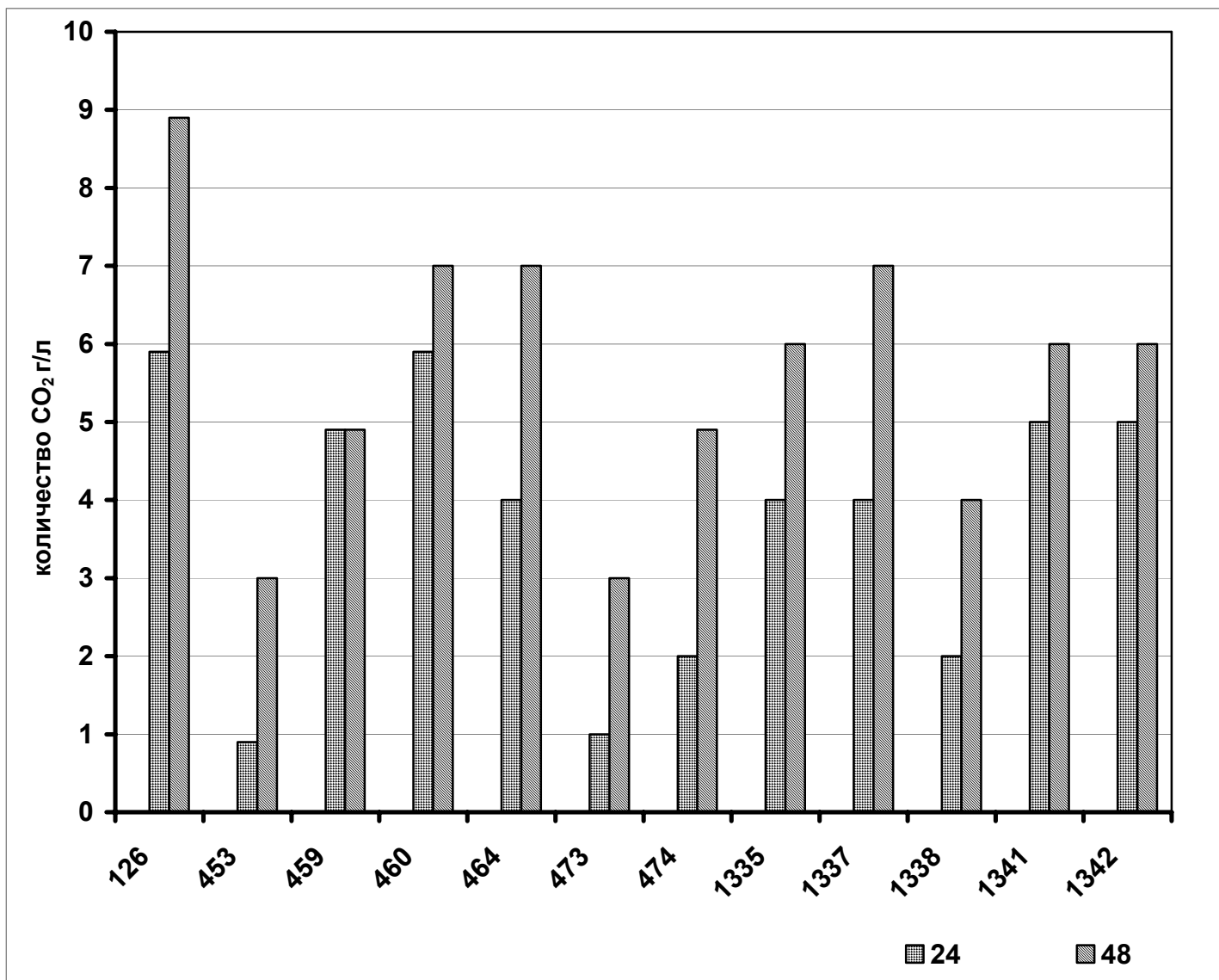


Рис. 24. Интенсивность брожения лактозы при 37°C штаммами *Kl. marxianus*. Скорость сбраживания 2% лактозы определяли по количеству выделяемого углекислого газа через 24 и 48 часов.

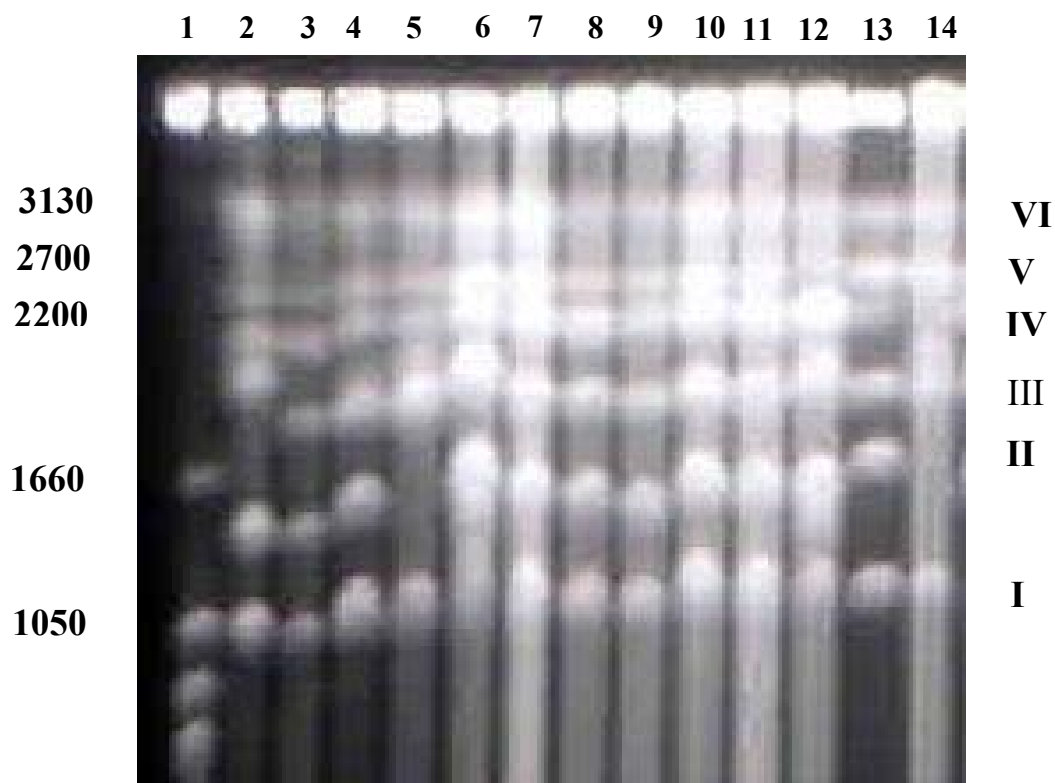


Рис. 25. Пульс-электрофорез хромосомных ДНК дрожжей *Kl. lactis*. Дорожки: 1– *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – NRRL Y-1140; 3 - NRRL Y-1118; 4 – ВКМ Y-868; 5 – ВКМ Y-869; 6 – ВКМ Y-870; 7 – ВКМ Y-1186; 8 – ВКМ Y-1333; 9 – CBS 762; 10 – ВКМ Y-1339; 11 – ВКМ Y-1343; 12 – ВКМ Y-1868; 13 – ВКМ Y-762; 14 – ВКМ Y-896. Размеры хромосом (т.п.н.) приводятся по кариотипическому стандарту *S. cerevisiae* YNN 295 и *W. canadensis* YB-4662-VIA.

при 37°C. Скорость сбраживания лактозы определяли по количеству выделяемого углекислого газа при культивировании в колбах с жидкой средой YP, содержащей 2%-ную лактозу. В качестве контроля использовали штамм *Kl. marxianus* ВКМ Y-126. На первые сутки наиболее интенсивное брожение отмечено у штамма ВКМ Y-1868. Однако его ферментационная активность была значительно ниже, чем у контрольного штамма ВКМ Y-126.

7.5. Обсуждение

Проведенный нами молекулярный анализ 56 штаммов *Kluyveromyces* различного происхождения позволил провести кардинальную реидентификацию молочных дрожжей, хранящихся в различных дрожжевых коллекциях. На основании ПДРФ-анализа некодирующих участков рДНК и некоторых физиологических признаков было 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*.

Таким образом, большинство изученных штаммов *Kluveromyces* относятся в виду *Kl. marxianus*. Согласно кариотипическому анализу, молочные дрожжи *Kl. marxianus* содержат дополнительные хромосомы или гомологичные хромосомы различных размеров. Известно, что полиморфизм размеров хромосомных ДНК характерен для производственных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* (Bakalinsky & Snow 1990, Наумова и др. 1993). На основании ферментационных тестов и Саузерн – гибридизации с зондом *LAC4* и *LAC12* отобрано 12 штаммов *Kl. marxianus*, способных при 37⁰ С активно сбраживать лактозу.

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*; практически каждый изученный штамм обладал индивидуальным кариотипом. Кариотипы большинства штаммов характеризуются также наличием дополнительных хромосомных полос.

Известно, что многие производственные штаммы дрожжей *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 & Tonomura 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 сбраживали 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* в различных комбинациях.

Концевые участки хромосом дрожжей *S. cerevisiae* имеют сложное строение и состоят из ряда повторяющихся последовательностей (Zakian 1996; Louis et al. 1992, 1994). Собственно, теломеры включают переменные повторы $(TG_{1-3})_n$, непосредственно за которыми расположены семейства Y'- и X-элементов (рис. 26).

Между ними имеются короткие субтеломерные повторы STR (Subtelomeric Repeat), которые представлены в большинстве хромосомных концов (Louis et al. 1994). Полимерные гены *SUC* и фланкирующие их последовательности локализованы в соединительном районе X-Y' (рис. 26).

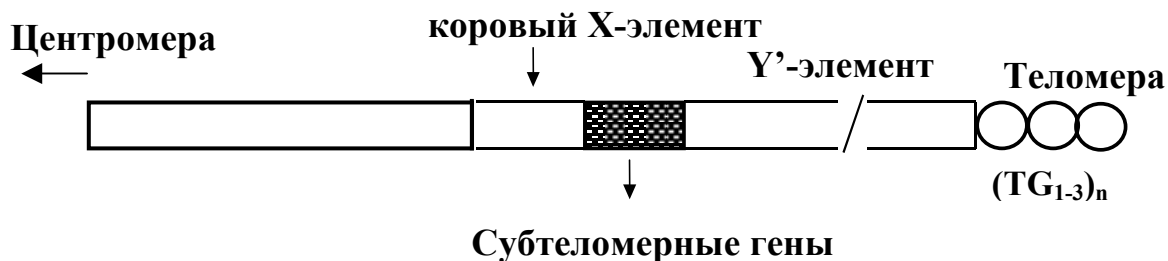


Рис. 26. Обобщенная схема теломерного района хромосом *S. cerevisiae*.

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. В этой связи, 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. У штаммов *S. cerevisiae* различного происхождения можно ожидать значительную дивергенцию на генном уровне, что может приводить к гетерозисному селекционному эффекту при их гибридизации. Действительно, изученные нами межштабмовые гибриды между спиртовой расой XII₇ и отобранными природными термоустойчивыми штаммами превосходили по ферментативной активности родительские культуры и были способны расти при повышенных температурах. Полученные результаты показали, что межштабмовая гибридизация — эффективный метод создания спиртовых штаммов *S. cerevisiae*, сочетающих термоустойчивость и высокую эффективность алкогольной ферментации.

Дрожжи *Kluveromyces marxianus* и *Kl. lactis* одни из немногих микроорганизмов, которые, благодаря наличию фермента β-галактозидазы, способны гидролизовать и утилизировать лактозу. Штаммы этих дрожжей часто выделяются из различных молочных продуктов (молоко, кислое молоко, простокваша, чад, мацун, творог, сметана, варенец, йогурт) и их отходов — молочной сыворотки. Известно, что присутствие в пищевых молочных продуктах β-галактозида — 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 (ВКМ Пущино, Московская область). 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.

drosophilarum (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*. Надо отметить, что ошибки в идентификации дрожжей *Kl. marxianus* и *Kl. lactis* были допущены и в других коллекциях, например в Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). В свое время van der Walt (van der Walt 1970) идентифицировал ряд штаммов как *Kl. vanudenii* (syn. *Kl. lactis* var. *drosophilarum* – африканская популяция «vanudenii» (Naumova et al. 2004)). Правильно была идентифицирована только типовая культура CBS 4372. Как показала молекулярная идентификация (Naumov & Naumova 2002; Belloch et al. 2002) два других штамма CBS 5669 и CBS 5670 относятся к *Kl. marxianus* (List of cultures, 2001; <http://www.cbs.knaw.nl>), 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 совсем или с большой задержкой.

По результатам ферментационных тестов были отобраны 12 молочных 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 схожих 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 37⁰С активно сбраживать лактозу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adams, J. Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae* / J. Adams, S. Puskas-Rozsa, J. Simlar, C.M. Wilke // *Curr. Genet.* —1992. — V. 22. — P. 13–19.
2. Adjiri, A. Sequence comparison of the *ARG4* chromosomal regions from the two related yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces douglasii* / A. Adjiri, R. Chanet, C. Mezard, F. Fabre // *Yeast.* —1994. — V.10. — P. 309–317.
3. Anderson, E. The sporulation and mating of brewing yeasts / E. Anderson, P.A. Martini // *J. Inst. Brew.* —1975. — V. 81. — P. 242.
4. Anderson, P.J. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40° C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills / P.J. Anderson, K. McNeil, K. Watson // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1986. — V. 51. — P. 1314–1320.
5. Ando, S. Phylogenetic relationships of species of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess deduced from partial base sequences of the 18S and 26S ribosomal RNAs (*Saccharomycetaceae*) / S. Ando, K. Mikata, Y. Tahara, Y. Yamada // *Biosci. Biotech. Biochem.* — 1996. — V. 60. — P. 1070–1075.
6. Aragon, G. Probiotic therapy for irritable bowel syndrome / G. Aragon, D.B. Graham, M. Borum, D.B. Doman // *Gastroenterol. Hepatol.* — 2010. — V.6. — P. 39–44.
7. Bakalinsky, A. T. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* / A.T. Bakalinsky, R. Snow // *Yeast.* — 1990. — V. 6. — P. 367–382.
8. Banat, I.M. Characterization and potential industrial applications of five novel thermotolerans, fermentative yeasts strains / I.M. Banat, R. Marchant // *World Journal Microbiology Biotechnology.* — 1995. — V.11. — P. 304–306.
9. Banat, I.M. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations. Part I: Yeasts in general / I.M. Banat, P. Nigam, D. Singh, P. Marchant, A.P. McHale // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 1998. — V. 14. — P. 809–821.

10. Barnett, J.A. The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts / J.A. Barnett // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* — 1981. — V. 39. — P. 347–404.
11. Barnett, J.A. *Yeasts: Characteristics and Identification* / J.A. Barnett, R.W. Payne, D. Yarrow // 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press. — 1990.
12. Barnett, J.A. *Yeasts: Characteristics and Identification* / J.A. Barnett, R.W. Payne, D. Yarrow // Cambridge: Univ. Press. — 2000. — P. 1139.
13. Belloch, C. Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rDNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers / C. Belloch, E. Barrio, M.D. Garcia, A. Querol // *Syst. Appl. Microbiol.* —1998. — V. 21. — P.266–273.
14. Belloch, C. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene / C. Belloch, A. Querol, M.D. Garcia, E. Barrio // *Int. J. System. Evol. Microbiol.* — 2000. — V. 50. — P. 405–416.
15. Belloch, C. An analysis of inter- and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon / C. Belloch, T. Fernandes-Espinar, A. Querol, M.D. Garcia, E. Barrio // *Yeast* . —2002. — V. 19. — P. 257–268.
16. Bicknell, J. N. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces* / J. N. Bicknell, H. C. Douglas // *J. Bacteriol.* — 1970. — V. 101. — P. 505–512.
17. Bidente, C. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* / C. Bidente, B. Blondin, S. Dequin, F. Vezinhet // *Curr. Genet.* — 1992. — V. 22. — P. 1–7.
18. Boidin, J. Les levures a spores reniformes / J. Boidin, F. Abadie, J.L. Jacob, M.C. Pignal // *Bull. Soc. Mycol. France.* —1962. — V. 78. — P. 155–203.
19. Bolla, P. A. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir / P. A. Bolla, M. de los Angeles Serradell, P.J. de Urraza, G.L. de . Antoni // *J. Dairy Res.* —2011. — V.78.

— P. 15–22.

20. Boynton, P. J. The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species / P. J. Boynton, D. Greig // *Yeast* . — 2014. — V. 31 — P. 449–462.
21. Boze, H. Uptake of galactose and lactose by *Kluyveromyces lactis*: Biochemical characteristics and attempted genetical analysis / H. Boze, G. Moulin, P. Galzy // *J. Gen. Appl. Microbiol.* — 1987a. — V. 133. — P.15–23.
22. Boze, H. The role of genes *LAC1* and *LAC2* in the biosynthesis of lactose metabolism enzymes by *Kluyveromyces lactis* / H. Boze, D. Nikol, G. Moulin , P. Galzy // *Acta microbiol. hung.* — 1987b. — V. 34. — № 1. — P. 73–83.
23. Bradbury, J. A Homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains / J. Bradbury, K. Richards, H.Niederer, S. Lee, P. Rod Dunbar, R. Gardner // *Ant. van Leeuwenhoek.* — 2006. — V. 89. — P. 27–37.
24. Bussereau, F. The *Kluyveromyces lactis* repertoire of transcriptional regulators F. Bussereau, S. Casaregola, J.F. Lafay, M. Bolotin-Fukuhara // *FEMS Yeast Res.* — 2006. — V.6. — №3. — P. 325–335.
25. Cai, J. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small subunit rDNA gene sequences / J. Cai, I.N. Roberts, M.D. Collins // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1996. — V.46. — №2. — P. 542–549.
26. Carle, G.F. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal field alternation gel electrophoresis / G.F. Carle, M.V. Olson // *Nucl. Acids Res.* — 1984. — V. 12. — P. 5647–5664.
27. Carle, G.F. An electrophoretic karyotype for yeast / G.F. Carle, M.V. Olson // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 1985. — V. 82. — P. 3756–3760.
28. Carlotti, A. Microbial interactions during the production of yeast on crude sweet whey / A. Carlotti, S. Poncet, J. Perrier , F.Jacob // *J. Gen. Appl. Microbiol.* — 1991. — V.

37. — № 4. — P. 389–394.
29. Carlson, M. Two differentially regulated mRNAs with different 5'ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase / M. Carlson, D. Botstein // *Cell*. — 1982. — V. 28. — P. 145–154.
30. Carlson, M. Organization of the *SUC* gene family in *Saccharomyces* / M. Carlson, D. Botstein // *Mol. Cell. Biol.* — 1983. — V. 3. — P. 351–359.
31. Carlson, M. Evolution of the dispersed *SUC* gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres / M. Carlson, J.L. Celenza, F.J. Eng // *Mol. Cell. Biol.* — 1985. — V. 5. — № 11. — P. 2894–2902.
32. CBS. List of cultures. Fungi and yeasts. 34th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn–Delft (The Netherlands). Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. — 1996. — 603 p.
33. Charron, M.J. Structural and functional analysis of the *MAL1* locus of *Saccharomyces cerevisiae* / M.J. Charron, R.A. Dubin, C.A. Michels // *Mol. Cell. Biol.* — 1986. — V. 6. — P. 3891–3899.
34. Charron, M.J. Molecular evolution of the telomere-associated *MAL* loci of *Saccharomyces* / M.J. Charron, E. Read, S.R. Haut, C.A. Michels // *Genetics*. — 1989. — V. 122. — P. 307–316.
35. Chen, W. Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species / W. Chen // *Phytopathology*. — 1992. — V. 82. — P. 1467–1472.
36. Chen, W. Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNAs of *Pythium* species / W. Chen, J.W. Hoy, R.W. Schneider // *Exptl. Mycol.* — 1992. — V. 16. — P. 22–34.
37. Chow, T.H.C. Structure of the multigene family of *MAL* loci in *Saccharomyces* /

- T.H.C. Chow, P. Sollitti, J. Marmur // *Mol. Gen. Genet.* — 1989. — V. 217. — P. 60–69.
38. Codón, A. C. Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts / A.C. Codón, T. Benítez, M. Korhola // *Curr Genet.* — 1997. — V. 32. — № 4. — P. 247–259.
39. Cohen, J.D. Organization of the *MAL* loci of *Saccharomyces*. Physical identification and functional characterization of three genes at the *MAL6* loci / J.D. Cohen, M.J. Goldenthal, T. Chow, B. Buchferer, J. Marmur // *Mol. Gen. Genet.* — 1985. — V. 200. — P. 1–8.
40. De la Fuente, G. Transport of sugars in yeasts. Ii mechanisms of utilization of disaccharides and related glycosides / G. De la Fuente, A. Sols // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1962. — V. 56. — P. 49–63.
41. Dellomonaco , C. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology / C. Dellomonaco, F. Fava, R. Gonzalez // *Microb. Cell Fact.* — 2010 — V. 9. — P. 3.
42. Dellomonaco , C. Engineered respiro-fermentative metabolism for the production of biofuels and biochemicals from fatty acid-rich feedstocks / C. Dellomonaco, C. Rivera, P. Campbell, R. Gonzalez // *Applied and Environmental Microbiology.* — 2010. — V. 76.— N.15. — P. 5067–5078
43. Delorme, M.O. Mutations in the *NAM2* genes of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. douglasii* are clustered non-randomly as a result of the nucleic acid sequence and not on the protein / M.O. Delorme, A. Hénaut, P. Vigier // *Mol. Gen. Genet.* — 1988. — V.213. — P. 310–314.
44. Denayrolles, M. Incidence of *SUC-RTM* telomeric repeated genes in brewing and wild wine strains of *Saccharomyces* / M. Denayrolles, E. P. de Villechenon, A. Lonvaud-Funel, M. Aigle // *Curr. Genet.* – 1997. – V. 31. – P. 457–461.

45. Dickson, R.C. In: Yeast Genetic Engineering / R.C. Dickson, M.I. Riley // Boston: Butterworth Publ. — 1989. — P.19–40.
46. Dunn, B. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus* / B. Dunn, G. Sherlock // Genome Res. — 2008. — V. 18. — P. 1610–1623.
47. Esteve-Zarzoso, B. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rDNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers / B. Esteve-Zarzoso, C. Belloch, F. Uruburu, A. Querol // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1999. — V. 49. — P. 329–337.
48. Evans, I. H. Mitochondrial factors in the utilization of sugars in *Saccharomyces cerevisiae* / I. H. Evans, D. Wilkie // Genet. Res., Camb. — 1976. — V. 27. — P. 89–93.
49. Fairhead, C. Structure of *Kluyveromyces lactis* subtelomeres: duplications and gene content. FEMS Yeast Res / C. Fairhead, B. Dujon // FEMS Yeast Res. — 2006. — V.6. — P.428–441.
50. Farnworth, E.R. Kefir: a complex probiotic / E.R. Farnworth // Food Sci. Technol. Bull. — 2005. — V.2. — P. 1–17.
51. Fell, J.W. A new species of *Saccharomyces* isolated from a subtropical estuary / J.W. Fell // Antonie van Leeuwenhoek. — 1961. — V. 27 — P. 27–30
52. Fernández-Espinar, M. T. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts / M. T. Fernández-Espinar, B. Esteve-Zarzoso, A. Querol, E. Barrio // Antonie van Leeuwenhoek. — 2000. — V. 78. — P. 87 – 97.
53. Fischer, G. Chromosomal evolution in *Saccharomyces* / G. Fischer, S.A. James, I.N. Roberts, S.G. Oliver, E.S. Louis // Nature. — 2000. — V. 405. — P. 451– 454.
54. Fonceca, G.G. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential /

- G.G. Fonceca, E. Heizle, C. Wittmann, A.K. Gormbert // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V.79. — P. 339–354.
55. Fukuhara, H. The Kluyver effect revisited / H. Fukuhara // FEMS Yeast Res. — 2003. — V. 3. — P. 327–331.
56. Fuson, G.B. Deoxiribonucleic acid base sequence relatedness among members of the yeast genus *Kluyveromyces* / G.B. Fuson, H.L. Presley, H.J. Phaff // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1987. — V.37. — №4. — P.371–379.
57. Gödecke, A. Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple *LAC9* binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter / A. Gödecke, W. Zachariae, A. Arvanitidis, K.D. Breunig // Nucl. Acid Res. — 1991. — V.19. — №19. — P.5351–5358.
58. Goffeau, A. Life with 6000 genes / A. Goffeau, B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S.G. Oliver // Science. — 1996. — V. 274. — P. 546–567.
59. Gonzalez, S. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations / S. Gonzalez, E. Barrio, J. Gafner, A. Querol // FEMS Yeast Res. — 2006. — V. 6. — P. 1221–1234.
60. Gonzalez, S. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* / S. Gonzalez, L. Gallo, M. D. Climent, E. Barrio, A. Querol // Int. J. Food Microbiol. — 2007. — V. 116. — P. 11–18.
61. Gonzalez, S. Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing / S. Gonzalez, E. Barrio, A. Querol // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — V. 74. — P. 2314–2320.
62. Gozalbo, D. Differential expression of *SUC* genes: A question of bases / D. Gozalbo, L. del Castillo Agudo // FEMS. Microbiol. Rev. — 1994. — V. 15. — P. 1–7.

63. Gozalbo, D. The naturally occurring silent invertase structural gene *suc2⁰* contains an amber stop codon that is occasionally read through / D. Gozalbo, S. Hohmann // Mol. Gen. Genet. — 1989. — V. 216. — P. 511– 516.
64. Guilliermond, A. Monographie des levures rapportées d’Afrique Occidentale par la mission Chevalier / A. Guilliermond // Ann. Sci. Nat. 9 Sér. Bot. — 1914. — V. 19. — P. 1 – 32.
65. Guilliermond, F. Sur la presence d'une copulation heterogamique dans le *Saccharomyces marxianus* / F. Guilliermond, P. Negroni // Compt. Rend. Soc. Biol. — 1929. — V.101. — P.565– 566.
66. Gunge, N. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character / N. Gunge, A. Tamaru, F. Ozawa, K. Sakaguchi // J. Bacteriol. — 1981. — V. 145. — P. 382 – 390.
67. Hansen, E.C. Undersøgelser over alkoholgjaersvampenes fysiologi og morfologi. II. Om askosporedannelsen hos slægten *Saccharomyces* / E.C. Hansen // Medd. Carlsberg Lab. — 1883. — V. 2. — P. 29– 86.
68. Hansen, E.C. Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. XIII. Nouvelles études sur des levures de brasserie à fermentation basse / E.C. Hansen // Compte. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. — 1908. — V. 7. — P. 179 – 217.
69. Herbert, C.J. Divergence of the mitochondrial leucyl tRNA synthetase genes in two closely related yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces douglasii*: A paradigm of incipient evolution / C.J. Herbert, G. Dujardin, M. Labouesse, P.P. Slonimski // Mol. Gen. Genet. — 1988. — V.213. — P. 297– 309.
70. Herbert, C.J. The *MRS1* gene of *S. douglasii*: co-evolution of mitochondrial introns and specific splicing proteins encoded by nuclear genes / C.J. Herbert, C. Macadre, A-M. Bécan, J. Lazowska, P.P. Slonimski // Gene Expr. — 1992. — V.2. — P. 203 – 214.

71. Herman, A. Identification of the structural gene for β -glucosidase in *Saccharomyces lactis* / A. Herman, H. Halvorson // J. Bacteriol. — 1963. — V.85. — №4. — P.895–900.
72. Hohmann, S. Cloning and expression on a multicopy vector of five invertase genes of *Saccharomyces* / S. Hohmann, F.K. Zimmermann//Curr. Genet. — 1986.— V.11. —P.217–225.
73. Hohmann, S. A region in the yeast genome which favours multiple integration of DNA via homologous recombination / S. Hohmann // Curr Genet. — 1987. —V. 12. — №7. — P.519–26
74. Hohmann, S. Structural analysis of the 5' regions of yeast *SUC* genes revealed analogous palindromes in *SUC*, *MAL* and *GAL* / S. Hohmann, D. Gozalbo // Mol. Gen. Genet. — 1988. — V.211. — P.446–454.
75. Hohmann, S. Comparison of the nucleotide sequences of a yeast gene family. I. Distribution and spectrum of spontaneous base substitutions / S. Hohmann, D. Gozalbo // Mutation Res. — 1989. — V. 215. — P. 79–87.
76. <http://www.bio.pu.ru/faculty/collections/genetics.php> Коллекции кафедры генетики и селекции Биологопочвенного факультета СПбГУ. Санкт-Петербург.
77. <http://www.cbs.knaw.nl>
78. Ishchuk, O.P. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance / O.P. Ishchuk, A.Y. Voronovsky, C.A. Abbas, A.A. Sibirny // Biotechnol. Bioengineering. —2009. —V. 104. —№5. —P. 911–919.
79. James, S.A. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota* / S.A. James, M.D. Collins, I.N. Roberts // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1996. — V. 46. — №1. — P. 189–194.
80. James, S.A. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov., and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. / S.A. James, J. Cai, I.N. Roberts, M.D. Collins // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1997. — V. 47. — № 2. — P. 453–460.

81. Javelot, C. Introduction of terpene-producing ability in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* / C. Javelot, P. Girand, B. Colonna-Ceccaldi, B. Vladescu // *J Biotechnology*. — 1991. — V. 21. — P. 239–251.
82. Jeong, H. Genome sequence thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* KCTC 17555 / H. Jeong, D.H. Lee, S.H. Kim, H.J. Kim K. Lee, J.Y. Song, B.K. Kim, B.H. Sung, J.C. Park, J.H. Sohn, H.M. Koo, J. F. Kim // *Eukaryot Cell*. — 2012. — V.11. — №12. — P.1584–1585
83. Jianzhong, Z. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis / Z. Jianzhong, L. Xiaoli, J. Hanhu, D. Mingsheng // *Food Microbiol.* — 2009. — V. 26. — P. 770–775.
84. Johnston, J.R. Breeding yeasts for brewing I. Isolation of breeding strains / J.R. Johnston // *J. Inst. Brew.* — 1965. — V. 71. — P. 130.
85. Kaneko, Y. Reexamination of *Saccharomyces bayanus* strains by DNA-DNA hybridization and electrophoretic karyotyping / Y. Kaneko, I. Banno // *IFO Res. Comm.* — 1991. — V. 15. — P. 30–41.
86. Kellis, M. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements / M. Kellis, N. Patterson, M. Endrizzi, B. Birren, E. S. Lander // *Nature*. — 2003. — V. 423. — P. 241–254.
87. Kentaro, I. Complete genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777, a nonconventional thermotolerant yeast / Kentaro, I, Jun I, Kiyotaka Y.H., Masao M., Tomohisa H., Akihiko K. // *Genome Announcements Journals ASM*. — 2015. — V. 3. — № 2 — e00389-15.
88. Kudrjawzew, W.I. Die systematic der Hefen / W.I. Kudrjawzew // *Academic verlag. Berlin*. — 1960. — S. 275–276.
89. Kurtzman, C.P. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences / C.P. Kurtzman, C.J.

- Robnett // *Ant. van Leeuwenhoek.* — 1998. — V.73. — P. 331–371.
90. Kurtzman, C.P. *The Yeasts, a Taxonomic Study* / 4th revised and enlarged edition / C.P. Kurtzman, J.W. Fell (eds.) // Amsterdam: Elsevier Science B.V. — 1998. — P.1055
91. Kurtzman, C.P. Proposal to conserve *Kluyveromyces* with a conserved type (*Ascomycota: Hemiascomycetes, Saccharomycetaceae*) / C.P. Kurtzman, M.-A. Lachance, H.-V. Nguyen, H. Prillinger // *Taxon.* — 2001. — V. 50. — P. 907–908.
92. 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 *Zygorhynchus* / C.P. Kurtzman // *FEMS Yeast Res.* — 2003. — V. 4. — P. 233–245.
93. Kurtzman, C.P. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces* complex” determined from multigene sequence analyses / C.P. Kurtzman, C.J. Robnett // *FEMS Yeast Res.* — 2003. — V. 3. — P. 417–432.
94. Lachance, M.-A. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. *The Yeasts. A taxonomic study.* 4th ed. / M.-A. Lachance, Eds. C.P. Kurtzman, J.W. Fell // Amsterdam: Elsevier Science. — 1998. — P. 227–247.
95. Lachance, M.-A. *Kluyveromyces* van der Walt (1971) *The Yeasts, A Taxonomic Study* / M.-A. Lachance, Eds. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout // Amsterdam: Elsevier. — 2011. — P. 471–482.
96. Lahtchev, K.L. Construction of hybrid yeasts with increased flocculation for white wine manufacture / K.L. Lahtchev, M. Pesheva, O. Tzvetanov // *J. Wine Research.* — 1991. — V. 2. — №3. — P. 191–201.
97. Lehmann, P.F. Antifungal compounds (“killer factors”) produced by *Kluyveromyces* species and their deflection on an improved medium containing glycerol / P.F. Lehmann, M.B. Lemon, W.J. Ferencak III // *Mycologia.* — 1987. — V. 79. — №5.

— P. 790–794.

98. Leonardo, J.M. Identification of upstream activator sequences that regulate induction of the beta-galactosidase gene in *Kluyveromyces lactis* / J.M. Leonardo, S.M. Bhairi, R.C. Dickson // Mol. and Cell Biol. — 1987. — V.7. — №12. — P.4369–4376.
99. Liljeström, P. The nucleotide sequence of the *MEL1* gene/ P. Liljeström // Nucl. Acids Res. — 1985. — V. 13. — No. 20. — P. 7257–7268.
100. Limtong, S. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* / S. Limtong, C. Sringiew, W. Yongmanitchai// Biores. Technol. — 2007. — V. 98. — P. 3367–3374.
101. List of cultures. Fungi (filamentous fungi and yeasts). Bacteria. Plasmids. Phages // 35th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Fungal Biodiversity. Center. The Netherlands Culture Collection of Bacteria (NCCB). Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. — 2001. — 687 p.
102. Liti, G. Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex / G. Liti, A. Peruffo, S. A. James, I. N. Roberts, E. J. Louis // Yeast.— 2005. — V. 22. — P. 177–192.
103. Liti, G. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces* / G. Liti, B. David, H. Barton, E.J. Louis // Genetics. — 2006. — V. 174. — P. 839–850.
104. Liti, G. Population genomics of domestic and wild yeasts / G. Liti, D.M. Carter, A.M. Moses, J. Warringer et al. // Nature. — 2009. — V. 458. — P. 337–341.
105. Liti, G. High quality de novo sequencing and assembly of the *Saccharomyces arboricolus* genome / G. Liti, A. N. Nguyen Ba, M. Blythe, C. A. Müller, A. Bergström, F. A. Cubillos, F. Dafhnis-Calas, Sh.Khoshraftar, S. Malla, N. Mehta, C. C. Siow, J. Warringer, A. M. Moses, E. J. Louis, C. A. Nieduszynski // BMC Genomics. — 2013. — V. 14. — P. 69.

106. Lodder, J. The Yeast, a Taxonomic Study / J. Lodder, N.J.W. Kreger-van Rij // North-Holland publishing company, Amsterdam. – 1952.
107. Lodder, J. (ed.) Yeasts, a Taxonomic Study / 2nd revised and enlarged edition/ J. (ed.) Lodder // North-Holland Publ. Company. Delft. The Netherlands. — 1970. — P. 1385.
108. Lopandic, K. Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* / K. Lopandic, H.Gangl, E. Wallner, G. Tscheik, G. Leitner, A. Querol, N. Borth, M. Breitenbach, H. Prillinger, W.Tiefenbrunner // FEMS Yeast Res. — 2007. — V. 7. — P. 953–965.
109. Louis, E.J. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae* / E.J. Louis, J.E. Haber // Genetics. — 1992—V. 131. — P.559–574.
110. Louis, E.J. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics / E.J.Louis, E.S.Naumova, A.Lee, G.Naumov, J.E. Haber // Genetics. — 1994.—V. 136. —P.789–802.
111. Maccaferri, S. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in CACO-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system / S. Maccaferri, A. Klinder, P. Brigidi, P. Cavina, A. Costabile // Applied and Environmental Microbiology. — 2012. — V.78. — №4. — P. 956–964
112. Magge, B.B. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species / B.B. Magge, T.M. D'Souza, P.T. Magge // J. Bacteriol. — 1987. — V. 169. — №4. — P. 1639–1643.
113. Martini A. Ibridazione DNA/DNA tra specie di lieviti del genere *Kluyveromyces* /A. Martini // Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia. — 1973. — V.28. — P.1–15.
114. Masneuf-Pomarede, I. Molecular typing of wine yeast strains *S. bayanus* var. *uvarum* using microsattelite markers / I. Masneuf-Pomarede, C. Le Jeune, P. Durrens, M. Lollier, M. Aigle, D. Dubourdieu // Syst. Appl. Microbiol. — 2007. — V. 30. — P.

75–82.

115. McMillan, J.D. Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* / J.D. McMillan, M.M. Newman, D.W. Templeton, A. Mohagheghi // Appl. Biochem. Biotechnol. — 1999. — V. 77–79. — P. 649–666.
116. Metchnikoff, EE. Prolongation of life: Optimistic studies / E.E. Metchnikoff // New York: Putman's Sons. . — 1908. — P. 161–183
117. Meyen, J. Jahresbericht über die Resultate der Arbeiten im Felde der physiologischen Botanik von der Jahre / J. Meyen // Arch. Naturgesch. zweiter Band. — 1838. — V. 4. — P. 1–186.
118. Meyrath, J. Economic Microbiology. Microbial Biomass / J. Meyrath, K. Bayer // Ed. A.H. Rose. London: Acad. Press. — 1979. — V.4. — P.207–269.
119. Mikata, K. Three new species of *Saccharomyces* sensu lato van der Walt from Yaku Island in Japan: *Saccharomyces naganishii* sp. nov., *Saccharomyces humaticus* sp. nov. and *Saccharomyces yakushimaensis* sp. nov. / K.Mikata, K. Ueda-Nishimura, T. Hisatomi // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2001. — V. 51. — P. 2189–2198.
120. Molina, F.I. PCR amplification of the 3'-external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces* / F.I. Molina, Sh.-Ch. Jong, J.L. Huffman // FEMS Microbiol. Lett. — 1993. — V. 108. — P. 259–264.
121. Montrocher, R. Phylogenetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences / R. Montrocher, M.-C. Verner, J. Briolay, C. Gautier, R. Marmeisse // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1998— V. 48. — P. 295–303.
122. Mortimer, R.K. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 11 / R.K. Mortimer, C.R. Contopoulou, J.S. King // Yeast. — 1992. — V. 8. — P. 817–902.
123. Mustacchi, G. Trial # 130.1: verification of the capacity of colonization of the gastrointestinal tract in healthy subjects, after the utilization of the lactic yeast

- Kluyveromyces marxianus fragilis* BO399, through examination of the feces / prof. G. Mustacchi; dr. T. De Monte; dr. F. Bearzi ;dr. Flaviano Collavini; dr. P. Valles; dr. P. Lovrovich // Turval, Udine, Italy. http://www.turval.com/research/humans_and_nutrition/. — 2010.
124. Nadal, D. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains / D. Nadal, D. Carro, J. Fernandes'-Larrea, B. Pina // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1999. — V. 65. — № 4. — P. 1688–1695.
125. Nagahama, T. *Kluyveromyces nonfermentas* sp. nov., a new yeast species isolated from the deep sea / T. Nagahama, M. Hamamoto, T. Nakase, K. Horikoshi // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1999. — V. 49. — P.1899–1905.
126. Naumov, G.I. Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts / G.I. Naumov // *Studies in Mycology.* — 1987. — V. 30. — P. 469–475.
127. Naumov, G.I. A new family of polymorphic genes in *Saccharomyces cerevisiae*: α -galactosidase genes *MEL1-MEL7* / G. Naumov, H. Turakainen, E. Naumova, S. Aho, M. Korhola // *Mol. Gen. Genet.* — 1990. — V. 224. — P. 119–128.
128. Naumov, G.I. Polymeric genes *MEL8*, *MEL9* and *MEL10* – new members of α -galactosidase gene family in *Saccharomyces cerevisiae* / G. Naumov, E. Naumova, H. Turakainen, P. Suominen, M. Korhola // *Curr. Genet.* — 1991. — V. 20. — P. 269–276.
129. Naumov, G.I. Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus* electrophoretic karyotypes / G.I. Naumov, E.S. Naumova, R.A. Lantto, E.J. Louis, M. Korhola // *Yeast.* — 1992. — V. 8. — P. 599–612.
130. Naumov, G.I. Identification of new chromosomes of *Saccharomyces bayanus* using gene probes from *S. cerevisiae* / G.I. Naumov, E.S. Naumova, C.Gaillardin, H.Turakainen, M. Korhola / *Hereditas.* — 1994a. — V. 120. — P.121–126.
131. Naumov, G.I. Genetic variation of the repeated mal loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* / G.I. Naumov, E.S.

- Naumova, C.A. Michels // Genetics. — 1994b. — V.136. — P.803–812.
132. Naumov, G.I. Chromosomal polymorphism of *MEL* genes in some populations of *Saccharomyces cerevisiae* / G.I. Naumov, E.S. Naumova, M.P. Korhola // FEMS Microbiol. Lett. — 1995a. — V. 127. — P. 41–45.
133. Naumov, G.I. Genetic mapping of the α -galactosidase *MEL* gene family on right and left telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* / G.I. Naumov, E.S. Naumova, E.J. Louis // Yeast. — 1995b. — V. 11. — P.481–483.
134. Naumov, G.I. A new genetically isolated population of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Brazil / G.I. Naumov, E.S. Naumova, A.N. Hagler, L.C. Mendonca-Hagler, E.J. Louis // Antonie van Leeuwenhoek. — 1995c. — V. 67. — P. 351–355.
135. Naumov, G.I. Two new genetically isolated populations of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Japan / G.I. Naumov, E.S. Naumova, E.J. Louis // J. Gen. Appl. Microbiol. — 1995d. — V. 41. — P. 499–505.
136. Naumov, G.I. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex / G.I. Naumov // J. Indust. Microbiol.— 1996a. — V. 17. — P. 295–302.
137. Naumov, G.I. Genetic reidentification of *Saccharomyces* strains associated with black knot disease of trees in Ontario and *Drosophila* species in California / G.I. Naumov, E.S. Naumova, E.D. Sancho // Can. J. Microbiol. — 1996b. — V. 42. — P. 335–339.
138. Naumov, G.I. Polymeric *SUC* genes in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* / G.I. Naumov, E.S. Naumova, E.D. Sancho, M.P. Korhola // FEMS Microbiol. Lett. — 1996c. — V. 135. — P. 31–35.
139. Naumov, G.I. Identification of the α -galactosidase *MEL* genes in some populations of *Saccharomyces cerevisiae*: a new gene *MEL11* / G.I. Naumov, E.S. Naumova, H. Turakainen, M.P. Korhola // Genet. Res. Camb. — 1996d. — V. 67. — P. 101–108.
140. Naumov, G.I. Differentiation of European and Far East Asian populations of

- Saccharomyces paradoxus* by allozyme analysis / G.I. Naumov, E.S. Naumova, P.D. Sniegowski // Int. J. System. Bacteriol. — 1997. — V. 47. — P. 341–344.
141. Naumov, G.I. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks / G.I. Naumov, E.S. Naumova, P.D. Sniegowski // Can. J. Microbiol. — 1998. — V. 44. — P. 1045–1050.
142. Naumov, G.I. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae* / G.I. Naumov, S.A. James, E.S. Naumova, E.J. Louis, I.N. Roberts // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2000a. — V. 50. — P. 1931–1942.
143. Naumov, G.I. Association of *S. bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations / G. I.Naumov, I. Masneuf, E. S. Naumova, M. Aigle, D. Dubourdiou // Res. Microbiol. — 2000b. — V.151. — P. 683–691.
144. Naumov, G.I. Natural polyploidization of some cultured yeast *Saccharomyces sensu stricto*: auto- and allotetraploidy / G.I. Naumov, E.S. Naumova, I. Masneuf, M. Aigle, V.I. Kondratieva, D. Dubourdiou // Natural System. Appl. Microbiol. — 2000c. — V. 23. — P. 442–449.
145. Naumov, G.I. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast / G.I. Naumov, H.-V. Nguyen, E.S. Naumova, A. Michel, M. Aigle, C. Gaillardin // Int. J. Food Microbiol. — 2001a. — V. 65. — P. 163–171.
146. Naumov, G. I. Genetic identification of cultured *Saccharomyces* yeasts from Asia / G. I. Naumov , E. S. Naumova, I. V. Korshunova // J. Gen. Appl. Microbiol. — 2001b. — V. 47— P.335–338.
147. Naumov, G.I. Five new combinations in the yeast genus *Zygofabospora* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data / G.I. Naumov, E.S. Naumova // FEMS Yeast Research. — 2002. — V. 2. — P. 39–46.
148. Naumov, G.I. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary / G.I. Naumov, E.S. Naumova, A. Antunovics, M. Sipiczki // Appl.

- Microbiol. Biotechnol. — 2002. — V. 59. — № 6. — P. 727–730.
149. Naumov, G.I. Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai / G.I. Naumov, E.S. Naumova, I. Masneuf-Pomarède // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 2010. — V. 98. — P. 1–7.
150. Naumov, G.I. Molecular genetic diversity of the *Saccharomyces* yeasts in Taiwan: *S. arboricola*, *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* / G.I. Naumov, C.-F. Lee, E.S. Naumova // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 2013. — V. 103. — P. 217–228.
151. Naumova, E.S. Superfamily of α -galactosidase *MEL* genes of the *Saccharomyces sensu stricto* species complex / E.S. Naumova, H. Turakainen, G.I. Naumov, M. Korhola // *Mol. Gen. Genet.* — 1996. — V. 253. — P. 111–117.
152. Naumova, E.S. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer / E.S. Naumova, I.V. Korshunova, L. Jespersen, G.I. Naumov // *FEMS Yeast Res.* — 2003. — P. 177–184.
153. Naumova, E.S. Molecular genetic differentiation of the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives / E.S. Naumova, N.N. Sukhotina, G.I. Naumov // *FEMS Yeast Research*. — 2004. — V.5. — №3. — P.263–269.
154. Naumova, E.S. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae* / E.S. Naumova, G.I. Naumov, I. Masneuf-Pomarede, M. Aigle, D. Dubordieu // *Yeast*. — 2005. — V. 22. — № 14. — P. 1099–1115.
155. Naumova, E.S. Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes / E. S. Naumova, G. I. Naumov, Y. V. Michailova, N. N. Martynenko, I. Masneuf-Pomarède // *Research in Microbiology*. — 2010. — V. 162. №2. — P. 204–13.
156. Naumova, E.S. Molecular polymorphism of α -galactosidase *MEL* genes of *Saccharomyces* yeasts / E.S. Naumova, E.V. Serpova, I.V. Korshunova, G.I. Naumov // *Microbiology (Moscow)*. — 2011. — V. 80. — № 4. — P. 502–513.
157. Needleman, R. Control of maltase synthesis in yeast / R. Needleman // *Mol.*

- Microbiol. — 1991. V. 5. — № 9. — P. 2079–2084.
158. Ness, F. RTM1: a member of a new family of telomeric repeated genes in yeast. / F. Ness, M. Aigle // Genetics. — 1995. — V.140 — P. 945–956.
159. Nguyen, H.-V. Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit / H.-V. Nguyen, C. Gaillardin // System. Appl. Microbiol. — 1997. — V. 20. — P. 286–294.
160. Nguyen, H.-V. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380 / H.-V. Nguyen, A.Lepingle, C. Gaillardin // System. Appl. Microbiol. — 2000a. — V. 23. — P. 71–85.
161. Nguyen, H.-V. Rapid differentiation of the closely related *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* strains isolated from dairy products using selective media and PCR/RFLP of the rDNA non-transcribed spacer 2 / H.-V. Nguyen, F. Pulvirenti, C. Gaillardin // Can. J. Microbiol. — 2000b. — V. 46. — P. 1115–1122.
162. Nguyen, H-V. Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species / H-V. Nguyen, C. Gaillardin // FEMS Yeast Res. — 2005. — V.5. — P. 471–483.
163. Oda, Y. α -Galactosidase from the yeast *Torulasporea delbrueckii* IFO 1255 / Y. Oda, K.Tonomura // J. Appl. Bacteriol. — 1996. — V. 80. — P. 203–208.
164. Oda, Y. Detection of maltose fermentation genes in the baking yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* / Y. Oda Y, K. Tonomura // Lett. Appl. Microbiol. — 1996. — V. 23. — № 4. — P. 266–268.
165. Oda, Y. A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S – 28S rRNA spacer regions / Y. Oda, M. Yabuki, K. Tonomura, M. Fukunaga // Yeast.

- 1997. — V. 13. — P. 1243–1250.
166. Oda, Y. Sequence analysis of 18S – 28S rRNA spacer regions from *Saccharomyces kunashirensis*, *Saccharomyces martiniae*, *Saccharomyces rosinii* and *Saccharomyces transvaalensis* / Y. Oda, M. Yabuki, K. Tonomura, M. Fukunaga // *Curr. Microbiol.* — 1999. — V. 38. — P. 61–63.
167. Oda, Y. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains by the *SUC2* gene sequences / Yu. Oda, D. Micumo, F. Leo, T. Urashima // *J. Gen. Appl. Microbiol.* — 2010. — V. 56. — P.355–358.
168. Peterson, S.W. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts / S.W. Peterson, C.P. Kurtzman // *Syst. Appl. Microbiol.* — 1991. — V. 14. — P. 124–129.
169. Phaff, H.J. The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California / H.J. Phaff, M.W. Miller, M. Shifrine // *Ant. van Leeuwenhoek.* — 1956. — V. 22. — P. 145–161.
170. Price, C.W. Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within thin the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia* / C.W. Price, G.B. Fuson, H.J. Phaff, C.W. Price, G.B. Fuson, H.J. Phaff // *Microbiol. Rev.* — — V. 24. — P. 161–193.
171. Primrose, J. The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species / J. Primrose, Boynton, G. Duncan // *Yeast.* — 2014. — 31. — P. 449–462.
172. Rosini, G. Systematics of the species of the yeast genus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry / G. Rosini, F. Federici, A.E. Vaughan, A.Martini // *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1982. — V. 15. — P. 188–193.
173. Rubio-Teixeira, M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces LAC* genes // *Biotechnol. Advanc.* — 2006. — V.24. — P. 212–225.
174. Sampaio, J.P Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* / J.P.

- Sampaio, P. Gonçalves // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — V.7. — P. 2144–2152.
175. Sarokin, L. Comparison of two yeast invertase genes: conservation of the upstream regulatory region / L. Sarokin, M. Carlson // Nucl. Acids Res. — 1985. — V.13. — P. 6089–6103.
176. Sarokin, L. Short repeated elements in the upstream regulatory region of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* / L. Sarokin, M. Carlson // Mol. Cell. Biol. — 1986. — V.6. — №7. — P. 2324–2333.
177. Schamhart, D. H. J. Isolation of a catabolite repression mutant of yeast as a revertant of a strain that is maltose negative in the respiratory-deficient state / D. H. J. Schamhart, A. M. A. ten Berge, K. W. van de Poll // J. Bacteriol. — 1975. — V. 121. — №3. — P. 747–752.
178. Sceda, R. The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts / R. Sceda, D. Yarrow // Arch. Mikrobiol. — 1966. — V. 55. — P. 209–225.
179. Sceda, R. Variation in the fermentation pattern of some *Saccharomyces* species / R. Sceda, D. Yarrow // Arch. Mikrobiol. — 1968. — V. 61. — P. 310–316.
180. Shehata, A.M. Yeast isolated from *Drosophila* and from their suspected feeding places in Southern and Central California / A.M. Shehata, E.M. Mrak, H.J. Phaff // Mycologia. — 1955. — V.47. — P. 799–811.
181. Sidenberg, D.G. Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* populations and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt / D.G. Sidenberg, M.-A. Lachance // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1986. — V. 36. — P.94–102.
182. Sniegowski, P.D. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics / P.D. Sniegowski, P.G. Dombrowski, E. Fingerhahn // FEMS Yeast Research. — 2002. — V. 1. — P. 299–306.
183. Sor, F. Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces* / F. Sor,

- H. Fukuhara // Yeast. — 1989. — V.5. — P.1–10.
184. Spencer, J.F.T. Hybridization of non – sporulating and weakly sporulating strains of brewer’s and distiller’s yeasts / J.F.T. Spencer, D.M. Spencer // J. Inst. Brew. — 1977. — V. 83. — P. 287.
185. Spiller, R. Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome / R. Spiller // Aliment. Pharmacol. Ther. — 2008. — V.28. — P. 385–396.
186. Stelling-Dekker, N.M. Die Hefesammlung des “Centraalbureau voor Schimmelcultures”, Beiträge zu einer Monographie der Hefearten I. Teil, die sporogenen Hefen / N.M. Stelling-Dekker // Verh. K. Ned. Akad. Wet. Afd. Natuurk., Sect. II. — 1931. — B. 28. — S.1–547.
187. Stewart, G.G. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry / G.G. Stewart, I. Russel // J. Inst. Brew. — 1986. — V. 92. — P. 537–558.
188. Stribny, J. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors / J. Stribny, A. Gamero, R. Pérez-Torrado, A. Querol // Int J Food Microbiol. — 2015. — V.205. — P. 41–46.
189. Sumner-Smith, M. Conservation and variability of wheat alpha/beta gliadin genes / M. Sumner-Smith, J. Rafalski, T. Sugiyama, M. Stoll, D. Söll // Nucl. Acids Res. — 1985. — V. 13. — P. 3905–3916.
190. Suryawati, L. Simultaneous saccharification and fermentation of kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4 / L. Suryawati, M.R. Wilkins, D.D. Bellmer, R.L. Huhnke, N.O. Maness, I.M. Banat // Biotechnol. Bioeng. — 2008.—V. 101.—N.5.—P. 894–902.
191. Suzuki, T. Draft genome sequence of *Kluyveromyces marxianus* strain DMB1, isolated from sugarcane bagasse hydrolysate / T. Suzuki, T. Hoshino, A. Matsushika // Genome Announc. — 2014. — V.2. — №4. — e 00733–14
192. Taussing, R. Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase / R. Taussing,

- M. Carlson // Nucl. Acids Res.—1983.—V.11.—P.1943–1954.
193. Tsai, Chen-ko. Hybridization and selection of yeasts. I. Effect of maltose genes or maltose fermentation ability in *Saccharomyces* / Chen-ko Tsai, Bo-run Chang, Hui-ping Liu // II Acta Genetica Sinica. — 1978. — V. 5. — P. 9–18.
194. Turakainen, H. Cloning, sequence and chromosomal location of a *MEL* gene from *Saccharomyces carlsbergensis* NCYC396 / H. Turakainen, M. Korhola, S. Aho // — Gene. — 1991. — V. 101. — P. 97–104.
195. Turakainen, H. Physical mapping of the *MEL* gene family in *Saccharomyces cerevisiae* / H. Turakainen, G. Naumov, E. Naumova, M. Korhola // Curr. Genet. — 1993a. — V. 24. — P. 461–464.
196. Turakainen, H. *MEL* gene polymorphism in the genus *Saccharomyces* / H. Turakainen, S. Aho., M. Korhola // Appl. Environ. Microbiol. — 1993b. — V. 59. — No. 8. — P. 2622–2630.
197. Turakainen, H. Characterization of *MEL* genes in the genus *Zygosaccharomyces* / H. Turakainen, M. Hankaanpää, M. Korhola, S. Aho / Yeast. — 1994. — V. 10. — P. 733–745.
198. Valderrama, M.-J. A differential medium for the isolation of *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces lactis* from dairy products / M.-J. Valderrama, M.I. De Silóniz, P. Gonzalo, J.M. Peinado // J. Food Prot. — 1999. — V. 62. — N. 2. — P. 189–193.
199. Valente, P. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures / P. Valente, F.C. Gouveia, G.A. de Lemos, D. Pimentel, J.D. van Elsas, L.C. Mendonça-Hagler, A.N. Hagler // FEMS Microbiol. Lett. — 1996. — V. 137. — P. 253–256.
200. van der Walt, J.P. *Kluyveromyces* – a new yeast genus of the Endomycetales / J.P. van der Walt // Ant. van Leeuwenhoek. — 1956a. — V. 22. — P. 265–272.
201. van der Walt, J.P. The yeast *Kuyveromyces africanus* nov. spec. and its phylogenetic

- significance / J.P. van der Walt // *Ant. van Leeuwenhoek*. — 1956b. — V.22. — P. 321–326.
202. van der Walt, J.P. *Saccharomyces vanudenii* nov. spec. / J.P. van der Walt, E.E. Nel // *Mycopathol. Mycol. Appl.* — 1963. — V.20. — P.71–74.
203. van der Walt, J.P. The emendation of the genus *Kluyveromyces* v. d. Walt / van der Walt J.P. // *Ant. van Leeuwenhoek*. — 1965. — V. 31. — P. 341–348.
204. van der Walt, J.P. Genus 16. *Saccharomyces* Meyen emend. Reess In Lodder J. (Ed.), *The Yeast, a Taxonomic Study*, 2nd ed. / J.P. van der Walt // North-Holland Publishing Company, Amsterdam. — 1970a. — P. 555–718.
205. van der Walt, J.P. Genus 8. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt / J.P. van der Walt // *The yeasts. A taxonomic study*. Ed. Lodder J. 2nd ed. Amsterdam, London: Elsevier Sci. Publ. B.V. — 1970b. — P. 316–378.
206. van der Walt, J.P. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt, in “*The Yeasts, a taxonomic study*” (N.J.W. Kreger-van Rij (ed.) / J.P. van der Walt, E. Johannsen // Elsevier Science Publishers B.Y. Amsterdam, — 1984. — P. 224.
207. van Ooyen, A.J. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis* / A.J. van Ooyen, P. Dekker, M. Huang, M.M. Olsthoorn, D.I. Jacobs, P.A. Colussi, C.H. Taron // *FEMS Yeast Res.* — 2006. — V. 6 — №.3 — P.381–92.
208. Vaughan-Martini, A. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto* / A.Vaughan-Martini, C.P. Kurtzman // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1985. — V. 35. — № 4. — P. 508–511.
209. Vaughan-Martini, A. Perfect-imperfect relationship within the yeast genus *Kluyveromyces* / A. Vaughan-Martini, A. Martini // *Ann. Microbiol.* — 1985. — V.35. — P.93–97.
210. Vaughan Martini, A. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto* / A.Vaughan Martini, A. Martini // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 1987a. — V. 53. — P. 77–84.

211. Vaughan-Martini, A. Taxonomic revision of the yeast genus *Kluyveromyces* by nuclear deoxyribonucleic acid reassociation / A.Vaughan-Martini, A. Martini // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1987b. — V. 37. — 380–385.
212. Vaughan Martini, A. *Saccharomyces paradoxus* comb. nov., a newly separated species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologies / A. Vaughan Martini // System. Appl. Microbiol. — 1989. — V. 12. — P. 179–182.
213. Vaughan-Martini, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870). In: The yeasts, a taxonomic study. Eds Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. / A.Vaughan-Martini, A. Martini // Amsterdam: Elsevier. — 2011. — P. 733–746.
214. Ventura, M. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. / M. Ventura, et al. // Nat. Rev. Microbiol. — 2009. — V.7. — P. 61–71.
215. Vilgalys, R. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species / R. Vilgalys, M. Hester // J. Bacteriol.— 1990. — V. 172. — №8. — P. 4238–4246.
216. Vollrath, D. Physical mapping of large DNA by chromosome fragmentation / D. Vollrath, R.W. Davis, C. Connelly, P. Hieter // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1988. — V. 85. — P. 6027–6031.
217. Wang, S.-A. *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark / S.-A. Wang, F.-Y. Bai // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2008. — V. 58. — P. 510–514.
218. Wassenaar, T. M. Safety aspects and implications of regulation of probiotic bacteria in food and food supplements / T. M. Wassenaar, G. Klein // J. Food Prot. — 2008. — V.7. — P. 1734–1741.
219. Wésolowski, M. Killer DNA plasmids of the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Mutations affecting the killer phenotype / M. Wésolowski, A. Algeri, P.Goffrini, H. Fukuhara // Curr. Genetics. — 1982. —V.5. — P.191–197.
220. Wickerham, L.J. Hybridization studies involving *Saccharomyces lactis* and

- Zyfosaccharomyces ashbyi* / L.J. Wickerham, K.A. Burton // J. Bacteriol. — 1956a. — V. 71. — №3. — P. 290–295.
221. Wickerham, L.J. Hybridization studies involving *Saccharomyces fragilis* and *Zyfosaccharomyces dobzhanskii* / L.J. Wickerham, K.A. Burton // J. Bacteriol. — 1956b. — V.71. — №3. — P.296–302.
222. Williams, D.W. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA / D.W. Williams, M.J. Wilson, M.A.O. Lewis, A.J.C Potts // J. Clin. Microbiol. — 1995. — V. 33. — №9. — P. 2476–2479.
223. Winge, Ö. On 14 new yeast types, produced by hybridization / Ö.Winge, O. Laustsen // C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sér. Physiol. — 1939. — V. 22. — P. 337–355.
224. Wingren, A. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks/ A. Wingren, M. Galbe, G. Zacchi // Biotechnol. Prog. — 2003. — V. 19. — P. 1109–1117.
225. Yarrow, D. Genus 22. *Saccharomyces* Meyen ex Reess / D. Yarrow // The yeasts a taxonomic study // Ed. Kreger-van Rij N.J.W. 3rd edn. / D. Yarrow // Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. — 1984. — P. 379–395.
226. Zakian, V.A. Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres / V.A. Zakian //Ann. Rev. Genet. — 1996.— V. 30 —P.141–172.
227. Голубев, В.И. Спектр действия микоцинов *Kluyveromyces lactis* / В.И. Голубев // Микробиология. — 2013а. — Т. 82. — №1. — С. 79–86.
228. Голубев, В.И. Фунгицидная активность дрожжей, выделенных из чала / В.И. Голубев // Прикладная биохимия и микробиология. — 2013б. — Т. 49. — №2. — С. 175–180.
229. Голубев, В.И. Отбор и характеристика дрожжей активно сбраживающих лактозу

- / В.И. Голубев, Н.В. Голубев // Прикладная биохимия и микробиология. — 2004. — Т. 40. — №3. — С. 332–336.
230. Грачева, И.М. Технология ферментных препаратов – 3 – е издание, переработанное и доп. / И.М. Грачева, А.Ю. Кривова // М.: Изд-во «Элевар». — 2000.— С. 512.
231. Захаров, И.А. Мутации в локусе типа спаривания и выведение высокогомозиготных линий *Saccharomyces cerevisiae* / И.А. Захаров, Б.В. Симаров // Генетика. — 1966. — № 3. — С. 118–122
232. Коршунова, И. В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ β -фруктозидаз дрожжей рода *Saccharomyces* / И. В. Коршунова, Е. С.Наумова, Г. И. Наумов // Молекуляр. биология. — 2005. — Т. 39. — С. 413–419. (Для англ. версии - Korshunova I.V. Comparative molecular-genetic analysis of the beta-fructosidases of yeasts *Saccharomyces* / I.V. Korshunova, E.S. Naumova, G.I. Naumov // Mol. Biol. (Mosk.). — 2005. — V. 39. — P. 366–371.)
233. Кудрявцев, В.И. Систематика дрожжей / В.И. Кудрявцев // М.: Изд-во АН СССР. — 1954. — С.427.
234. Кудрявцев, В.И. Каталог культур Всесоюзной коллекции непатогенных микроорганизмов / В.И. Кудрявцев (отв. ред.) // М.: Наука. — 1976. — 237с.
235. Маринченко, В. А. Технология спирта. Под ред. Смирнова В.А. / В. А. Маринченко, В. А. Смирнов, Б. А. Устинников и др. // М.: Легкая и пищевая промышленность. — 1981.
236. Мартыненко, Н.Н. Современные препаративные формы дрожжей для виноделия / Н.Н. Мартыненко // М.: Россельхозиздат. — 2006. — С.276
237. Наумов, Г.И. К вопросу о генетической изоляции дрожжей *Saccharomyces* / Г.И. Наумов // Вестн. Моск. ун-та. Биол., почв. — 1969. — № 4. — С. 44.
238. Наумов, Г.И. Изменчивость биохимических признаков, используемых в

- таксономии дрожжей *Saccharomyces* / Г.И. Наумов, В.В. Юркевич // Успехи совр. биол. — 1970. — Т. 70. — вып. 3(6). — С. 315–125.
239. Наумов, Г.И. Биологический вид *Saccharomyces terrestris* / Г. И. Наумов // ДАН СССР. — 1979а. — Т. 249. — № 5. — С. 1228–1230.
240. Наумов, Г.И. Генетические основы классификации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучение скрещиваемости / Г.И. Наумов // Журнал общ. биол. — 1979б. — Т 40. — № 2. — С. 282–288.
241. Наумов, Г.И. Генетические основы классификации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучение выживаемости аскоспор гибридов / Г. И. Наумов, В. И. Кондратьева, Т. И. Наумова, Н. К. Гудкова // Журнал общей биологии. — 1983. — Т. XLIV. — № 5. — С. 648–660.
242. Наумов, Г.И. В кн.: Основные направления генетики микроорганизмов / Г.И. Наумов // М.: Наука. — 1985. — С. 35–44.
243. Наумов, Г.И. Генетическая дифференциация и экология дрожжей *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaia / Г.И. Наумов // ДАН СССР. — 1986. — Т. 291. — № 3. — С. 754–757.
244. Наумов, Г.И. Методы гибридизации гомоталличных дрожжей диплонтов и гаплонтов / Г.И. Наумов, В.И. Кондратьева, Е.С. Наумова// Биотехнология. — 1986. — № 6. — С. 33–36.
245. Наумов, Г.И. Геносистематика дрожжей рода *Kluveromyces* Kudriavzev emend. G. Naumov / Г.И. Наумов // Молек. генетика микробиол. и вирусол. — 1986а. — №5. — С. 10–13.
246. Наумов, Г.И. Дивергенция геномов культурных и диких дрожжей *Saccharomyces sensu stricto*: четыре вида-двойника / Г.И. Наумов, Т. А. Никоненко // ДАН. — 1987. — Т. 294. — №2. — С. 476–479.

247. Наумов, Г.И. Геносистематика дрожжей-аскомицетов (К выходу определителя “The yeasts. A taxonomic study”. 1984) / Г.И. Наумов // Микробиология. — 1987а. — Т.56. — Вып. 3. — С. 521–524.
248. Наумов, Г.И. Номенклатура дрожжевого рода *Zygofabospora* Kudriavzev emend. G. Naumov / Г.И. Наумов // Микол. фитопатол. — 1987б. — Т. 21. — №2. — С. 134–140.
249. Наумов, Г.И. Итоги геносистематики дрожжей родов *Williopsis* Zender и *Zygowilliopsis* Kudriavzev/ Г.И. Наумов // Молек. генетика микробиол. и вирусол. — 1987в. — №2.— С. 3–7.
250. Наумов, Г.И. Идентификация видов дрожжей рода *Zygofabospora* Kudriavzev emend. G. Naumov / Г.И. Наумов // Микробиология. — 1988. — Т. 57. — №1. — С. 114–118.
251. Наумов, Г.И. Дифференциация генофонда культурных дрожжей *Saccharomyces*: восемь групп культиваров / Г. И. Наумов // Докл. Акад. Наук. — 1989а. — Т. 306. — № 5. — С. 1253–1256.
252. Наумов, Г.И. Идентификация полимерных генов ферментации мелибиозы у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Г.И. Наумов // ДАН. — 1989б. — Т. 304. — №6. — С. 1475–1477.
253. Наумов, Г.И. Физиолого - таксономическое изучение дрожжей производства шампанского непрерывным способом / Г. И. Наумов, Е. С. Наумова, Н. Г. Саришвили, В. Г.Хорошилова, Г. В. Черников // Доклады ВАСХНИЛ. — 1989а. — №12. — С. 34–36.
254. Наумов, Г.И. Генетические основы классификации и идентификации дрожжей (1968-1988) / Г.И. Наумов, В.И. Кондратьева, Б.Д. Ефремов (ред.)/М.: ВНИИгенетика. — 1989б. — С.164

255. Наумов, Г.И. Создание генетических линий шампанских штаммов *Saccharomyces cerevisiae* / Г. И. Наумов, Е. С. Наумова, Н. Г. Саришвили, В. Г. Хорошилова, Г. В. Черников // Доклады ВАСХНИЛ. — 1990. — №5. — С. 39–41.
256. Наумов, Г.И. Реидентификация дрожжей *Zygofabospora lactis* (Dombrowski) G. Naumov из Всесоюзной коллекции микроорганизмов / Г.И. Наумов, Т.Н. Никитина, В.И. Кондратьева // Микробиология. — 1991. — Т. 60. — №5. — С. 915–919.
257. Наумов, Г.И. Генетическая характеристика испанских хересных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* из района Монтия-Морилес / Г. И. Наумов, Ф. Калеро, Е.С. Наумова, Э. Санчо // Биотехнология. — 1994. — № 8. — С. 11–13.
258. Наумов, Г.И. Естественное разнообразие дрожжей – неисчерпаемый генофонд для фундаментальных и прикладных разработок / Г.И. Наумов // Успехи современной биологии. — 1997. — Т. 117. — С. 185–195.
259. Наумов, Г.И. Генетическое картирование нового дивергентного семейства α -галактозидазных генов *MEL* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Г.И. Наумов, Д.Г. Наумов // Биотехнология. — 1997а. — №1. — С. 26–28.
260. Наумов, Г.И. Суперсемейство α -галактозидазных генов *MEL* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Г.И. Наумов, Д.Г. Наумов // ДАН. — 1997б. — Т. 353. — №3. — С. 426–429.
261. Наумов, Г.И. Дивергентная популяция дрожжей *Saccharomyces paradoxus* на Гавайях: вид *in statu nascendi* / Г.И. Наумов // ДАН. — 1999. — Т. 364. — № 2. — С. 281–283.
262. Наумов, Г.И. Новая разновидность *Saccharomyces bayanus* var. *ivarum* comb. nov., установленная генетическим анализом / Г.И. Наумов // Микробиология. — 2000а. — Т. 69. — № 3. — С. 410–414.
263. Наумов, Г.И. Дикий европейский вид *Zygofabospora krassilnikovii* – прародитель

- молочных дрожжей *Z. lactis* / Г.И. Наумов // ДАН. — 2000б. — Т. 372. — №6. — С. 846–849.
264. Наумов, Г.И. Обнаружение биологического вида *Saccharomyces bayanus* в Дальневосточной Азии / Г. И. Наумов, Д.О. Газдиев, Е.С. Наумова // Микробиология. — 2003. — Т. 72. — № 6. — С. 834–839.
265. Наумов, Г.И. Почему дрожжи *Kluveromyces wickerhamii* ассимилируют, но не сбраживают лактозу? / Г.И. Наумов // Докл. АН. — 2005а. — Т. 403. — №6. — С. 847–849.
266. Наумов, Г.И. Доместикация молочных дрожжей *Kluveromyces lactis*: перенос кластера генов β -галактозидазы (*LAC4*) и лактозной пермеазы (*LAC12*)? / Г.И. Наумов // Докл. АН.. — 2005б. — Т. 401. — № 2. — С. 279–281.
267. Наумов, Г.И. Генетика полиморфизма утилизации лактозы у дрожжей *Kluveromyces marxianus* / Г.И. Наумов // Докл. АН.. — 2006. — Т. 409. — №3. — С. 422–424.
268. Наумов, Г.И. Использование гибридизации в селекции эукариотических микроорганизмов / Г.И. Наумов, Е.С. Наумова, В.И. Кондратьева // Генетика. — 2006. — Т. 42. — № 11. — С. 1571–1576.
269. Наумов, Г.И. Ассимиляция мальтозы у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* зависит от дыхания / Г.И. Наумов, С.А. Васильева// Биотехнология. — 2007а. — № 4. — С. 31–33.
270. Наумов, Г.И. Аэробная утилизация мальтозы дрожжами *Saccharomyces paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* и *S. cariocanus* / Г.И. Наумов, С.А. Васильева, И.Ю. Чернов // Микология и фитопатология. — 2007б. — Т. 41. — № 6. — С. 536–540.
271. Наумов, Г.И. Обнаружение суперсемейств лактозных генов *LAC* у дрожжей

- Kluveromyces* / Г.И. Наумов // Докл. АН. — 2008. — Т. 420. — №6. — С. 832–834.
272. Наумов, Г.И. Гибридологический анализ нового биологического вида *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai / Г.И. Наумов // ДАН. — 2009. — Т. 426. — №3. — С. 424-426.
273. Наумов, Г.И. Естественные и индустриально-важные особенности утилизации сахаров у дрожжей *Kluveromyces marxianus* / Г.И. Наумов, Е.С. Наумова, Ы.С. Чой // Биотехнология. — 2010. — №2. — С. 54–58.
274. Наумов, Г.И. Полигенный контроль ферментации бета-фруктозидов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: новые гены *SUC9* и *SUC10* / Г.И. Наумов, Е.С. Наумова // Микробиология. — 2010а. — Т. 79. — С. 180–186. (Для англ. версии – Naumov, G.I. Polygenic control for fermentation of β -fructosides in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: new genes *SUC9* and *SUC10* / G.I. Naumov, E.S. Naumova // Microbiology. — 2010. — V. 79. — P. 160–166).
275. Наумов, Г.И. Сравнительная генетика дрожжей. Новый бета-фруктозидазный ген *SUC8* у *Saccharomyces cerevisiae* / Г.И. Наумов, Е.С. Наумова // Генетика. — 2010б. — Т. 46. — С. 364–372. (Для англ. версии – Naumov, G. I. Comparative genetics of yeasts. A novel β -fructosidase gene *SUC8* in *Saccharomyces cerevisiae* / G.I. Naumov, E.S. Naumova // Russ. J. Genetics. — 2010. — V. 46. — P. 323–330.)
276. Наумов, Г.И. Генетическая идентификация африканских культурных дрожжей *Saccharomyces* / Г. И. Наумов, Е. С. Наумова // Микробиология. — 2011. — Т. 80, N 3. — С. 380–384
277. Наумов, Г.И. Молекулярно-генетическая дифференциация α -глюкозидаз дрожжей: мальтазы и изомальтазы / Г. И. Наумов, Д. Г. Наумов // Микробиология. — 2012. — Т. 81. — С. 301–304. (Для англ. версии – Naumov, G.I. Molecular genetic differentiation of yeast α -glucosidases: maltase and isomaltase

- / G.I. Naumov, D.G. Naumov // Microbiology. — 2012. — V. 81. — P. 276–280).
278. Наумов, Г.И. Обнаружение молочных дрожжей *Kluveromyces lactis* var. *lactis* в природе / Г. И. Наумов, Е. С. Наумова, А. М. Глушакова, А. В. Качалкин, И. Ю. Чернов // Микробиология. — 2014. — Т. 83. — № 6. — С. 677–681
279. Наумов, Г.И. Полимерные гены ферментации лактозы у дрожжей *Kluveromyces lactis*: новый локус *LAC3* / Г.И. Наумов, Е.С. Наумова // Доклады Академии Наук. — 2014. — Т. 455. — №3. — С. 363–365.
280. Наумов, Д.Г. β-фруктозидаза: новое суперсемейство гликозил-гидролаз / Д.Г. Наумов, В.Г. Дорошенко // Молекулярная биология. — 1998. — Т.32. — №5. — С.902–907.
281. Наумова, Е.С. Молекулярные кариотипы различных генетических линий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Е.С. Наумова, Г.И. Наумов, М. Корхола // Биотехнология. — 1993а. — № 4. — С. 2–5.
282. Наумова, Е.С. Селекция шампанских дрожжей на основе межвидовой гибридизации *Saccharomyces cerevisiae* × *S. bayanus* / Е. С. Наумова, Т. В. Черноокова, Т. К. Скорикова, В. И. Кондратьева, Н. И. Бурьян, Г. И. Наумов// Биотехнология. — 1993б. — № 7. — С. 8–13.
283. Наумова, Е.С. Идентификация генов ферментации мальтозы у дрожжей *Saccharomyces paradoxus* / Е.С. Наумова, Г.И. Наумов, К.А. Майклз // Биотехнология. — 1994а. — № 11–12. — С. 3–5.
284. Наумова, Е.С. Молекулярный полиморфизм ферментации мальтозы у природных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* / Е.С. Наумова, Г.И. Наумов, К.А. Майклз, В.Г. Дебабов / ДАН. — 1994б. — Т. 336. — № 2. — С. 276–278.
285. Наумова, Е.С. Молекулярный анализ α-галактозидазных генов *MEL* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Наумова Е. С, И. В. Коршунова, Г. И. Наумов // Молекулярная биология. — 2003. — Т. 37. — №5. — С. 825–833.
286. Наумова, Е.С. Генетическая дифференциация хересных дрожжей *Saccharomyces*

- cerevisiae* / Е. С. Наумова, Ю. В. Иванникова, Г. И. Наумов // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005а. — том 41. — № 6. — С. 656–661.
287. Наумова, Е.С. Молекулярные маркеры, дифференцирующие молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* от их ближайших диких родственников – европейской популяции «krassilnikovii» / Наумова Е.С., Сухотина Н.Н., Наумов Г.И. // Микробиология. — 2005б. — Т. 74. — №3. — С. 387–393.
288. Наумова, Е.С. Молекулярный полиморфизм α -галактозидазных генов *MEL* дрожжей *Saccharomyces* / Е.С. Наумова, Е.В. Серпова, И.В. Коршунова, Г.И. Наумов / Микробиология. — 2011. — Т. 80 — №4. — С. 496–507.
289. Наумова, Е.С. Молекулярно-генетическая характеристика в селекции спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Е.С. Наумова, А.Ж. Садыкова, Н.Н. Мартыненко, Г.И. Наумов // Микробиология. — 2013. — V. 82. — С. 176-186
(Для англ. версии – Naumova, E.S. Molecular genetic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* distillers' yeasts / E.S. Naumova, A. Zh. Sadykova, N.N. Martynenko, G.I. Naumov // Microbiology. — 2013. — Т. 82. — С. 175–185)
290. Прайд, Ф.Е. Теломеры *Saccharomyces cerevisiae* / Ф.Е. Прайд, Э.Д. Льюис // Биохимия. — 1997. — Т. 62. — В.11. — С. 1442–1452
291. Рухлядева, А.П. Технохимический контроль спиртового производства / А.П. Рухлядева // М.: Пищевая промышленность. — 1974.
292. Серпова, Е. В. Молекулярно-генетическая идентификация винных дрожжей Крыма / Е. В. Серпова, С. А. Кишковская, Н. Н. Мартыненко, Е. С. Наумова // Биотехнология. — 2011. — № 6. — С. 47–54.
293. Скородумова, А.М. Антибиотические свойства дрожжей, сбрасывающих лактозу / А.М. Скородумова // Докл. АН СССР. — 1951. — Т.80. — №2. — С.257–259.
294. Скородумова, А.Н. Дрожжи молока и молочных продуктов и их производственное значение / А.Н. Скородумова// М.: Пищевая промышленность. — 1969. — С.117

295. Устинников, Б. А. Интенсификация технологического процесса производства спирта из зернокартофельного сырья. Спиртовая и ликерно-водочная промышленность // Б. А. Устинников, В. Л. Яровенко // М.: ЦНИИТЭИпищепром. — 1973.