

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Лютова Людмила Владимировна

**ТАКСОНОМИЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА ДРОЖЖЕЙ
*KLUYVEROMYCES LACTIS***

Специальность 1.5.18. – микология,
1.5.7. – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Наумова Елена Сергеевна

доктор биологических наук, доцент

Шнырёва Алла Викторовна

Москва – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 6 |
| ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 14 |
| ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННАЯ СИСТЕМАТИКА ДРОЖЖЕЙ РОДА <i>KLUYVEROMYCES</i> | 14 |
| 1.1. История классификации..... | 14 |
| 1.1.1. Традиционная систематика: морфологические и физиологические признаки..... | 14 |
| 1.1.2. ДНК-ДНК реассоциация..... | 18 |
| 1.1.3. Гибридологический анализ..... | 20 |
| 1.1.4. Филогенетическое родство дрожжей <i>Kluuveromyces</i> : полиморфизм ядерной и митохондриальной ДНК..... | 23 |
| 1.1.5. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК..... | 24 |
| 1.2. Наземные виды рода <i>Kluuveromyces</i> | 25 |
| 1.2.1. Типовой вид <i>Kluuveromyces marxianus</i> | 25 |
| 1.2.2. Вид <i>Kluuveromyces lactis</i> : таксономические разновидности <i>var. lactis</i> и <i>var. drosophilarum</i> | 27 |
| 1.2.3. Виды <i>Kluuveromyces dobzhanskii</i> , <i>Kluuveromyces wickerhamii</i> и <i>Kluuveromyces starmeri</i> | 29 |
| 1.3. Морские виды <i>Kluuveromyces</i> : <i>K. aestuarii</i> , <i>K. nonfermentas</i> и <i>K. siamensis</i> | 31 |
| ГЛАВА 2. СИСТЕМА ГЕНОВ <i>LAC</i> | 33 |
| 2.1. Общая характеристика β-галактозидаз, лактозный оперон..... | 33 |
| 2.2. Система генов <i>LAC</i> дрожжей <i>Kluuveromyces</i> | 37 |
| 2.2.1. <i>Kluuveromyces lactis var. lactis</i> | 37 |
| 2.2.2. <i>Kluuveromyces marxianus</i> | 39 |
| 2.2.3. <i>K. dobzhanskii</i> , <i>K. wickerhamii</i> и <i>K. starmeri</i> | 43 |
| 2.2.4. <i>K. aestuarii</i> , <i>K. nonfermentas</i> и <i>K. siamensis</i> | 43 |
| ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 44 |
| 3.1. Объекты исследования и методы культивирования..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Микробиологические методы | 51 |
| 3.2.1. Культивирование дрожжей | 51 |
| 3.2.2. Физиологическая характеристика штаммов: ферментация лактозы . | 51 |
| 3.2.3. Определение скорости сбраживания лактозы..... | 52 |
| 3.3. Генетические методы..... | 53 |
| 3.3.1. Получение ауксотрофных мутантов | 53 |
| 3.3.2. Гибринологический анализ | 56 |
| 3.3.2.1. Получение гибридов | 56 |
| 3.3.2.2. Анализ гибридов | 57 |
| 3.4. Молекулярные методы | 58 |
| 3.4.1. ПЦР-анализ | 58 |
| 3.4.2. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ анализ) | 61 |
| 3.4.3. Секвенирование и филогенетический анализ | 61 |
| 3.4.4. Молекулярное кариотипирование | 63 |
| 3.4.4.1. Выделение интактной хромосомной ДНК | 63 |
| 3.4.4.2. Пульс-электрофорез интактной хромосомной ДНК | 63 |
| 3.4.4.3. Саузерн-гибридизация..... | 65 |
| РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ | 66 |
| ГЛАВА 4. ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДРОЖЖЕЙ <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> : ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИИ..... | 66 |
| 4.1. ПДРФ-анализ IGS2 района рДНК | 66 |
| 4.2. Установление таксономического статуса природных популяций <i>K. lactis</i> | 68 |
| 4.2.1. Молекулярное кариотипирование | 68 |
| 4.2.2. Мультигенный филогенетический анализ..... | 74 |
| 4.2.3. Гибринологический анализ | 80 |
| 4.3. Обсуждение..... | 87 |
| ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ <i>LAC</i> ДРОЖЖЕЙ <i>KLUYVEROMYCES</i> | 88 |

| | |
|--|-----|
| 5.1. Хромосомный полиморфизм генов <i>LAC</i> | 88 |
| 5.2. Нуклеотидный полиморфизм генов <i>LAC4</i> и <i>LAC12</i> | 90 |
| 5.3. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей <i>LAC4</i> и <i>LAC12</i> | 93 |
| 5.4. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов <i>LAC9</i> | 98 |
| 5.5. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 и ITS участка рДНК | 99 |
| 5.6. Обсуждение..... | 101 |
| ГЛАВА 6. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЛОКУСОВ <i>LAC</i> МОЛОЧНЫХ ДРОЖЖЕЙ <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> VAR. <i>LACTIS</i> | 102 |
| 6.1. Рекомбинационный анализ полимерных генов <i>LAC</i> | 102 |
| 6.2. Результаты эксперимента по межвидовой гибридизации <i>K. marxianus</i> и <i>K. lactis</i> популяция «krassilnikovii» | 104 |
| 6.2.1. Получение межвидовых гибридов | 104 |
| 6.2.2. Молекулярные кариотипы межвидовых гибридных сегрегантов <i>K. marxianus</i> CBS 397 × <i>K. lactis</i> популяция «krassilnikovii» CBS 9058..... | 106 |
| 6.2.3. ПДРФ-анализ амплифицированных IGS2 фрагментов рДНК..... | 107 |
| 6.2.4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей дрожжевых и бактериальных β-галактозидаз <i>LAC4</i> | 110 |
| 6.3. Обсуждение..... | 113 |
| ГЛАВА 7. МЕЖШТАММОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ <i>KLUYVEROMYCES LACTIS</i> ДЛЯ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ, СПОСОБНЫХ АКТИВНО СБРАЖИВАТЬ ЛАКТОЗУ | 114 |
| 7.1. Физиологические особенности штаммов <i>K. lactis</i> var. <i>lactis</i> | 114 |
| 7.1.1. Ферментация лактозы | 114 |
| 7.1.2. Ферментационная активность..... | 114 |
| 7.2. Влияние межштаммовой гибридизации на скорость сбраживания лактозы..... | 115 |
| 7.2.1. Получение межштаммовых гибридов <i>K. lactis</i> var. <i>lactis</i> | 115 |

| | |
|---|-----|
| 7.2.2. Сравнение скорости сбраживания лактозы родительских штаммов и гибридов <i>K. lactis</i> var. <i>lactis</i> | 116 |
| 7.3. Сравнительный анализ интенсивности ферментации лактозы молочных дрожжей <i>K. lactis</i> var. <i>lactis</i> , <i>K. marxianus</i> и гибридных штаммов..... | 117 |
| 7.3.1. Динамика сбраживания лактозы и образования этилового спирта . | 119 |
| 7.3.2. Динамика сбраживания глюкозы и галактозы | 121 |
| 7.4. Обсуждение..... | 123 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 124 |
| ВЫВОДЫ..... | 132 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 134 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Молочные дрожжи вида *Kluyveromyces lactis* являются вторым после *Saccharomyces cerevisiae* объектом фундаментальных и прикладных исследований. Дрожжи *K. lactis* имеют большое биотехнологическое значение для производства различных гетерологичных белков медицинского и пищевого значения, а благодаря способности продуцировать киллерные токсины (микоцины) также могут служить биологическими агентами, подавляющими развитие вредных микроорганизмов (Lehmann et al., 1987; van Ooyen et al., 2006; Rodicio, Heinisch, 2013; Spohner et al., 2016).

В отличие от большинства видов дрожжей *K. lactis* и родственный вид *K. marxianus* способны утилизировать дисахарид лактозу, расщепляя его до моносахаридов глюкозы и галактозы благодаря наличию внутриклеточного фермента β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23). По существу, *K. lactis* и *K. marxianus* являются естественными продуцентами фермента β -галактозидазы, который используется в пищевой промышленности для производства различных молочных продуктов, включая безлактозные, что важно для людей с непереносимостью лактозы (Hussein et al., 1989; Lomer et al., 2008; Panesar et al., 2010; Anisha, 2017). Способность разлагать лактозу также имеет большое значение для утилизации отходов молочной промышленности, поскольку производимая сыворотка представляет собой серьезную экологическую проблему (Chandra et al., 2018; Samraio et al., 2020). В этой связи актуальным является создание штаммов дрожжей *Kluyveromyces*, способных быстро и наиболее полно утилизировать лактозу.

У дрожжей *Kluyveromyces* способность ферментировать лактозу контролируется сложным локусом *LAC*, состоящим из двух тесно сцепленных структурных генов *LAC4* (ген β -галактозидазы) и *LAC12* (ген пермеазы лактозы), а также регуляторной последовательности (Dickson et al., 1989). В последние годы активно изучаются гены *LAC* молочных дрожжей *K. marxianus* (Varela et al., 2017, 2019). Однако, лактозные гены *K. lactis* практически не

изучены, а опубликованные данные касаются только одного штамма NRRL Y-1140, выделенного из сливок в США. В базе данных GenBank представлены нуклеотидные последовательности генов *LAC* только трех штаммов *K. lactis*: NRRL Y-1140, F61 (молоко) и GG799 (пищевая промышленность, США). Таким образом, молекулярный полиморфизм генов *LAC* дрожжей *K. lactis*, контролирующей ферментацию лактозы, практически не изучен.

Согласно современной классификации, вид *K. lactis* включает две таксономические разновидности: культурные молочные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и неспособные сбраживать лактозу природные штаммы *K. lactis* var. *drosophilarum*. Основанное только на фенотипических и экологических критериях разделение на разновидности является достаточно условным и не отражает существующей гетерогенности разновидности *K. lactis* var. *drosophilarum*, продемонстрированной с помощью различных молекулярных методов, таких как ПДРФ-анализ мтДНК, RAPD-ПЦР, секвенирование 5.8S-ITS-района рДНК и молекулярное кариотипирование (Ragnini, Fukuhara, 1988; Sor, Fukuhara, 1989; Molnar et al., 1996; Belloch et al., 1997, 1998a, 1998b, 2000, 2002; Naumov, Naumova, 2002). Ранее на основании гибридологического анализа и молекулярного кариотипирования, а также литературных данных была проведена таксономическая ревизия вида *K. lactis* и предложено пять разновидностей: var. *lactis* (Lac⁺) и неспособные утилизировать лактозу var. *drosophilarum* (Северная Америка), var. *phaseolospora* (Северная Америка), var. *krassilnikovii* (Европа), var. *vanudenii* (Южная Африка) (Naumov, Naumova, 2002). Однако эта ревизия не была принята в последующих монографиях, посвященных систематике дрожжей рода *Kluyveromyces* (Lachance, 2007, 2011). В качестве объяснения было отмечено, что условное деление только на две разновидности поддерживает преобладание в литературе, а дифференциация не усваивающих лактозу дрожжей *K. lactis* на четыре предложенные разновидности является неоднозначной.

Помимо *K. lactis*, род *Kluyveromyces* включает еще семь видов: *K. aestuarii*, *K. dobzhanskii*, *K. marxianus*, *K. nonfermentas*, *K. siamensis*, *K.*

wickerhamii, *K. starmeri* (Kurtzman, 2003; Lachance, 2007; Freitas et al., 2020). Виды *Kluyveromyces* существенно различаются по способности утилизировать лактозу. Дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и молочные штаммы *K. marxianus* способны ферментировать лактозу, тогда как виды *K. aestuarii*, *K. siamensis*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii* и природные изоляты *K. marxianus* ассимилируют лактозу, но не способны ее ферментировать из-за зависимость от дыхания низкоаффинного транспорта лактозы (Наумов, 2006, 2008; Varela et al., 2019). Дрожжи *K. dobzhanskii*, *K. starmeri* и *K. lactis* var. *drosophilorum* не утилизуют лактозу и не имеют даже молчащих последовательностей генов *LAC*. В этой связи остается неясным происхождение лактозных генов разновидности *K. lactis* var. *lactis*.

Цель и задачи исследования

Цель работы – изучение молекулярного полиморфизма, таксономии и эволюции дрожжей *K. lactis* на материале штаммов различного экологического и географического происхождения.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определение таксономического статуса дивергентных природных популяций в пределах вида *K. lactis* и подбор молекулярных маркеров для их достоверной дифференциации.
2. Молекулярный скрининг генов *LAC*, контролирующих ферментацию лактозы, и их хромосомное картирование у дрожжей разновидности *K. lactis* var. *lactis*.
3. Рекомбинационный анализ генов *LAC* различной хромосомной локализации у дрожжей *K. lactis* var. *lactis*.
4. Сравнительный анализ β -галактозидаз и пермеаз лактозы видов рода *Kluyveromyces*.
5. Изучение происхождения локусов *LAC* молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis*. Молекулярно-генетический анализ межвидовых гибридов *K. marxianus* \times *K. lactis*.

6. Использование межштаммовой гибридизации для создания новых штаммов молочных дрожжей *K. lactis*, способных активно сбраживать лактозу.

Объект и предмет исследования

Штаммы дрожжей *Kluveromyces lactis* различного экологического и географического происхождения.

Научная новизна и практическая значимость работы

На материале штаммов различного происхождения установлено, что способность дрожжей *K. lactis* var. *lactis* ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV). Впервые проведен филогенетический анализ β -галактозидаз и пермеаз видов рода *Kluveromyces* и аминокислотных последовательностей этих ферментов у других родов дрожжей. Обнаружена корреляция между последовательностями генов *LAC* и экологическим происхождением штаммов *Kluveromyces*: молочные продукты и природные источники. Группа молочных штаммов гетерогенна и включает виды *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*, что указывает на общее происхождение их генов *LAC*. С помощью межвидовой гибридизации впервые продемонстрирована возможность переноса кластера лактозных генов *LAC4–LAC12* из молочного штамма *K. marxianus* в геном европейского природного Lac⁻ штамма *K. lactis* популяции «krassilnikovii».

С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа впервые изучен внутривидовой полиморфизм дрожжей *K. lactis* на материале штаммов, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. Установлено, что вид *K. lactis* включает сбраживающие лактозу *K. lactis* var. *lactis* и шесть генетически изолированных популяций не сбраживающих лактозу дрожжей *K. lactis*: «drosophilatum», «phaseolosporus», «krassilnikovii», «pseudovanudenii», «водная» и «восточная». Впервые изучены молекулярные кариотипы генетических популяций вида *K.*

lactis и установлено, что все они имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести. Рекомендовано использовать молекулярный маркер *ACT1* для достоверной идентификации и дифференциации внутривидовых популяций в пределах вида *K. lactis*.

Показано, что межштаммовая гибридизация является перспективным методом создания молочных штаммов *Kluyveromyces*, способных активно ферментировать лактозу. Отобраны межштаммовые гибриды *K. lactis* var. *lactis* и молочные штаммы вида *K. marxianus*, обладающие наибольшей ферментационной активностью и представляющие интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных разработок. Создана коллекция охарактеризованных молекулярными методами молочных и природных штаммов дрожжей *K. lactis*, которая может быть использована в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Методология и методы исследования

Исследование проводилось с применением полифазного подхода. В работе использовались микробиологические, генетические (гибридологический, тетрадный анализ), современные молекулярные методы (полимеразная цепная реакция (ПЦР), анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ), секвенирование, молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация).

Для анализа и обработки полученных результатов использовали биоинформатические подходы: поиск гомологии с известными последовательностями проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank; выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с помощью программы BioEdit; филогенетический анализ с помощью программы MEGA 7.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Физиологическая разновидность *K. lactis* var. *drosophilorum* гетерогенна и представлена шестью генетически изолированными популяциями: «*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная». На основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* можно достоверно дифференцировать все популяции в пределах вида *K. lactis*.
2. У дрожжей *K. lactis* var. *lactis* способность ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV). Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками *LAC4* и *LAC12* видов рода *Kluyveromyces* и последовательностями этих ферментов у дрожжей других родов.
3. Локусы *LAC* имеют общее происхождение у молочных дрожжей видов *K. lactis* и *K. marxianus*. Доместикация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis*, по-видимому, произошла на основе приобретения генного кластера *LAC4-LAC12* от молочных штаммов *K. marxianus*. Наиболее вероятным реципиентом лактозного кластера были природные европейские штаммы популяции «*krassilnikovii*».
4. Межштаммовая гибридизация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* является эффективным методом создания перспективных производственных штаммов, способных активно сбраживать лактозу.

Личный вклад соискателя

Автором были самостоятельно проведены все экспериментальные научные исследования и анализ полученных результатов. Освоены и применены в работе методы молекулярной (ПЦР, пульс-электрофорез, Саузерн-блот и др.) и классической (гибридологический и рекомбинационный анализы) генетики, а также стандартные таксономические методы. Результаты

проведённых исследований представлены автором на конференциях и оформлены в виде научных публикаций.

Степень достоверности результатов

Работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных молекулярно-биологических, генетических и компьютерных методов исследования. Выводы и положения, сделанные в диссертационной работе, основаны на обширном экспериментальном материале, достоверны и обоснованы. Полученные результаты сравнивались с данными отечественных и зарубежных исследователей в сходном направлении.

Апробация работы

Основные результаты работы представлены на Международной конференции «XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisations ECCO 2018» (Москва); Всероссийской школе-конференции «Генетика микроорганизмов: от геномики к биоэкономике» (2018, Пущино); Всероссийской конференции «Микология и альгология в России. XX-XXI век: смена парадигм» (2019, Москва); Международной конференции «VII Congress of Vavilov Society of Geneticists and Breeders and Associate Symposiums» (2019, Санкт-Петербург); Международной конференции «ISSY 35 The 35th International Specialized Symposium on Yeasts» (2019, Анталия, Турция); 3-ем Российском микробиологическом конгрессе (2021, Псков); 4-ом Российском микробиологическом конгрессе (2023, Томск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них четыре статьи в журналах, рецензируемых в Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 153 страницах и включает 7 разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Работа содержит 35 рисунков, 10 таблиц. Список литературы включает 197 источников.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность д.б.н., профессору Наумовой Елене Сергеевне за руководство данной работой, а также за всестороннюю методическую поддержку, и д.б.н., профессору Шнырёвой Алле Викторовне за ценные рекомендации и стимулирование написания диссертации. Искренняя благодарность всем сотрудникам лаборатории молекулярной генетики дрожжей КК НБИКС-ПТ центра геномных исследований «Курчатовский геномный центр», в которой была выполнена данная работа, сотрудникам кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и заведующему кафедрой д.б.н. А.В. Куракову. Отдельную благодарность автор выражает Кондратьевой Вере Ильиничне за неоценимую помощь в освоении методов классической генетики.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННАЯ СИСТЕМАТИКА ДРОЖЖЕЙ РОДА *KLUYVEROMYCES*

1.1. История классификации

1.1.1. Традиционная систематика: морфологические и физиологические признаки

Дрожжи – внетаксономическая группа, объединяющая одноклеточные грибы, вегетативное размножение которых осуществляется преимущественно почкованием. Началом систематики дрожжей можно считать 1838 год, когда Меуен описал род *Saccharomyces*, в который вошли три вида, названные согласно источнику выделения: *S. cerevisiae* (пиво), *S. pomorum* (бродящий яблочный сок) и *S. vini* (вино). После того как Schwann в 1939 году обнаружил половые споры (аскоспоры), в род *Saccharomyces* были включены аскомицетовые дрожжи, образующие аски с 1–4 аскоспорами (Barnett, 1992).

Важнейшим этапом в систематике дрожжей стала разработка Hansen (1888) техники получения чистых культур, что позволило проводить изучение дрожжей в лабораторных условиях. И уже к концу 19-го века было описано около 200 новых видов и родов дрожжей, включая молочные дрожжи *Saccharomyces marxianus* (Hansen, 1888). Позднее род *Saccharomyces* был пополнен ещё двумя видами молочных дрожжей *S. fragilis* (кефир) и *S. lactis* (самозабродившее молоко) (Jorgensen, 1909; Dombrowski, 1910). На 11-ом международном ботаническом конгрессе в Вене в 1904 году была создана первая грибная коллекция, включающая и дрожжевые культуры: CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды.

Guilliermond (1928) предложил использовать для идентификации дрожжей дихотомические ключи, включающие морфологические (форма и размер вегетативных клеток, наличие или отсутствие аскоспор, их количество и форма) и физиологические (способность ферментировать различные сахара)

признаки. Дрожжи *S. marxianus* были перенесены в род *Zygosaccharomyces* (Guilliermond, Negroni, 1929). С 1931 года коллекция CBS начинает издавать определители дрожжей на регулярной основе. Со временем список физиологических признаков расширился, и для идентификации дрожжей стали использовать тесты на ассимиляцию 38 различных соединений (Wickerham, 1951). Wickerham описал новый набор химически определённых культуральных сред, которые используются и в настоящее время: «азотистая основа», «углеродная основа» и «морфологический агар». В настоящее время вышеперечисленные среды производятся коммерчески.

В определителе дрожжей 1952 года под редакцией Lodder и Kreger-van-Rij в род *Saccharomyces* были включены 20 видов *Zygosaccharomyces*, а также некоторые виды *Torulasporea* и *Debaryomyces*. Предложенная ревизия рода *Saccharomyces* была принята не всеми таксономистами. Так, Кудрявцев перенёс сбразивающие лактозу дрожжи *S. fragilis* в новый род *Fabospora* на основании бобовидной формы спор и хрупкости асков при созревании, что отличало их от настоящих дрожжей *Saccharomyces* (Кудрявцев, 1954). Вид *Zygosaccharomyces marxianus* был перенесён в новый род *Zygofabospora*. Эти дрожжи также имели бобовидную форму спор, однако отличались от рода *Fabospora* образованием сумок из зигот, формирующихся после копуляции вегетативных клеток. На материале штамма, выделенного в 1927 году из слизетечения дуба профессором Красильниковым, был описан новый вид *Z. krassilnikovii* (Kudrjawzew, 1960). Эти дрожжи морфологически не отличались от *Z. marxianus*, но характеризовались неспособностью усваивать лактозу.

В 1955 году было описано ещё три новых вида, выделенных из мушки *Drosophila pseudoabscura* в Калифорнии, которые формировали по четыре бобовидные аскоспоры в сумке, легко освобождающиеся при созревании (Shehata et al., 1955). Эти дрожжи были помещены в род *Saccharomyces* и описаны как *S. drosophilorum*, *S. dobzhanskii* и *S. phaselosporus*. Указанные виды отличались от *S. marxianus* и *S. fragilis* по ряду ассимиляционных, ферментативных и морфологических характеристик. Так, *S. drosophilorum* не

способны ферментировать лактозу, но в отличие от *S. marxianus* ассимилируют мальтозу. *S. dobzhanskii* имеют сходный с *S. drosophilorum* ассимиляционный спектр, но не способны ферментировать мальтозу. *S. phaselosporus* не ассимилируют мальтозу и лактозу, а также в отличие от *S. marxianus* не формируют псевдомицелий.

На основании гибридологического анализа Wickerham (1955) предложил перенести виды *S. lactis*, *S. fragilis*, *S. marxianus*, *Z. ashby* и *Z. dobzhansky*, а также несколько других видов, в новый род *Dekkeromyces*. Основанием послужило отсутствие гибридизации дрожжей вида *S. cerevisiae* с видами *S. fragilis* и *S. lactis*. Кроме того, вышеперечисленные дрожжи существенно различались по физиологии. Так, аски дрожжей *Dekkeromyces*, в отличие от *Saccharomyces*, разрушались сразу при созревании. Дрожжи *Dekkeromyces* утилизировали больше источников углерода, а некоторые характеризовались наличием красного пигмента пульхеримина, отсутствующего у *Saccharomyces*. Дополнительным критерием в пользу выделения видов *S. fragilis*, *Z. dobzhanskii* и *S. lactis* в отдельный род послужило образование гибридов между этими видами (Wickerham, Burton, 1956a, b). На основании формы аскоспор авторы выделили две группы внутри предложенного рода: дрожжи с серповидными и шаровидными аскоспорами. Виды с шаровидными аскоспорами были исключительно гаплоидными, гомоталличными, за исключением *S. lactis*, включающего гомо- и гетероталлические штаммы. Виды второй группы (с серповидными аскоспорами) были исключительно гомоталлическими. Среди них также встречались диплоидные дрожжи, считавшиеся более эволюционно продвинутыми. Следует отметить, что формально род *Dekkeromyces* не был описан, в связи с чем остался непризнанным и получил статус *nomen nudum*.

Род *Kluveromyces* был предложен van der Walt для нового вида дрожжей, выделенного из почвы. Дрожжи формировали большие мультиспоровые аски (до 70 спор в аске), в связи с чем получили название *Kluveromyces polysporus* (van der Walt, 1956a). Аскоспоры этого вида имеют

бобовидную или удлинённо-овальную форму и высвобождаются сразу при созревании. Также для этих дрожжей было характерно формирование псевдомицелия. Через некоторое время был описан ещё один вид *K. africanus*, имеющий 16 аскоспор в сумке (van der Walt, 1956b).

В 1961 году для дрожжей, формирующих бобовидные споры было предложено отдельное семейство Fabosporaceae (Novak, Zolt, 1961). В это семейство были включены роды *Guilliermondella* (Nadson, Krassilnikov, 1928), *Kluuveromyces* (van der Walt, 1956a, b) и формально не описанный род *Dekkeromyces* (Wickerham, 1955).

Позднее van der Walt (1965) изменил первоначальный диагноз рода *Kluuveromyces* и включил в него виды, формирующие 1–4 аскоспоры серповидной, бобовидной, овальной и шаровидной формы. По мнению автора, эти виды дрожжей отличались от мультиспоровых только количеством спор в аске. Было показано, что многоспоровость у *K. polysporus* обусловлена несинхронным многократным митотическим делением гаплоидных ядер (Roberts, van der Walt, 1959). Такое отклонение отмечено и у немногоспоровых дрожжей *S. marxianus*, у которых наблюдали до восьми спор в аске (Guilliermond, Negroni, 1929). Таким образом, в изменённый род вошли дрожжи *Kluuveromyces*, *Fabospora* и *Zygofabospora*. Всего род включал 14 видов: *K. polysporus*, *K. marxianus*, *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. drosophilorum*, *K. dobzhanskii*, *K. phaseolosporus*, *K. delphensis*, *K. africanus*, *K. wickerhamii*, *K. lodderi*, *K. aestuarii*, *K. vanudenii* и *K. phaffii* (van der Walt, 1965).

В определителе 1970 года род *Kluuveromyces* объединил уже 18 видов, разделённых на основании морфологических и физиологических критериев на две группы. Первую группу составляли гомоталлические дрожжи с серповидными или бобовидными спорами: *K. africanus*, *K. delphensis*, *K. dobzhanskii*, *K. lodderi*, *K. phaffii*, *K. polysporus*, *K. wickerhamii*, *K. drosophilorum*, *K. phaseolosporus*, *K. marxianus*, *K. fragilis*. Во вторую были включены как гомоталлические, так и гетероталлические дрожжи со спорами

шаровидной или овальной формы: *K. aestuarii*, *K. bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. vanudenii*, *K. wikenii*, *K. lactis*, *K. veronae* (Lodder, 1970).

Позднее Campbell (1972) провёл кластерный анализ видов *Kluuveromyces* и *Saccharomyces*. При сравнении морфологических, физиологических и серологических характеристик 18 видов рода *Kluuveromyces* были разделены на три группы. Первая группа объединила 12 видов: *K. lactis*, *K. phaseolosporus*, *K. vanudenii*, *K. drosophilum*, *K. aestuarii*, *K. bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. dobzhanskii*, *K. fragilis*, *K. marxianus*, *K. wickerhamii* и *K. wikenii*. Вторая включала только вид *K. veronae*. К третьей группе были отнесены пять видов: *K. africanus*, *K. phaffii*, *K. delphensis*, *K. lodderi* и *K. polysporus*. Автор перенёс все виды *Kluuveromyces* в род *Saccharomyces*. Однако проведенная ревизия не была признана.

1.1.2. ДНК-ДНК реассоциация

В 70-ые годы XX века в таксономии дрожжей начали использовать молекулярные методы, основанные на анализе и сравнении ядерной ДНК. Одним из таких методов был метод определения молярного процента гуанина и цитозина (мол. % G+C) в ядерной ДНК. Существовало два подхода: определение температуры термической денатурации (температуры плавления, T_m) (Bicknell, Douglas, 1970; Poncet, Fiol, 1972) и измерение плавучей плотности (Martini et al., 1972; Fuson et al., 1987). При различиях молярных процентов (%) G+C пар более 1–1.5% дрожжи дифференцировали на отдельные виды (Kurtzman et al., 1983). Диапазон мол. % G+C у видов в пределах рода *Kluuveromyces* составил 34.2–46.2% (Martini et al., 1972; Fuson et al., 1987). Поэтому выделили три группы. В первую группу попали виды с G+C составом равным 34.2–35.7%: *K. blattae*, *K. phaffii*, *K. polysporus*, *K. lodderi*. Во вторую группу (38.5–42.6%) вошли виды *K. africanus*, *K. aestuarii*, *K. delphensis*, *K. lactis*, *K. vanudenii*, *K. drosophilum*, *K. phaseolosporus*, *K. fragilis*, *K. wikenii*, *K. marxianus*, *K. bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. wickerhamii*,

K. dobzhanskii. Наиболее отдаленная третья группа (% G+C пар 45.7- 46.2%) объединила два вида – *K. waltii* и *K. thermotolerans*.

Для установления филогенетического родства видов гетерогенного рода *Saccharomyces* Bicknell и Douglas (1970) использовали два критерия: ДНК-ДНК реассоциацию полных геномов и более консервативного участка 26S рРНК. Согласно результатам ДНК-ДНК реассоциации виды *S. lactis*, *S. fragilis*, *S. marxianus*, *S. dobzhanskii* и *S. wickerhamii* неродственны типовому виду *S. cerevisiae*, так как демонстрировали очень низкий процент ДНК-ДНК реассоциации (0–6%). Внутри группы также наблюдались низкие значения ДНК-ДНК родства, не превышающие 32%, за исключением видов *S. marxianus* и *S. fragilis* (93%. ДНК-ДНК гомологии). Однако результаты ДНК-реассоциации с 26S рРНК (98–99%) демонстрировали близкое родство видов внутри данной группы.

По результатам экспериментов была принята шкала, согласно которой, штаммы, имеющие 80–100% ДНК-ДНК реассоциации, принадлежат к одному виду, а при значениях ДНК-ДНК реассоциации в 30% и ниже рассматриваются как разные виды, а 60–80% – разновидности или разные виды, что хорошо согласуется с результатами G+C состава ДНК (Fuson et al., 1987).

В 1987 году была проведена масштабная ревизия рода *Kluuyveromyces* с применением техники ДНК-ДНК реассоциации (Vaughan Martini, Martini, 1987; Fuson et al., 1987). В результате на основании сходства ДНК, выделили три группы видов: первая группа включала виды *K. marxianus*, *K. bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. fragilis*, *K. wikenii*; во вторую вошли виды *K. lactis*, *K. drosophilarum*, *K. phaseolosporus*, *K. vanudeni*; третью группу составили виды *K. thermotolerans* и *K. veronae*. Процент ДНК-ДНК реассоциации среди видов первой группы составил 95% и выше, на этом основании виды *K. bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. fragilis*, *K. wikenii* были отнесены к синонимам *K. marxianus*. Вторая группа оказалась более гетерогенной. Степень ДНК-ДНК реассоциации видов данной группы с типовым штаммом *K. lactis* колебалась в диапазоне от 64 до 98% и с типовым штаммом *K. drosophilarum* – от 64 до 86%.

Несмотря на то, что в некоторых случаях такой диапазон позволял рассматривать организмы в качестве разновидностей или даже отдельных видов, если имелись дополнительные фенотипические различия, авторы решили не разделять данную группу и объединить все виды в единый таксон *K. lactis*. Основанием служил довольно широкий диапазон значений ДНК-ДНК реассоциации среди штаммов *K. drosophilarum*. Штаммы UCDFST 78-13, UCDFST 71-45 и UCDFST 69-8 имели практически одинаковые показатели ДНК-родства с другими штаммами *K. drosophilarum* и штаммами вида *K. lactis* (Fuson et al., 1987).

Типовые культуры *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* имели от 5.2 до 15% ДНК-ДНК реассоциации, что свидетельствовало о их принадлежности к разным видам (Bicknell, Douglas, 1970; Fuson et al., 1987). Дрожжи *K. africanus*, *K. aestuarii*, и *K. delphensis* также рассматривались как разные виды, имеющие низкие значения ДНК-ДНК реассоциации между собой и с другими видами рода *Kluveromyces*.

1.1.3. Гибридологический анализ

Согласно биологическому определению вида, предложенному Маур (1942), вид – это группы фактически или потенциально скрещивающихся природных популяций, сходных по морфолого-анатомическим, физиолого-экологическим, биохимическим и генетическим признакам, занимающих естественный ареал, способных давать плодовитое потомство, а также репродуктивно изолированные от других подобных групп. Популяция – это минимальная самовоспроизводящаяся группа особей одного вида, на протяжении эволюционно длительного времени населяющая определённое пространство, образующая самостоятельную генетическую систему и формирующая собственное экологическое пространство (Яблоков, 1987).

Использовать фертильность гибридов как критерий для конспецифичности дрожжей предлагалось разными исследователями (Winge, Lautsen, 1939; Wickerham, Burton, 1956a). В 1972 году Yarrow удалось

скрестить ряд видов *Saccharomyces*, которые были разделены в основном по способности усваивать определенные сахара. Справедливость объединения данных видов была также подтверждена на основании анализа серотипов и состава ДНК (Yarrow, Nakase, 1975). Существует два основных метода получения гибридов. Первый метод включает микроманипулирование, при котором образование зигот происходит при слиянии отдельных аскоспор (Winge, Lautsen, 1939), или гаплоидных вегетативных клеток (Chen, 1950). Второй метод состоит в применении техники прототрофной селекции, при котором скрещиваются штаммы, несущие разные ауксотрофности или имеющие различия в утилизации определённых сахаров (Pomper, Burkholder, 1949). Отбор гибридов производится на минимальной среде, последующий анализ гибридов включает учет родительских фенотипов и частоту рекомбинации (Johannsen, 1978; Johannsen, van der Walt, 1978).

Первые гибридологические исследования *S. fragilis*, *Z. dobzhanskii* и *S. lactis* были проведены Wickerham и Burton (1956a, b). Между указанными таксонами получены гибриды *S. fragilis* × *Z. dobzhanskii* и *S. lactis* × *Z. dobzhanskii*, таким образом показана их способность скрещиваться.

Более полный гибридологический анализ был проведён Johannsen (1978, 1980). На основании двадцати описанных видов рода: *K. africanus*, *K. aestuarii*, *K. blattae*, *K. delphensis*, *K. lactis*, *K. vanudenii*, *K. drosophilarum*, *K. phaseolosporus*, *K. fragilis*, *K. wikenii*, *K. marxianus*, *K. bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. wickerhamii*, *K. dobzhanskii*, *K. lodderi*, *K. phaffii*, *K. waltii*, *K. polysporus*, *K. thermotolerans*, было проведено около 900 скрещиваний в различных комбинациях. Дрожжи *K. marxianus* образовывали гибриды с *K. bulgaricus*, *K. cicerisporus*, *K. dobzhanskii*, *K. drosophilarum*, *K. lactis*, *K. phaseolosporus*, *K. vanudenii*, *K. wikenii* и *K. fragilis*, что хорошо соответствовало данным ДНК-ДНК реассоциации (van der Walt, Johannsen, 1979). По результатам гибридизации указанные таксономические виды были переведены в разновидности или синонимы *K. marxianus* и состав рода стал следующим: *K. africanus*, *K. blattae*, *K. lodderi*, *K. phaffii*, *K. polysporus*, *K.*

delphensis, *K. aestuarii*, *K. thermotolerans*, *K. waltii*, *K. wickerhamii* и *K. marxianus* (var. *dobzhanskii*, var. *drosophilarum*, var. *lactis*, var. *vanudenii*, var. *bulgaricus*, var. *cicerisporus*, var. *wikenii*) (van der Walt, Johannsen, 1984). *K. phaseolosporus* и *K. fragilis* стали синонимами *K. marxianus*. Позднее, на основании изоферментного анализа, виды *K. dobzhanskii* и *K. lactis* были восстановлены (Sidenberg, Lachance, 1986). В свою очередь *K. lactis* был разделён на разновидности: молочные дрожжи var. *lactis* и природные не утилизирующие лактозу дрожжи var. *drosophilarum*.

По результатам анализа литературных данных Наумов (1986) предложил изменить классификацию дрожжей *Kluveromyces* и ограничить род только многоспоровыми видами, а гибридизуемые виды, формирующие 1–4 споры, перенести в род *Zygofabospora* (Kudrjawzew, 1960). Был изменён диагноз рода, в который, помимо дрожжей с бобовидной формой спор, были включены дрожжи с круглыми или овальными спорами, а типовым видом стал *Z. marxiana* (Наумов, 1987, 1988). В восстановленный и расширенный род *Zygofabospora* вошло 11 видов: *Z. aestuarii*, *Z. delphensis*, *Z. dobzhanskii*, *Z. lodderi*, *Z. wickerhamii*, *Z. lactis*, *Z. drosophilarum*, *Z. phaseolospora*, *Z. marxiana*, *Z. thermotolerans*, *Z. waltii*.

Гибридологический анализ дрожжей *Z. krassilnikovii*, *K. vanudenii*, *Z. drosophilarum*, *Z. phaseolosporus* и *Z. lactis* позволил установить частичную генетическую изоляцию внутри группы *Z. krassilnikovii*, *Z. drosophilarum*, *Z. phaseolosporus*, тогда как группа *Z. krassilnikovii*, *K. vanudenii* и *Z. lactis* не имела генетических механизмов изоляции (Наумов, 2000).

Принимая во внимание индустриальную значимость дрожжей *K. lactis* и *K. marxianus*, а также большое количество научных публикаций с использованием указанных видовых эпитетов, было предложено провести консервацию родового названия *Kluveromyces* с новым типовым видом *K. marxianus*, а для видов *K. polysporus* и *K. yarrowii* создать новый род *Vanderwaltozyma* Kurtzman et al. (2001). Предложенная консервация была поддержана Международным Ботаническим Конгрессом.

1.1.4. Филогенетическое родство дрожжей *Kluveromyces*: полиморфизм ядерной и митохондриальной ДНК

Внедрение в систематику дрожжей молекулярных подходов, основанных на техниках ПЦР-анализа, секвенирования и рестрикционного анализа, привело к пересмотру генетического родства видов рода *Kluveromyces*. С помощью рестрикционного анализа гена 18S рРНК был подтверждён видовой статус *K. lactis* и *K. dobzhanskii* (Molina et al., 1992). На основании ПДРФ-анализа (полиморфизма длин рестрикционных фрагментов) митохондриальной ДНК и гена малой субъединицы рРНК дрожжи *Kluveromyces* были разделены на четыре группы: одну составили виды *K. aestuarii*, *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus* и *K. wickerhamii*, вторую – виды *K. africanus*, *K. bacillisporus*, *K. delphensis*, *K. lodderae*, *K. phaffii*, *K. polysporus*, *K. themotolerans*, *K. waltii* и *K. yarrowii*. Третья и четвёртая группы состояли, соответственно, из видов *K. blattae* и *K. cellobiovorus*. Последние два вида имели отдалённое генетическое родство с остальными дрожжами рода *Kluveromyces* (Sidenberg, Lachance, 1986; Shen et al., 1994).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов 18S и 26S рДНК позволил установить полифилию рода *Kluveromyces*. Внутри рода выделили монофилетичную группу, включающую со 100%-ной статистической поддержкой *K. aestuarii*, *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus* и *K. wickerhamii* (Cai et al., 1996; James et al., 1997; Kurtzman, Robnett, 1998). Остальные виды попали в группы с другими аскомицетовыми дрожжами *Saccharomyces*, *Torulaspota* и *Zygosaccharomyces*.

Belloch et al. (1998, 2000, 2002) использовали другие участки генома: ген митохондриальной цитохром-с-оксидазы II (COII), ген 5.8S рРНК и два внутренних транскрибируемых спейсера (ITS1 и ITS2), что позволило установить филогенетические отношения между генетически более родственными видами. Сравнительный анализ подтвердил гетерогенность рода *Kluveromyces*. Попавшие в отдельную группу виды *K. aestuarii*, *K.*

dobzhanskii, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. wickerhamii* авторы рассматривали в качестве «истинных» видов *Kluuveromyces* (Belloch et al., 1998).

Мультигенный филогенетический анализ на основании нуклеотидных последовательностей генов 18S, 26S, ITS-участков, фактора элонгации транскрипции *EF-1 α* , *ACT1*, РНК-полимеразы II и митохондриальных генов малой субъединицы рДНК и цитохром-с-оксидазы II позволил установить филогенетическое родство видов внутри комплекса «*Saccharomyces*» (Kurtzman и Robnett, 2003). Семьдесят пять видов комплекса разделились на 14 клад с высокой поддержкой бутстрепа. Дрожжи *Kluuveromyces* распределились по шести различнымкладам, подтверждая установленную ранее полифилию этого рода.

Дрожжи видов *K. aestuarii*, *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. wickerhamii* и недавно описанный вид *K. nonfermentans* (Nagahama et al., 1999) сформировали отдельную кладу, разделенную на две группы (со статистической поддержкой 90%): морские (*K. aestuarii* и *K. nonfermentans*) и наземные виды (*K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. wickerhamii*).

1.1.5. Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК

В 80-ые годы XX века появилась новая техника пульс-электрофореза, основанная на фракционировании высокомолекулярных ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле в условиях периодически меняющегося по направлению электрического поля (Насонова, 2008). Sor и Fukuhara (1989) первыми провели кариотипический анализ видов рода *Kluuveromyces* и подтвердили видовой статус дрожжей *K. lactis*.

Belloch et al. (1998) на основании анализа молекулярных кариотипов разделили виды рода *Kluuveromyces* на две группы. Первая группа, названная авторами «*Saccharomyces cerevisiae*-типа», включала виды, молекулярные кариотипы которых имели более 12 хромосом: *K. africanus*, *K. bacillisporus*, *K. delphensis*, *K. lodderae*, *K. phaffi*, *K. polysporus* и *K. yarrowii*. Вторая группа (до 10 хромосом) – «*Kluuveromyces marxianus*-типа»: *K. aestuarii*, *K. blattae*, *K. dobzhanskii*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. thermotolerans*, *K. waltii* и *K. wickerhamii*.

Кариотипический анализ выявил гомогенность культурных молочных штаммов *K. lactis* по молекулярным кариотипам, тогда как таксономические виды *K. drosophilorum*, *K. phaseolosporus* и *K. vanudenii* значительно различались кариотипическими паттернами (Belloch et al., 1998; Belloch et al., 2002). Было показано, что европейские природные штаммы *Z. krassilnikovii* имеют идентичные кариотипические профили с молочными дрожжами *K. lactis* (Naumov, Naumova, 2002). Молекулярные данные хорошо согласуются с результатами гибридологического анализа, с помощью которого была установлена частичная генетическая изоляция между *K. drosophilorum*, *K. phaseolosporus*, *K. vanudenii* и *Z. krassilnikovii*. На основании гибридологического анализа и молекулярного кариотипирования, а также литературных данных, была проведена таксономическая ревизия вида *K. lactis* и предложено пять разновидностей: var. *lactis* (Lac⁺) и не утилизирующие лактозу var. *drosophilorum* (Северная Америка), var. *phaseolospora* (Северная Америка), var. *krassilnikovii* (Европа), var. *vanudenii* (Южная Африка) (Naumov, Naumova, 2002).

1.2. Наземные виды рода *Kluyveromyces*

1.2.1. Типовой вид *Kluyveromyces marxianus*

Дрожжи *K. marxianus* выделяются из молочных продуктов, а также встречаются в различных природных источниках: растительный опад, почва, насекомые и др. (Morrissey et al., 2015; Lappe-Oliveras et al., 2008; Verdugo Valdez et al., 2011). Известны клинические изоляты, выделенные из лёгких человека, поражённого туберкулёзом, а также глотки и миндалин (Fonseca, 2008).

Отличительной особенностью дрожжей вида *K. marxianus* является их термотолерантность: способность расти при 47°C, и даже 52°C (Limtong et al., 2007). Благодаря быстрому росту и способности разлагать различные индустриально-значимые субстраты (сахарный тростник, сок кукурузного силоса, патоку, молочную сыворотку) вид *K. marxianus* используется в качестве кормовых дрожжей (Hang et al., 2003; Prazeres et al., 2012). Эти

дрожжи имеют разнообразное биотехнологическое значение и активно используются в пищевой и фармацевтической промышленности, в частности, для получения рекомбинантных белков, ферментов инулиназы и β -галактозидазы (Bilal et al., 2022; Nonklang et al., 2008; Padilla et al., 2015; Morrissey et al., 2015). Дрожжи *K. marxianus* являются недорогостоящим источником пектинолитических ферментов, используемых для экстракции и осветления фруктовых соков, мацерации овощей (Schwan et al., 1997; Fonseca, 2008).

Эти дрожжи продуцируют различные ароматические соединения (фруктовые эфиры, карбоновые кислоты, кетоны, фураны, спирты, монотерпеновые спирты и изоамилацетат) (Scharpf et al., 1986; Fabre et al., 1995). Особую экономическую значимость имеет 2-фенилэтанол, широко применяемый в виноделии, в производстве напитков, ферментированных продуктов, мороженого и кондитерской продукции (Welsh, 1989; Wittmann et al., 2002).

Благодаря способности расщеплять ксилозу, основной компонент лигноцеллюлозных гидролизатов, и термоустойчивости, дрожжи *K. marxianus* используются для производства биоэтанола из отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности (Goshima, 2013; Castro, 2014; Nonklang et al., 2008; Banat et al., 1998).

Дрожжи *K. marxianus* и его анаморфа *Candida kefyr* – обычные обитатели различных молочных продуктов (молоко, творог, сыры, кефир, ряженка, варенец и другие), придавая им приятный вкус и аромат (Morrissey et al., 2015). Благодаря наличию фермента β -галактозидазы, эти дрожжи также применяются для производства безлактозных молочных продуктов или продуктов с пониженным содержанием лактозы, что необходимо для людей с непереносимостью молочного сахара (Rajoka et al., 2003). Способность расщеплять лактозу также используется для биотехнологической переработки отходов молочного производства, молочной сыворотки, сильно загрязняющей окружающую среду (Aktas et al., 2005). Показано, что молочные штаммы *K.*

marxianus обладают пробиотическими свойствами, стимулируя развитие полезных бактерий *Bifidobacterium* и подавляя развитие патогенной микрофлоры (Maccaferri et al., 2012).

1.2.2. Вид *Kluyveromyces lactis*: таксономические разновидности *var. lactis* и *var. drosophilarum*

Дрожжи *K. lactis* – второй, после *S. cerevisiae*, объект фундаментальных и прикладных исследований. Штаммы этих дрожжей выделяются из различных молочных продуктов (молоко, кефир, простокваша, ряженка, творог и др.) и природных источников (сокотечение и кора широколиственных деревьев, почва, насекомые и др.) в разных регионах мира. На основании изоферментного анализа вид *K. lactis* был разделён на разновидности: молочные дрожжи *var. lactis* и природные не утилизирующие лактозу дрожжи *var. drosophilarum* (Sidenberg, Lachance, 1986). К синонимам последней разновидности были отнесены таксономические виды *K. phaseolosporus* и *K. vanudenii*, принятые в определителе дрожжей 1970 г. (van der Walt, 1970), а также европейские дрожжи *Z. krassilnikovii* (Kudrjawzew, 1960). Такое деление достаточно условное. Многими авторами неоднократно высказывались предположения о внутривидовой гетерогенности *K. lactis* (Cottrell et al., 1987; Lehmann et al., 1992; Molina et al., 1992; Molnar et al., 1996). Так, согласно результатам ДНК-ДНК гибридизации штаммы *K. lactis* имеют 64–98% ДНК-гомологии (Fuson et al., 1987; Vaughan-Martini, Martini, 1987). С помощью ПДРФ-анализа мтДНК, RAPD-ПЦР, секвенирования 5.8S-ITS-района рДНК и молекулярного кариотипирования была установлена гетерогенность вида *K. lactis* по многим молекулярным маркерам (Sor, Fukuhara, 1989; Molnar et al., 1996; Belloch et al., 1997, 1998a, 1998b; Naumov, Naumova, 2002). Молочные штаммы *K. lactis var. lactis* имеют одинаковые мтДНК и RAPD-профили, идентичные ITS-последовательности, а также практически не отличаются по молекулярным кариотипам. С другой стороны, разновидность *K. lactis var. drosophilarum* гетерогенна и включает четыре группы, которые соответствуют

таксономическим видам *K. drosophilarum*, *K. phaseolosporus*, *K. vanudenii* и *Z. krassilnikovii*.

Молекулярные данные хорошо согласуются с результатами гибридологического анализа (Naumov, Naumova, 2002). Установлено, что типовые культуры *K. drosophilarum*, *K. phaseolosporus* и *Z. krassilnikovii* частично-генетически изолированы: их гибриды стерильны или полустерильны с выживаемостью аскоспор 0–34%. С другой стороны, *Z. krassilnikovii* и южноафриканские дрожжи *K. vanudenii* образуют фертильные гибриды с 72–90% выживаемости аскоспор. Однако, последние таксономические виды имеют различные кариотипы и мтДНК-профилей, а также географически изолированы (Belloch et al., 1997, 1998a, 2002; Sor, Fukuhara, 1989). На этом основании было предложено рассматривать *K. vanudenii* и *Z. krassilnikovii* в качестве самостоятельных таксонов: видов или разновидностей (Belloch et al., 2002; Naumov, Naumova, 2002).

На основании молекулярных данных и результатов гибридологического анализа была проведена таксономическая ревизия вида *K. lactis* (Naumov, Naumova, 2002). Было предложено пять разновидностей: var. *lactis* (Lac⁺) и не утилизирующие лактозу var. *drosophilarum* (Северная Америка), var. *phaseolospora* (Северная Америка), var. *krassilnikovii* (Европа), var. *vanudenii* (Южная Африка). Предложенная ревизия не была принята в последующих монографиях, посвященных систематике дрожжей *Kluveromyces*; вид *K. lactis*, по-прежнему, был представлен двумя разновидностями var. *lactis* и var. *drosophilarum* (Lachance, 2007, 2011). Было отмечено, что условное деление на две разновидности было сохранено для преемственности в литературе, а также в связи с неоднозначной дифференциацией не усваивающих лактозу дрожжей *K. lactis* на разновидности var. *drosophilarum*, var. *phaseolospora*, var. *krassilnikovii* и var. *vanudenii* (Lachance, 2007).

Еще больше осложнило понимание систематики вида *K. lactis* обнаружение дополнительных популяций не утилизирующих лактозу дрожжей. С помощью ПДРФ-анализа межгенного спейсера IGS2 было

дифференцировано ещё четыре генетические популяции (Naumova et al., 2004). Штаммы, выделенные на Дальнем Востоке России, в Японии и Тайланде, отнесены к популяции «восточная». Три популяции обнаружены в Северной Америке: «*pseudovanudenii*», «новая» и «водная». Согласно филогенетическому анализу последовательностей 5.8S-ITS-района рДНК более дивергентными являются популяции «водная» и «восточная», тогда как «*vanudenii*», «среднеазиатская» и «*krassilnikovii*» генетически более близки молочным дрожжам *K. lactis* var. *lactis* (Naumova et al., 2004).

Определенную трудность для практических микробиологов представляет дифференциация молочных штаммов *K. lactis* и *K. marxianus*, которые часто совместно встречаются в молочных продуктах. Фенотипически эти виды очень похожи и имеют практически идентичные D1/D2-последовательности (только одна нуклеотидная замена). Для дифференциации этих видов было предложено использовать ПДРФ-анализ 5.8S-ITS участка рДНК с помощью эндонуклеазы *Hind*III: соответствующий сайт рестрикции имеется у *K. marxianus* и отсутствует у *K. lactis* (Наумова и др., 2012). Молекулярно-генетический анализ более пятидесяти штаммов дрожжей *Kluveromyces*, в основном молочного происхождения, также показал, что *K. lactis* отличается от *K. marxianus* способностью ассимилировать α -глюкозиды: мальтозу, изомальтозу и мелицитозу (Наумова и др., 2012).

1.2.3. Виды *Kluveromyces dobzhanskii*, *Kluveromyces wickerhamii* и *Kluveromyces starmeri*

Дрожжи *K. dobzhanskii* были впервые выделены из *Drosophila pseudoobscura* в 1955 году в Южной Калифорнии (Shehata et al., 1955). Они имеют бобовидные аскоспоры, разрывающиеся при созревании и сходный с *K. drosophilorum* ассимиляционный спектр углеродных соединений. Однако отличаются от последних способностью ферментировать мальтозу. По результатам гибридологического анализа *K. dobzhanskii* был переведен в разновидности *K. marxianus* (van der Walt, Johannsen, 1979; van der Walt, Johannsen, 1984). На основании изоферментного анализа вид *K. dobzhanskii*

был восстановлен (Sidenberg, Lachance, 1986). Самостоятельный видовой статус этих дрожжей был позднее подтвержден мультигенным филогенетическим анализом (Kurtzman, Robnett, 2003). *K. dobzhanskii* отличается от других видов *Kluveromyces* по ряду физиологических признаков: слабый рост или его отсутствие при 37 °С, неспособность ассимилировать лактозу и хороший рост на β-глюкозидах (целлобиоза и салицин) (Kurtzman et al., 2011). *K. dobzhanskii* имеют высокий внутривидовой полиморфизм. С помощью молекулярного каритипирования было показано наличие пяти различных хромосомных паттернов у 11 штаммов различного происхождения. Более того, рестрикционный анализ митохондриальной ДНК установил наличие уникального гаплотипа для каждого анализируемого штамма *K. dobzhanskii* (Belloch et al., 1997; Belloch et al., 1998). С помощью филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей ITS-участков рДНК и молекулярного каритипирования 30 штаммов *K. dobzhanskii* различного экологического и географического происхождения разделились на три популяции: Европейская, Североамериканская и Дальневосточная (Sukhotina et al., 2006; Наумова и др., 2021).

В отличие от *K. dobzhanskii* таксономический статус *K. wickerhamii* никогда не подвергался ревизиям. Дрожжи были выделены в 1956 году из *Drosophila montana* и *Drosophila pinicola* в Сьерра-Невада в Калифорнии (Phaff et al., 1956). Форма спор также бобовидная или серповидная, однако ферментационные и ассимиляционные характеристики сильно отличаются от других видов *Kluveromyces*. Некоторые штаммы *K. wickerhamii* способны продуцировать широкий спектр киллерных токсинов, эффективных не только против других *Kluveromyces* и родственных видов, но также против множества неродственных дрожжей (Lehmann et al., 1987b, Vaughan-Martini, Rosini, 1989). *K. wickerhamii* способны только ассимилировать лактозу, но не сбраживают ее, что связано с отсутствием активной пермеазы лактозы (Наумов, 2005).

Недавно описан пятый наземный вид *K. starmeri* (Freitas et al., 2020). Дрожжи были выделены из некротических тканей растений, цветов, плодов и ассоциированных с кактусами насекомых в Бразилии. Дрожжи *K. starmeri* имеют узкий спектр утилизируемых углеродных соединений из-за сильной специализации к обитанию на кактусах. Указанный вид был описан на основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена 18S рРНК, ITS-участка и домена D1/D2. Дрожжи вида *K. starmeri* не удается дифференцировать только на основании ассимиляционных тестов. *K. starmeri* отличается от *K. wickerhamii* неспособностью ассимилировать лактозу, а от *K. lactis* и *K. dobzhanskii* отсутствием утилизации мальтозы. Ассимиляционные спектры *K. starmeri* и *K. marxianus* перекрываются.

1.3. Морские виды *Kluveromyces*: *K. aestuarii*, *K. nonfermentas* и *K. siamensis*

Вид *K. aestuarii* был впервые описан в 1961 году (Fell, 1961). Дрожжи выделены из осадка эстуария залива Бискейн на глубине около двух метров во Флориде. Позднее эти дрожжи были обнаружены под мангровой растительностью в лесах Рио-де-Жанейро (Araujo et al., 1995; Soares et al., 1997). Они ассоциированы с дендритофагами (Araujo et al., 1995). Дрожжи *K. aestuarii* широко распространены в мангровых лесах Бразилии и были предложены в качестве индикатора экологического состояния мангровых зарослей (Araujo et al., 2011). Отсутствие *K. aestuarii* в мангровом лесу может свидетельствовать о некотором загрязнении или другом изменении среды обитания. Ростовые характеристики вида *K. aestuarii* существенно не отличаются от таковых других представителей рода, за исключением того, что в присутствии 5 или 10% хлорида натрия на YM-агаре рост и выработка пульхерримина особенно интенсивны, тогда как на 50% глюкозе рост не происходит (Kurtzman et al., 2011). Ассимиляция лактозы, в сочетании с отсутствием роста на 0,01% циклогексимиде, позволяют дифференцировать *K. aestuarii* от остальных видов рода *Kluveromyces*.

Сестринский вид морских дрожжей *K. nonfermentans* был выделен значительно позже, в 1999 году, из донных отложений, моллюсков и крабов, собранных на глубинах 1000–2000 м в заливах Суруга и Сагами в Японии (Nagahama et al., 1999). Глубоководные дрожжи *K. nonfermentans* занимают особую нишу среди других дрожжей *Kluyveromyces*, и отличаются от них отсутствием ассимиляции сахарозы, лактозы и янтарной кислоты в качестве единственных источников углерода. В самостоятельный вид дрожжи были выделены на основании различий в ITS-участке рДНК и ДНК-реассоциации. Мультигенный филогенетический анализ подтвердил близкое родство этих дрожжей с видом *K. aestuarii*, с которыми они сформировали отдельный кластер (Kurtzman, Robnett, 2003). По-видимому, указанные виды произошли от общего предка, адаптированного к морской среде. Неферментирующие дрожжи *K. nonfermentans* произошли от *K. aestuarii*-подобных микроорганизмов, эволюция которых происходила за счет адаптации к более глубоководным местообитаниям. Третий морской вид *K. siamensis* описан на материале штаммов, выделенных из вод мангровых лесов в провинции Ранонг в Тайланде (Am-In et al., 2008). Дрожжи физиологически очень схожи с видом *K. aestuarii*, а также имеют сходную среду обитания. Дифференцировать вид *K. siamensis* от *K. aestuarii* можно по нуклеотидным последовательностям домена D1/D2 и ITS1-5.8S-ITS2 района (Kurtzman, Robnett, 1998; Sugita et al., 1999).

ГЛАВА 2. СИСТЕМА ГЕНОВ LAC

2.1. Общая характеристика β -галактозидаз, лактозный оперон

Лактоза представляет собой дисахарид, содержащий остатки молекул глюкозы и галактозы, связанные β -1,4-D-галактозидной связью (рис. 1). Лактоза является основным углеводом молока млекопитающих, а в природе практически не встречается (Brüssow, 2013). Гидролиз лактозы осуществляется при участии фермента β -галактозидазы, или лактазы (К.Ф 3.2.1.23), который имеется у растений, животных, бактерий, мицелиальных грибов и дрожжей (de Albuquerque et al., 2021). У человека лактаза вырабатывается у грудных детей, однако с возрастом эта способность, как правило, утрачивается. Только у одной трети населения мира сохраняется лактаза во взрослом возрасте (Ségurel, Von, 2017). Переносимость лактозы имеет ярко выраженный этнический характер: в странах Скандинавии этот показатель достигает 95%, тогда как в Юго-Восточной Азии и странах Африки почти 100% населения характеризуются непереносимостью лактозы (Curry, 2013; Storhaug et al., 2017). В России наибольшая частота переносимости лактозы наблюдается на Северо-Западе, в одном из основных регионов с развитым молочным животноводством (Khabarova et al., 2011).

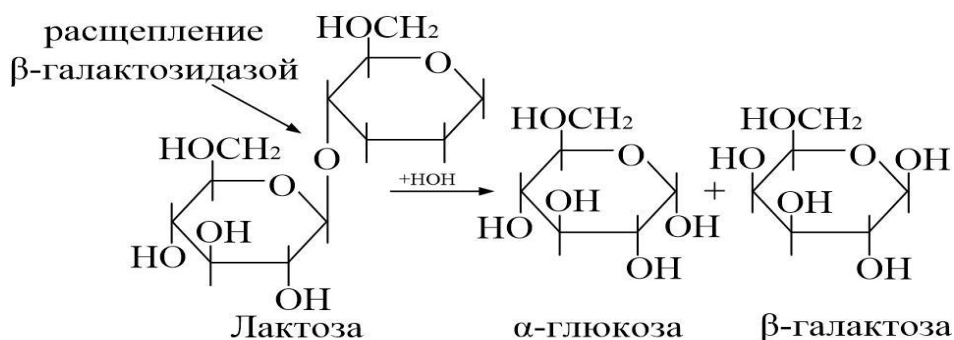


Рис. 1. Гидролиз молекулы лактозы ферментом β -галактозидазой

Регуляция экспрессии генов метаболизма лактозы впервые была изучена у кишечной палочки *Escherichia coli* (Jacob et al., 1960; Jacob, Monod, 1961). За это исследование Жакоб и Моно получили в 1965 году (совместно с Львовым) Нобелевскую премию. Было показано, что *lac* оперон *Escherichia coli* состоит из трёх структурных генов, необходимых для утилизации лактозы, *lacZ*, *lacY*

и *lacA*, кодирующих соответственно β -галактозидазу, *lac* пермеазу и трансацетилазу.

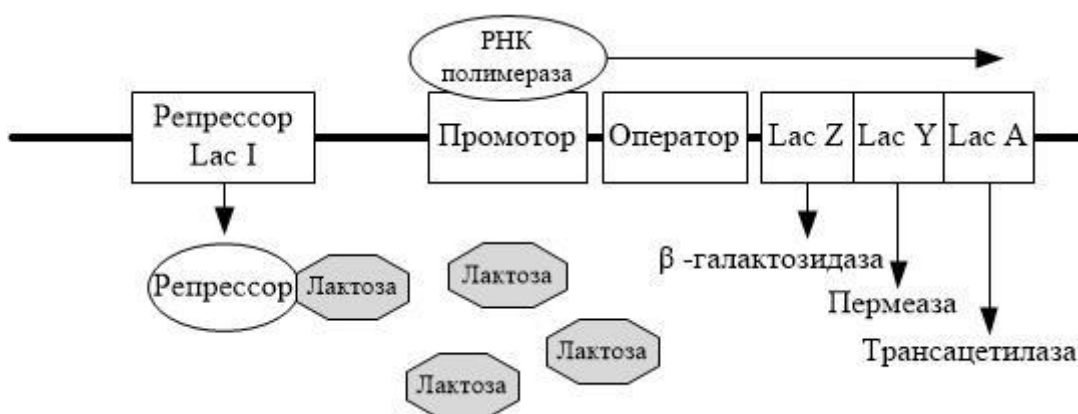


Рис. 2. Оперон *Escherichia coli*

Фермент β -галактозидаза расщепляет дисахарид лактозу на глюкозу и галактозу (рис. 2). Мембранный транспортный белок β -галактозидпермеаза доставляет лактозу внутрь клетки, а фермент β -галактозидтрансацетилаза переносит ацетильную группу с коэнзима А (CoA) на гидроксильную группу β -галактозидов. Гены *lacZYA*, составляющие оперон, регулируются вместе, а их экспрессия индуцируется лактозой в условиях углеродного голодания. При достаточной концентрации глюкозы в клетке активация лактозного оперона не происходит (Osbourn, Field, 2009).

Ферментация лактозы довольно редкий признак среди дрожжей. Только 1% из более чем 700 известных видов аскомицетовых дрожжей способны утилизировать данный дисахарид. Помимо дрожжей *Kluyveromyces*, этим свойством обладают только некоторые виды *Candida*, *Debaryomyces* и *Scheffersomyces*. Следует отметить, что дрожжи последних трёх родов ассимилируют лактозу, но не способны её ферментировать. Виды рода *Kluyveromyces* существенно различаются по способности утилизировать лактозу (табл. 1).

Таблица 1. Утилизация и ферментация лактозы дрожжами *Kluyveromyces*

| Видовое название | Утилизация лактозы | |
|---|--------------------|-------------|
| | ферментация | ассимиляция |
| <i>K. lactis</i> var. <i>lactis</i> (молочные штаммы) | + | + |
| <i>K. lactis</i> var. <i>drosophilorum</i> | – | – |
| <i>K. marxianus</i> (природные штаммы) | –/слабо | + |
| <i>K. marxianus</i> (молочные штаммы) | + | + |
| <i>K. wickerhamii</i> | – | + |
| <i>K. dobzhanskii</i> | – | – |
| <i>K. aestuarii</i> | – | + |
| <i>K. nonfermentans</i> | – | + |
| <i>K. siamensis</i> | – | + |
| <i>K. starmeri</i> | – | – |

Из восьми видов *Kluyveromyces* не утилизируют лактозу два из них: *K. dobzhanskii* и *K. starmeri*. Дрожжи видов *K. lactis* и *K. marxianus* характеризуются внутривидовым полиморфизмом по признаку утилизации лактозы. Способностью ферментировать лактозу обладают только молочные штаммы *K. marxianus* и *K. lactis* var. *lactis*. Штаммы *K. lactis* var. *drosophilorum* не утилизируют лактозу, тогда как природные изоляты *K. marxianus* ассимилируют лактозу, но не сбраживают или сбраживают слабо.

Фермент β -галактозидаза обладает гидролитической и трансгалактозилирующей активностью (Guerrero et al., 2015; Vera et al., 2020). Гидролитическая активность широко используется в пищевой промышленности для производства молочных продуктов с пониженным содержанием лактозы или её полным отсутствием (Vera et al., 2016). Интерес к таким продуктам постоянно растет, в связи с тем, что более 70% населения в мире обладают непереносимостью лактозы и не могут использовать лактозо-содержащие продукты. У этих людей отсутствует активная β -галактозидаза в ворсинках тонкого кишечника. Непереваренная лактоза попадает в толстый

кишечник, где подвергается ферментации местной микрофлорой, что приводит к газообразованию и кишечным расстройствам (Lee, Krasinski, 1998; Nogales, Lopez, 2006).

Благодаря трансгалактозилирующей активности фермент используется для продукции галактозилированных веществ, таких как галактоолигосахариды, применяемые в качестве пребиотиков (Heuman, 2006; Gonz'alez-Catano et al., 2017). Также β -галактозидаза широко используется в пищевой промышленности для придания сладости, улучшения растворимости, вкуса и усвояемости молочных продуктов (Husain, 2010). Фермент активно применяется для переработки отходов молочного производства (сыворотки), которая представляет серьёзную экологическую проблему (Sampaio et al., 2020; de Albuquerque et al., 2021). Данный побочный продукт удерживает около 55% питательных веществ молока, в том числе лактозы, которая содержится в количестве 4.5–5.0%. Сывороточная лактоза может быть использована в качестве источника углерода в различных биологических процессах (получение биоэтанола, пробиотиков и др.), таким образом, снижая экологическую проблему, связанную с её утилизацией. Депротеинизированная сыворотка может быть использована как альтернативная среда для продукции дрожжей *K. lactis* в качестве кормового белка (Sampaio et al., 2016).

Дрожжи *K. lactis* и *K. marxianus* безопасны для человека и обладают уникальными пробиотическими свойствами: повышают барьерные функции кишечника и функциональную активность иммунной системы (Bonekamp, Oosterom, 1994; Kumura et al., 2004). Для увеличения продукции β -галактозидазы используют генетически модифицированные штаммы этих дрожжей (Panesar et al., 2010; Vecerra et al., 2004; Oliveira et al., 2011). Полученные генно-инженерными методами штаммы имеют ограниченное применение и не подходят для использования в пищевой промышленности. В этой связи, актуальным является создание производственных штаммов

дрожжей *Kluveromyces*, способных наиболее эффективно ферментировать лактозу.

2.2. Система генов *LAC* дрожжей *Kluveromyces*

2.2.1. *Kluveromyces lactis* var. *lactis*

Наиболее полно система генов ферментации лактозы изучена на выделенном из сливок в США штамме дрожжей *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140 – родоначальнике генетических линий (Dickson, Riley, 1989; Breunig et al., 2000). Принимая во внимание, что у этих дрожжей лактоза гидролизуется ферментом β -галактозидазой внутриклеточной локализации, для транспорта сахара в клетку необходимо наличие пермеазы. У NRRL Y-1140 идентифицированы тесно сцепленные гены *LAC4* и *LAC12*, кодирующие, соответственно, β -галактозидазу и пермеазу лактозы, а также регуляторную последовательность (Fairhead, Dujon, 2006) (рис. 3).

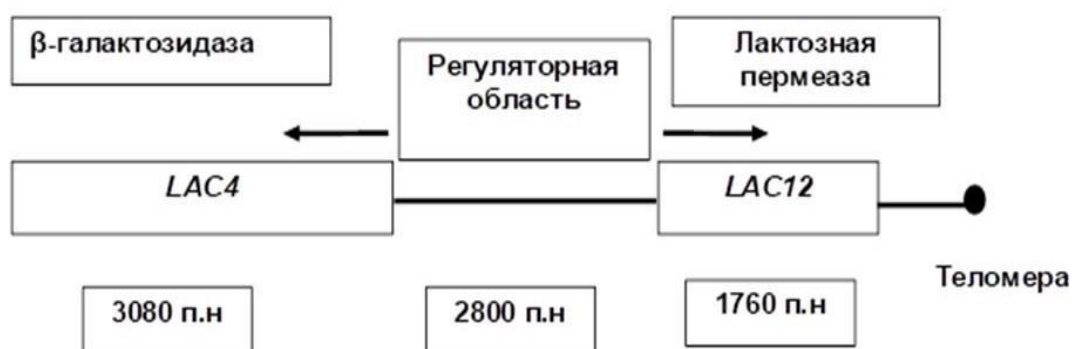


Рис. 3. Строение лактозного локуса *LAC4-LAC12*, расположенного в теломерном районе хромосомы II штамма *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140 (Fairhead, Dujon, 2006).

Наряду с тесно сцепленными структурными генами *LAC4* и *LAC12*, за ферментацию лактозы отвечают структурные галактозные гены *GAL1* (киназы), *GAL7* (трансферазы) и *GAL10* (эпимеразы), кодирующие ферменты пути Лелуара (Dickson, Barr, 1983; Webster, Dickson, 1988) (рис. 4). Эти гены регулируются вместе с генами *LAC4* и *LAC12* на транскрипционном уровне галактозо-лактозными регуляторными генами *LAC9* и *LAC10*, являющиеся, соответственно, позитивным и негативным регулятором (Lacy, Dickson, 1981; Salmeron, Johnston, 1986; Godecke et al., 1991; Zenke et al., 1996). Лактозный

метаболизм индуцируется присутствием лактозы или галактозы в среде. Индукция лактозой происходит после попадания данного дисахарида в клетку и его гидролиза, и уже образовавшаяся внутриклеточная галактоза служит в качестве индуцирующей молекулы. Утилизация лактозы включает транспорт дисахарида лактозы в клетку с помощью пермеазы (*LAC12*) через протонный симпорт и последующий внутриклеточный гидролиз β -галактозидазой (*LAC4*) до глюкозы и галактозы. Затем глюкоза в цепи последовательных ферментативных реакций преобразуется в этиловый спирт с высвобождением CO_2 и АТФ. В процессе брожения галактоза сначала преобразуется в глюкозо-6-фосфат через метаболический путь Лелуара, проходя пять последовательных этапов ферментативных преобразований (рис. 4).



Рис. 4. Схема утилизации дисахарида лактозы. Ферменты пути Лелуара: I – муторотаза; II – галактокиназа; III – галактозо-1-фосфо уридилтрансфераза; IV – UDP-галактозо-4-эпимераза; V – фосфоглюкомутаза.

Присутствие глюкозы в среде вызывает временную репрессию лактозного метаболизма. Однако утилизация лактозы полностью не прекращается. Показано, что *K. lactis* растёт намного быстрее на лактозе, чем на глюкозе, указывая на то, что эволюция данного организма шла в

направлении эффективной утилизации именно этого субстрата (Dickson, Markin, 1980).

При скрещивании штаммов NRRL Y-1118 и NRRL Y-1140 были обнаружены полимерные лактозные локусы *LAC1* и *LAC2*: у гибридов в мейозе наблюдалось дигенное полимерное расщепление по способности ферментировать лактозу (Herman, Halvorson, 1963). Однако взаимоотношения генов *LAC1/LAC2* с генами *LAC4* и *LAC12* осталось неизученным. С помощью хромосомного картирования было установлено расположение локуса *LAC2* в субтеломерном районе правого плеча второй хромосомы (Wesolowski-Louvel, Fukuhara, 1995; Fairhead, Dujon, 2006). Комплементационным анализом было продемонстрировано сложное строение полимерных локусов *LAC1/LAC2*, включающих сцепленные гены *LAC4* и *LAC12*, а с помощью Саузерн-гибридизации установлена хромосомная локализация локуса *LAC1* в хромосоме III (Наумов, 2008). Третий полимерный локус *LAC3*, расположенный на хромосоме IV, обнаружен относительно недавно у штаммов *K. lactis* var. *lactis*, выделенных из молочных продуктов в бывшем Советском Союзе (Наумов, Наумова, 2014). С помощью Саузерн-гибридизации установлено, что дрожжи разновидности *K. lactis* var. *drosophilarum*, не способные усваивать лактозу, не имеют даже молчащей последовательности генов *LAC4* и *LAC12* (Наумов и др., 2006).

2.2.2. *Kluyveromyces marxianus*

К числу многочисленных синонимов *K. marxianus* относятся и три таксономических вида *K. marxianus*, *K. fragilis* и *K. wickenii*, которые были объединены в один вид на основании почти 100%-ного ДНК-ДНК сходства (Lachance, 1998, 2011). Указанные таксономические виды дифференцировали по признаку утилизации лактозы (van der Walt, 1970). Природные штаммы *K. marxianus* способны только ассимилировать или слабо ферментировать лактозу, тогда как молочные дрожжи *K. fragilis* активно ферментируют лактозу. Выделенный из пива Банту в Южной Африке эндемичный вид *K. wickenii* совсем не утилизирует лактозу.

Различия между способностью дрожжей *K. marxianus*, *K. fragilis* и *K. wickenii* утилизировать лактозу были установлены с помощью комплементационного анализа при гибридизации с *lac*-тестерами *K. lactis* var. *lactis*, обладающими разными генотипами *LAC4lac12* и *lac4LAC12* (Наумов, 2006). Были выявлены три типа лактозных пермеаз. Природные штаммы *K. marxianus* обладают низкоактивной лактозной пермеазой – генотип *lac12L*, при этом ген *LAC4* у них активен. Штаммы таксономического вида *K. wickenii* имеют полностью неактивную лактозную пермеазу, у них соответствующий ген отсутствует или поврежден – генотип *lac12*. Активно сбраживающие лактозу молочные дрожжи таксономического вида *K. fragilis* обладают генотипом *LAC12*. На специальной среде с антимицином А была установлена зависимость от дыхания лактозных пермеаз у штаммов из трех групп (Наумов, 2006). Было показано, что молочные культурные штаммы популяции «*fragilis*» обладают сильной лактозной пермеазой, которая не зависит от дыхания. Природные дикие штаммы «*marxianus*» имеют слабую пермеазную активность, зависящую от дыхания. Штаммы этой популяции способны ассимилировать лактозу или слабо ее ферментировать. Эндемичные дрожжи из алкогольных ферментаций в Южной Африке «*wickenii*» не имеют активной пермеазы лактозы и не способны даже ассимилировать лактозу.

Феномен ассимиляции сахаров дрожжами в аэробных условиях и неспособность их сбраживать в анаэробных условиях получил название эффекта Клюйвера (Fukuhara, 2003, 2006). Причиной только ассимиляции сахаров может быть ограниченность их специфического транспорта в клетку.

Генетические данные хорошо согласуются с результатами недавно проведенного сравнительного анализа пермеазных генов *LAC12* у штаммов *K. marxianus*, выделенных из молочных продуктов и различных природных источников (Varela et al., 2017, 2019). На основании геномного анализа штаммов *Kluyveromyces*, депонированных в GenBank, авторами была реконструирована история эволюции генов утилизации дисахаридов лактозы и целлобиозы. Показано, что предковый белок *LAC12* был

бифункциональным и участвовал в транспорте обоих дисахаридов внутрь клетки, затем гидролиз лактозы осуществлялся LAC4, а целлобиозы CEL2. В процессе эволюции у дрожжей *K. marxianus* и *K. nonfermentans* произошла потеря собственного целлобиозного транспортера CEL1, который сохранился у остальных видов рода *Kluyveromyces*. У дрожжей *K. marxianus* вместе с потерей CEL1 произошла дупликация гена *LAC12*, в результате которой образовалось четыре копии, локализованные в субтеломерных районах различных хромосом: хр. 8, хр. 2 и оба плеча хромосомы 3 (рис. 5). Однако только расположенный в левом плече хромосомы 3 предковый ген *LAC12* кодирует функциональную пермеазу лактозы, а остальные копии участвуют в транспорте другого дисахарида – целлобиозы (Varela et al., 2019).

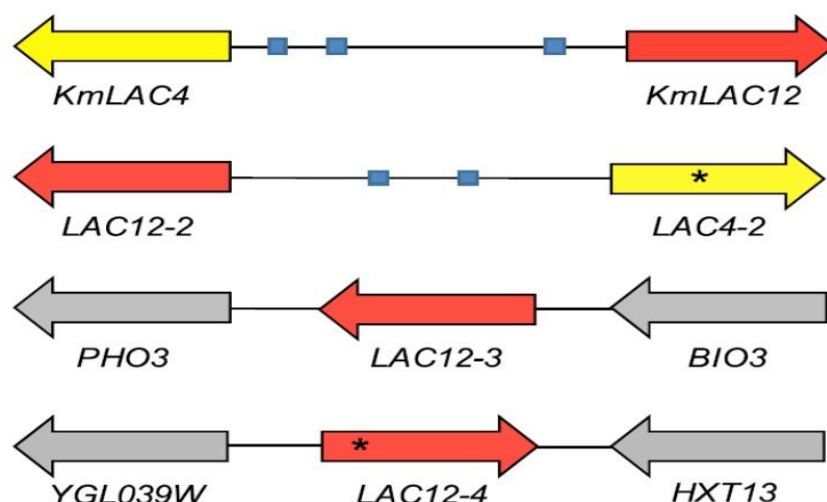


Рис. 5. Строение лактозных локусов штамма *K. marxianus* CBS 6556. Соседние гены, показанные серым цветом, названы в соответствии с их ортологами у *S. cerevisiae*. *KmLAC12* и *KmLAC4* относятся к генам функциональной лактозной пермеазы и β -галактозидазы соответственно. Псевдогены *LAC4-2* и *LAC12-4* отображены в виде стрелок, содержащих звездочки, указывающие на мутации, которые прерывают рамку считывания. Синие квадраты представляют предполагаемые сайты связывания *Gal4p* (Varela et al., 2017).

У не способных ферментировать лактозу природных штаммов *K. marxianus* обнаружено 13 замен в белке LAC12 по сравнению с соответствующим белком молочных и госпитальных штаммов (Varela et al., 2017). Независимо от источника выделения, все изученные штаммы *K. marxianus* обладали функциональным геном *LAC4* (хр. 3L), тогда как

остальные копии (хромосомы 8, 2 и правое плечо хромосомы 3) были утрачены или вырождены в псевдогены (рис. 5).

Varela et al. (2019) провели секвенирование и аннотацию генома типовой культуры *K. lactis* var. *drosophilum* CBS 2105, выделенной из *Drosophila* sp. в США. В геноме этого штамма не было обнаружено последовательностей генов *LAC4* и *LAC12*, что полностью согласуется с результатами, полученными ранее Наумовым и др. (2006), которые показали отсутствие гибридизационных сигналов с зондами *LAC4* и *LAC12* при Саузерн-гибридизации штаммов различных популяций *K. lactis* var. *drosophilum*.

У штамма *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140 и дрожжей *K. marxianus* генный кластер *LAC4-LAC12* расположен, соответственно, в субтеломерной области хромосом II R и 3L (Fairhead, Dujon, 2006; Bussereau et al., 2006; Varela et al., 2017). С помощью точечно-матричного анализа (англ. dot matrix plots) было проведено сравнение субтеломерных областей указанных хромосом у штаммов *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140, *K. lactis* var. *drosophilum* CBS 2105 и трех штаммов *K. marxianus*: L03 (молоко), NBRC 1777 (почва) и UFS Y-2791 (сок *Agave americana*) (Varela et al., 2019). Сходство нуклеотидных последовательностей хромосом II R и 3L на большей части длины составляет всего 63.4–64.5%, однако, начиная с кластера *LAC4-LAC12* оно резко возрастает до 99.8% (штамм L03), 96.1% (NBRC 1777) и 85.1% (UFS Y-2791). С другой стороны, у разновидностей *K. lactis* нуклеотидные последовательности правого плеча второй хромосомы идентичны на 94.1%, за исключением субтеломерного участка длиной около 15 т.п.н., в котором расположен генный кластер *LAC4-LAC12*. Авторы предположили, что в результате межвидовой гибридизации мог произойти перенос лактозного кластера из молочного штамма *K. marxianus* в правое плечо хромосомы II природных дрожжей *K. lactis* var. *drosophilum*. Ранее Наумов и др. (2006) уже высказывали предположение о том, что доместикация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* произошла на основе приобретения генного кластера *LAC4-LAC12* от молочных штаммов *K. marxianus*.

2.2.3. *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* и *K. starmerii*

Дрожжи *K. wickerhamii* ассимилируют лактозу, но не способны ее сбраживать (Lachance et al., 2011). Причина неспособности ферментировать лактозу была установлена с помощью комплементационного анализа при гибридизации семи штаммов *K. wickerhamii* с тестерными штаммами *K. lactis* var. *lactis*, имеющими поврежденные гены *lac* (Наумов, 2005). Гибриды всех штаммов *K. wickerhamii* с тестерами *K. lactis* var. *lactis* генотипа *LAC4 LAC12* и *lac4 LAC12* сбраживали лактозу, тогда как гибриды с дрожжами *K. lactis* var. *lactis* генотипа *LAC4 lac12*, обладающими только β -галактозидазой, лактозу не сбраживали. Таким образом, дрожжи *K. wickerhamii* обладают активным β -галактозидазным геном *LAC4*, но их пермеаза *LAC12* имеет низкую активность (Наумов, 2005).

Остальные два наземных вида, *K. dobzhanskii* и *K. starmerii* не способны утилизировать лактозу (Lachance et al., 2011; Freitas et al., 2020). Показано, что *K. dobzhanskii* не имеют даже молчащих последовательностей генов *LAC* (Varela et al., 2019).

2.2.4. *K. aestuarii*, *K. nonfermentas* и *K. siamensis*

Лактозные гены морских видов *K. aestuarii*, *K. nonfermentas* и *K. siamensis* активно не изучались. Известно, что указанные дрожжи способны только ассимилировать данный дисахарид (Lachance et al., 2011). *K. aestuarii* и *K. nonfermentas* имеют оба гена *LAC4* и *LAC12*, однако, как и для дрожжей *K. wickerhamii*, для них характерен Клюйвер эффект: дрожжи способны только ассимилировать лактозу (Varela et al., 2019). Также дрожжи имеют сходную генную организацию с видом *K. wickerhamii*, за исключением *K. nonfermentas*, потерявшего целлобиозный транспортер *CEL1*.

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Объекты исследования и методы культивирования

Объектами исследования служили 107 штаммов *Kluyveromyces*. Из них 67 штаммов *K. lactis* и восемь штаммов *K. marxianus* использовали в экспериментальной работе. Остальные, 16 штаммов *K. lactis* и 11 штаммов *K. marxianus*, а также типовые штаммы *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. siamensis* были использованы только для филогенетического анализа. Последовательности последних штаммов взяты из базы данных GenBank и публикаций Naumova et al. (2004) и Friedrich et al. (2023) (в таблицах отмечены звёздочкой). Типовые культуры *Scheffersomyces stipitis* и *Debaryomyces hansenii* были привлечены для сравнения. Используемые в работе штаммы дрожжей и их происхождение приведены в табл. 2, 3 и 4.

Таблица 2. Изученные штаммы дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*

| Название и номер штамма | Происхождение | | Локус <i>LAC</i> |
|-------------------------|--------------------|-----------------|------------------|
| | Источник выделения | Место выделения | |
| 1 | 2 | | 3 |
| ВКМ У-868 (Т) | Мягкий сыр | Великобритания | <i>LAC2</i> |
| NRRL У-1140 | Сливки | США | <i>LAC2</i> |
| SM 3.8 | Сыр Камамбер | Франция | <i>LAC2</i> |
| SM 5.8 | Сыр Камамбер | Франция | <i>LAC2</i> |
| SM 6.7 | Сыр Камамбер | Франция | <i>LAC2</i> |
| SM 16.9 | Сыр Камамбер | Франция | <i>LAC2</i> |
| SM 48.7 | Сыр Камамбер | Франция | <i>LAC2</i> |
| CBS 762 | Сливки | США | <i>LAC2</i> |
| CBS 845 | Молоко | Великобритания | <i>LAC2</i> |
| CBS 1065 | Молоко | Неизвестно | <i>LAC2</i> |
| CBS 1797 | Мокрота | Норвегия | <i>LAC2</i> |
| CBS 2360 | Молоко | Неизвестно | <i>LAC2</i> |
| CBS 2619 | Сливки | США | <i>LAC2</i> |
| CBS 5618 | Мокрота | Норвегия | <i>LAC2</i> |
| CBS 8043 | Кишечник ребёнка | Новая Зеландия | <i>LAC2</i> |

Продолжение табл. 2.

| 1 | 2 | | 3 |
|-------------|---------------------------|--------------------------------|-----------|
| ВКПМ Y-3737 | Почва | Москва, Россия | LAC2 |
| H1 | Почва | Москва, Россия | LAC2 |
| H2 | Почва | Москва, Россия | LAC2 |
| H3 | Почва | Москва, Россия | LAC2 |
| GG799* | Пищевая промышленность | США | LAC2 |
| F61* | Молоко | Неизвестно | LAC2 |
| NRRL Y-1118 | Сливки | США | LAC1 |
| CBS 1067 | Молоко | Нидерланды | LAC1 |
| ВКМ Y-762 | Сливки | США | LAC1 |
| ВКМ Y-869 | Кислое молоко | Кольский полуостров, Россия | LAC1 |
| ВКМ Y-870 | Чал | Туркмения | LAC1 |
| ВКМ Y-896 | Мягкий сыр | Италия | LAC1 |
| ВКМ Y-1527 | Мокрота | Испания | LAC1 |
| ВКМ Y-1186 | Молоко | Киев, Украина | LAC3 |
| ВКМ Y-1333 | Кислое молоко | Ставропольский край, Россия | LAC3 |
| ВКМ Y-1339 | Сметана | Санкт-Петербург, Россия | LAC3 |
| ВКМ Y-1343 | Молоко | Гомельская обл., Беларусь | LAC3 |
| ВКМ Y-1868 | Чал | Туркмения | LAC1/LAC3 |
| УСМ Y-328 | Кефир | Киев, Украина | LAC1/LAC2 |
| ВКПМ Y-492 | Молочная сыворотка | Украина | LAC1/LAC2 |

Таблица 3. Изученные штаммы не утилизирующих лактозу (Lac⁻) дрожжей *Kluveromyces lactis* var. *drosophilarum*

| Название и номер штамма | Происхождение | | Установленная популяция |
|--------------------------|--|-----------------|-------------------------|
| | Источник выделения | Место выделения | |
| 1 | 2 | | 3 |
| «vanudenii» | | | |
| ВКМ У-1535 (Т) | Винный подвал | ЮАР | var. <i>lactis</i> |
| «krassilnikovii» | | | |
| ВКМ У-831 (Т) | Сокотечение дуба | Калуга, Россия | «krassilnikovii» |
| ВКМ У-834 | Сокотечение дуба | Калуга, Россия | «krassilnikovii» |
| CBS 9058 | Сокотечение дуба | Воронеж, Россия | «krassilnikovii» |
| CBS 9059 | Буровая мука | Испания | «krassilnikovii» |
| CBS 2877 | Кишечник коровы | Португалия | «krassilnikovii» |
| CBS 2896 | Сокотечение дуба | Калуга, Россия | «krassilnikovii» |
| «среднеазиатская» | | | |
| UCM У-1891 | Кишечник осы <i>Dolichovespula saxonica</i> | Таджикистан | «krassilnikovii» |
| UCM У-1892 | Кишечник осы <i>Dolichovespula saxonica</i> | Таджикистан | «krassilnikovii» |
| «drosophilarum» | | | |
| ВКМ У-1302 (Т) | <i>Drosophila azteca</i> | Калифорния, США | «drosophilarum» |
| UWO(PS) 79-169 | <i>Prunus virginiana</i> | Онтарио, Канада | «drosophilarum» |
| UWO(PS) 79-261 | <i>Prunus virginiana</i> | Онтарио, Канада | «drosophilarum» |
| UWO(PS) 82-233 | <i>Drosophila</i> sp. | Онтарио, Канада | «drosophilarum» |
| UWO(PS) 82-210 | <i>Drosophila</i> sp. | Онтарио, Канада | «drosophilarum» |
| UWO(PS) 81-109 | Сокотечение дуба | Онтарио, Канада | «drosophilarum» |
| UCDFST 51-144* | <i>Drosophila azteca</i> | Калифорния, США | «drosophilarum» |
| UCDFST 52-163* | <i>Drosophila miranda</i> | Калифорния, США | «drosophilarum» |

Продолжение табл. 3.

| 1 | 2 | | 3 |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| UCDFST 52-190* | <i>Aulacigaster sp.</i> | Калифорния, США | «drosophilarum» |
| UCDFST 52-204* | <i>Aulacigaster sp.</i> | Калифорния, США | «drosophilarum» |
| UCDFST 81-535.1* | Сокотечение дуба | Аризона, США | «drosophilarum» |
| «НОВАЯ» | | | |
| UWO(PS) 80-45 | <i>Prunus virginiana</i> | Онтарио, Канада | «drosophilarum» |
| UWO(PS) 85-256.1 | Дуб | Аризона, США | «drosophilarum» |
| «phaseolosporus» | | | |
| ВКМ Y-1296 (Т) | <i>Drosophila sp.</i> | Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 51-272 | <i>Drosophila sp.</i> | Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 61-200 | <i>Drosophila sp.</i> | Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 50-112 | <i>Drosophila pseudoobscura</i> | Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 50-152* | Листья кустарника | Южная Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 50-81* | <i>D. pseudoobscura</i> | Южная Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 51-237* | <i>D. pinicola</i> | Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 57-107* | Скопление насекомых на иве | Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 60-407* | <i>D. pseudoobscura</i> | Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| UCDFST 61-177* | <i>D. pseudoobscura</i> | Калифорния, США | «phaseolosporus» |
| «ВОДНАЯ» | | | |
| UCDFST 71-45 | Болото | Луизиана, США | «водная» |
| CBS 6076 | Болото | Луизиана, США | «водная» |
| CBS 6169 | Болото | Луизиана, США | «водная» |
| CBS 6171 | Болото | Луизиана, США | «водная» |
| CBS 6172 | Болото | Луизиана, США | «водная» |

Продолжение табл. 3.

| | | | |
|--------------------------|--|---------------------------|-------------------|
| UCDFST 71-47* | <i>Spartina</i> sp. | США | «водная» |
| UCDFST 71-52* | <i>Spartina</i> sp. | США | «водная» |
| «pseudovanudenii» | | | |
| UWO(PS) 79-127 | <i>Prunus virginiana</i> | Онтарио, Канада | «pseudovanudenii» |
| UWO(PS) 79-168 | <i>Prunus virginiana</i> | Онтарио, Канада | «pseudovanudenii» |
| UWO(PS) 80-12 | <i>Prunus virginiana</i> | Онтарио, Канада | «pseudovanudenii» |
| UWO(PS) 80-49 | <i>Prunus virginiana</i> | Онтарио, Канада | «pseudovanudenii» |
| UWO(PS) 82-210 | <i>Drosophila</i> sp. | Онтарио, Канада | «pseudovanudenii» |
| «ВОСТОЧНАЯ» | | | |
| CBS 9815 | Сокотечение дуба | Дальний Восток, Россия | «восточная» |
| UCDFST 69-8 | Сокотечение дуба | Япония | «восточная» |
| UCDFST 72-212 | Пищевое производство | Тайланд | «восточная» |
| UCDFST 67-376* | Сокотечение <i>Quercus variabilis</i> | Япония | «восточная» |

Таблица 4. Используемые в работе штаммы дрожжей *Kluveromyces marxianus*, *Kluveromyces dobzhanskii*, *Kluveromyces wickerhamii*, *Kluveromyces aestuarii*, *Kluveromyces nonfermentans*, *Kluveromyces siamensis*, *Scheffersomyces stipitis*, *Debaryomyces hansenii*

| Название и номер штамма | Происхождение | | Утилизация лактозы | |
|--|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------|-------|
| | Источник выделения | Место выделения | Асс. | Ферм. |
| 1 | 2 | | 3 | |
| <i>Kluveromyces marxianus</i> | | | | |
| популяция «marxianus» | | | | |
| CBS 712 (T)* | Неизвестно | Неизвестно | + | – |
| NBRC 1777* | Почва | Япония | + | – |
| FIM1* | Спина коровы | Нидерланды | + | – |
| CBS 6556* | Ферментированное кукурузное тесто | Мексика | + | – |
| DMB1* | Гидролизат сахарного тростника | Неизвестно | + | – |
| DMKU3-1042* | Почва | Тайланд | + | – |
| UFS-Y2791* | Сок <i>Agave americana</i> | Южная Африка | + | – |
| популяция «fragilis» | | | | |
| ВКМ Y-126 | Кислое молоко | Россия | + | + |
| ВКМ Y-453 | Мацун | Армения | + | + |
| ВКМ Y-459 | Творог | Елец, Россия | + | + |
| ВКМ Y-460 | Творог | Елец, Россия | + | + |
| ВКМ Y-464 | Варенец | Неизвестно | + | + |
| ВКМ Y-1335 | Молоко | Карачаево-Черкессия, Россия | + | + |
| ВКМ Y-1337 | Простокваша | Пятигорск, Россия | + | + |
| CBS 397 | Йогурт | Нидерланды | + | + |
| B0399* | Творог | Италия | + | + |
| UFV-3* | Молоко | Бразилия | + | + |
| L03* | Молочный продукт | Неизвестно | + | + |
| 100656-19* | Кровь человека | Нидерланды | + | + |
| <i>Kluveromyces dobzhanskii</i> | | | | |
| CBS 2104 (T)* | <i>Drosophila pseudoobscura</i> , | Калифорния, США | + | – |
| <i>Kluveromyces wickerhamii</i> | | | | |
| CBS 2745 (T)* | <i>Drosophila</i> sp. | Калифорния, США | + | – |

Продолжение табл. 4.

| 1 | 2 | | 3 | |
|---|-------------------------|-------------------------|---|---|
| <i>Kluyveromyces aestuarii</i> | | | | |
| CBS 4438 (Т)* | Морская грязь | Флорида, США | + | – |
| <i>Kluyveromyces nonfermentans</i> | | | | |
| CBS 8778 (Т)* | Ил | Залив Сагами, Япония | + | – |
| <i>Kluyveromyces siamensis</i> | | | | |
| CBS 10860 (Т)* | Вода мангрового леса | Тайланд | + | – |
| <i>Scheffersomyces stipitis</i> | | | | |
| CBS 6054 (Т) | Неизвестно | | + | – |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | | | | |
| CBS 767 (Т) | Неизвестно | | + | – |

Асс. – ассимиляция, Ферм. – ферментация

* – штаммы, используемые только в филогенетическом анализе

Примечание. Сокращённые названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пущино, Москва; ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва, Россия; CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды; SM – J.P. Schmidt, Institut National Agronomique, Париж-Гриньон, Франция; NRRL – USDA-ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Пеория, США; UCM – Украинская коллекция микроорганизмов, Институт микробиологии и вирусологии НАН, Киев, Украина; NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation, Токио, Япония; UCDFST – Phaff Yeast Collection, University of California, Дэвис, США; UWO(PS) – Culture collection of the Department of Biology, University of Western Ontario, Лондон, Онтарио, Канада; СЕСТ – Spanish Type Culture Collection, University of Valencia, Валенсия, Испания. Соответствие штаммов различных коллекций: CBS 683=ВКМ Y-868, NRRL Y-1140=CBS 2359, NRRL Y-1118=CBS 6315, CBS 6556=КСТС 17555. FIM1=CBS 4857, CBS 2745=UCDFST 54-210, CBS 4438=NRRL YB-4510, CBS 8778=NRRL Y-27343. Т – типовая культура.

3.2. Микробиологические методы

3.2.1. Культивирование дрожжей

Дрожжи культивировали на полной агаризованной среде YPD (г/л): бакто-агар фирмы “Difco” (США) – 20, глюкоза фирмы “РеаХим” (Россия) – 20, дрожжевой экстракт “Difco” – 10 и пептон “Difco” – 20. Жидкая YPD среда такого же состава, только без добавления бакто-агара. Споруляцию индуцировали на агаризованной голодной среде с 3%-ной мальтозой (г/л): бакто-агар (“Difco”, США) – 20; мальтоза (“Sigma”, США) – 30. На всех средах дрожжи культивировали при 28°C.

3.2.2. Физиологическая характеристика штаммов: ферментация лактозы

Способность ферментировать 2%-ную лактозу (“Serva”) была проверена двумя способами: (1) по выделению углекислого газа в жидкой среде YP в бродильных пробирках с поплавками (трубки Дюрхема) при 37°C в течение 10 дней при ежедневной регистрации (Durham, 1898) и (2) по изменению окраски дрожжей, растущих на рН-индикаторной агаризованной среде с эозин-метиленовым синим (ЕМВ) после 1–2 суток инкубации при 28°C (Scheda, Yarrow, 1968; Наумов, Гудкова, 1979). Состав ферментационной среды YP (г/л): лактоза (“Serva”, Германия) – 20; дрожжевой экстракт (“Difco”) – 10; бакто-пептон (“Difco”) – 20. Состав ЕМВ-среды (г/л): бакто-агар фирмы “Difco” (США) – 20; пептон “Difco” – 3.15; дрожжевой экстракт “Difco” – 2.7; K_2HPO_4 – 1.8, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.9, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.9, лактоза фирмы “Serva” (Германия) – 20; – 30; эозин калия фирмы “Veb Laborchimie Apolda” (Германия) – 0.4; метиленовая синь “Реахим” (Россия) – 0.025 (2%-ный раствор эозина в 50%-ном этаноле, 0.5%-ный водный раствор метиленовой сини и 10%-ный раствор лактозы добавляли перед розливом среды).

Дрожжи, ферментирующие лактозу, подкисляют среду, что снижает рН, и краситель образует темно-фиолетовый комплекс, обычно связанный с зеленоватым металлическим блеском, который является индикатором

ферментации лактозы. Колонии дрожжей, не ферментирующих лактозу, окрашены в светло-розовый цвет.

3.2.3. Определение скорости сбраживания лактозы

Интенсивность сбраживания лактозы определяли в колбах по количеству выделяемого углекислого газа весовым методом. Опыты проводили в двух повторах. В пробирки с 5 мл жидкой YP среды засеивали биомассу дрожжей на кончике микробиологической петли и инкубировали в течение 48 часов при 28°C. Инокулят, содержащий 10^6 клеток на мл вносили в колбы с 100 мл стерильной среды YP, содержащей 2%-ную лактозу. Ферментации проводили при 28°C в течение 72 ч. Через каждые 24 ч колбы взвешивали и определяли количество выделившегося углекислого газа (CO_2) за счет изменения веса колб. В качестве контроля использовали колбы со 100 мл YP среды без инокулята. Определение интенсивности сбраживания 10%-ной лактозы проводили аналогично.

ВЭЖХ анализ

Для Высокоэффективной Жидкостной Хроматографии в пробирки с 5 мл YP среды засеивали биомассу дрожжей на кончике микробиологической петли и инкубировали в течение 48 часов при 28°C. Затем инокулят в концентрации из расчета 10^6 клеток/мл засеивали в колбы с 40 мл стерильной среды YP, содержащей 10%-ную лактозу, галактозу или глюкозу. Через 8, 24, 32, 48, 56 и 72 ч отбирали по 500 мкл каждого образца. Центрифугировали и надосадочную жидкость переносили в стерильные пробирки типа «Эппендорф». Принимая во внимание высокое содержание лактозы, глюкозы и галактозы в YP среде на первых этапах ферментации (8, 24 и 32 ч), образцы разводили в 40 раз с помощью стерильной дистиллированной воды. Остальные образцы разводили в 20 раз. Для анализа скорости накопления спирта в среде отбирали по 200 мкл надосадочной жидкости без разбавления. Анализ проводили на жидкостном хроматографе HPLC-система Waters Alliance E2695 (США) с колонками YMC-Pack Polyamine II, 12 нм, 5 мкм, 250 × 4.6 мм для глюкозы и лактозы и ROA-Organic Acid H+ (8%), LC Column 300

× 7.8 мм для спирта. Полученные результаты обрабатывали и анализировали с помощью программы Microsoft Excel (<https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel>).

3.3. Генетические методы

3.3.1. Получение ауксотрофных мутантов

Ауксотрофные мутации изучаемых штаммов *K. lactis* получали двумя методами: (1) УФ-облучением культуры дрожжей на твёрдой среде YPD (Захаров и др., 1984); (2) отбором *ura*-мутантов на селективной среде 5-FOA (Boeke et al., 1987).

Ауксотрофные мутанты были индуцированы облучением УФ-лучами бактерицидной лампы БУВ-30П с длиной волны 254 нм. Для этого готовили суспензию двухсуточной культуры дрожжей в 2 мл дистиллированной воды (концентрация 10^6 кл/мл). Затем делали серию четырех разведений и по 100 мкл суспензии растирали шпателем на чашки с YPD средой в двух повторах. Использовали различное время экспозиции (20, 30, 40, 60, 120 сек). При облучении крышки с чашек Петри были сняты. Контроль (четвёртое разведение) не облучали. После облучения чашки культивировали при 28°C в течение двух суток.

Для того чтобы подобрать оптимальную дозу облучения, производили подсчёт клеток на счётчике колоний и для каждого разведения и времени экспозиции вычисляли процент выживаемости клеток по формуле: $S = \frac{n \times 100}{2N}$, где n – среднее число колоний, выросших на чашках после облучения; N – среднее число колоний на контрольных чашках.

Отбор мутантов осуществляли на селективной минимальной среде, содержащей (г/л): дрожжевую азотную основу фирмы “Difco” (США) – 6.7, бакто-агар “Difco” – 20, глюкозу “Реахим” (Россия) – 20. Для этого бархатным репликатором перепечатывали колонии с облученных чашек с YPD-средой на минимальную среду и инкубировали при 28°C в течение двух суток. Колонии, несущие ауксотрофную мутацию, не росли на минимальной среде (рис. 6).

Ауксотрофные мутанты отсевали на полную среду YPD и культивировали в течение двух суток при 28°C.

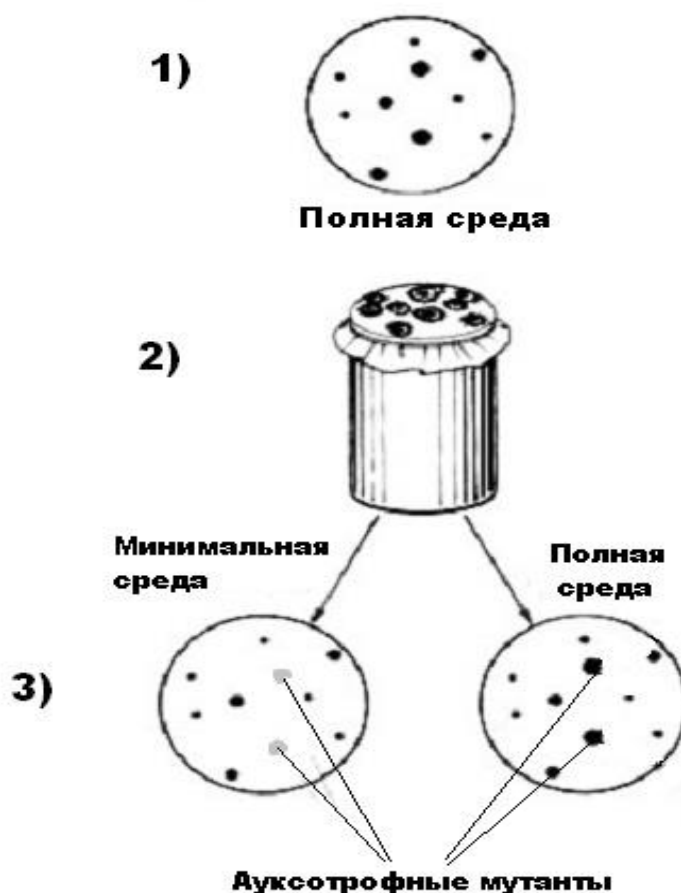


Рис. 6. Отбор мутантов после УФ облучения на селективной минимальной среде. 1) Чашка Петри с колониями дрожжей. 2) Отпечаток колонии на бархат. 3) Отпечатки колоний с бархата на чашки с полной и минимальной средами.

Для идентификации ауксотрофных мутантов использовали схему Холлидея. Для этого готовили минимальные среды с добавками различных аминокислот (лизин, аргинин, метионин, лейцин, гистидин, триптофан и др.) и азотистых оснований (аденин, урацил). С помощью металлического репликатора суспензии клеток ауксотрофных мутантов отпечатывали на минимальные среды, в которые были добавлены определенные аминокислоты или азотистые основания. Рост ауксотрофных мутантов наблюдался только на чашках, содержащих необходимые добавки. В табл. 5 приведены ауксотрофные мутанты для изученных штаммов.

Таблица 5. Полученные ауксотрофные мутанты штаммов *K. lactis*

| Штамм | Ауксотрофность |
|---|---|
| <i>Kluyveromyces lactis var. lactis</i> | |
| ВКМ Y-1333 | <i>met6, trp7, met9</i> |
| ВКМ Y-1339 | <i>met5, met6</i> |
| ВКМ Y-1527 | <i>lys6</i> |
| ВКМ Y-869 | <i>ade9</i> |
| <i>Kluyveromyces lactis var. drosophilarum</i> | |
| CBS 2105 | <i>arg1, arg2, lys1, lys2, trp1, his1, trp2</i> |
| «krassilnikovii» | |
| ВКМ Y-831 | <i>ura</i> |
| CBS 9058 | <i>ura6</i> |
| CBS 2877 | <i>ura2-2</i> |
| «среднеазиатская» | |
| UCM 1891 | <i>ura4-4</i> |
| «phaseolosporus» | |
| ВКМ Y-1296 | <i>his1, his2, lys1, arg1, arg2, trp1</i> |
| UCDFST 61-200 | <i>ura4-4</i> |
| UCDFST 51-272 | <i>ura10-2</i> |
| «водная» | |
| UCDFST 71-45 | <i>ade1, ade4, cys/met5, cys/met12, ura7</i> |
| CBS 6171 | <i>ura2-1</i> |
| «восточная» | |
| CBS 9815 | <i>ura1, his2, met3, lys4, his9, cys/met13, trp12</i> |
| UCDFST 72-212 | <i>trp4, ura7-1</i> |
| UCDFST 69-8 | <i>ura3-4</i> |
| «vanudenii» | |
| ВКМ Y-1535 | <i>lys1, ade1, met4</i> |

Ауксотрофные мутанты по урацилу (*ura*) получали на 5-Fluoroorotic Acid (5-FOA) среде следующего состава (г/л): глюкоза фирмы “РеаХим” (Россия) – 20, дрожжевая азотная основа с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ фирмы “Difco” (США) – 7, урацил – 0.05, 5-FOA фирмы “Duchefa” (Нидерланды) – 1, бакто-агар “Difco” – 20. Данный способ получения и отбора урациловых мутантов основан на конверсии нетоксичных соединений в соединения, токсичные для клеток дикого типа. Мутантные клетки, лишённые способности образовывать токсичное соединение, способны расти в присутствии инертного предшественника. Таким соединением является 5-Фтороротовая кислота (5-

FOA), которая препятствует росту URA^+ клеток, позволяя таким образом отбирать мутантные ura^- клетки.

Предварительно дрожжевую культуру выращивали на полной YPD среде. Затем суспензию клеток (10^7 кл/мл) втирали шпателем на 5-FOA среде и инкубировали в течение 4–7 дней при 30°C . Мутанты ura отсевали на YPD среду, культивировали в течение 2-х суток и тестировали на минимальных средах без урацила и с добавкой урацила.

3.3.2. Гибридологический анализ

3.3.2.1. Получение гибридов

Дрожжи *K. lactis* имеют гаплоидный жизненный цикл с формированием короткой диплоидной фазы на голодной среде с мальтозой. Штаммы *K. lactis* могут быть как гомоталличными, так и гетероталличными. Гетероталлические дрожжи характеризуются двумя типами спаривания a и α , для их скрещивания необходимы штаммы противоположного типа спаривания. Гомоталлические штаммы способны переключать тип спаривания на голодной среде и скрещиваться с дрожжами обоих типов спаривания. На рис. 7 представлена схема получения гибридов.

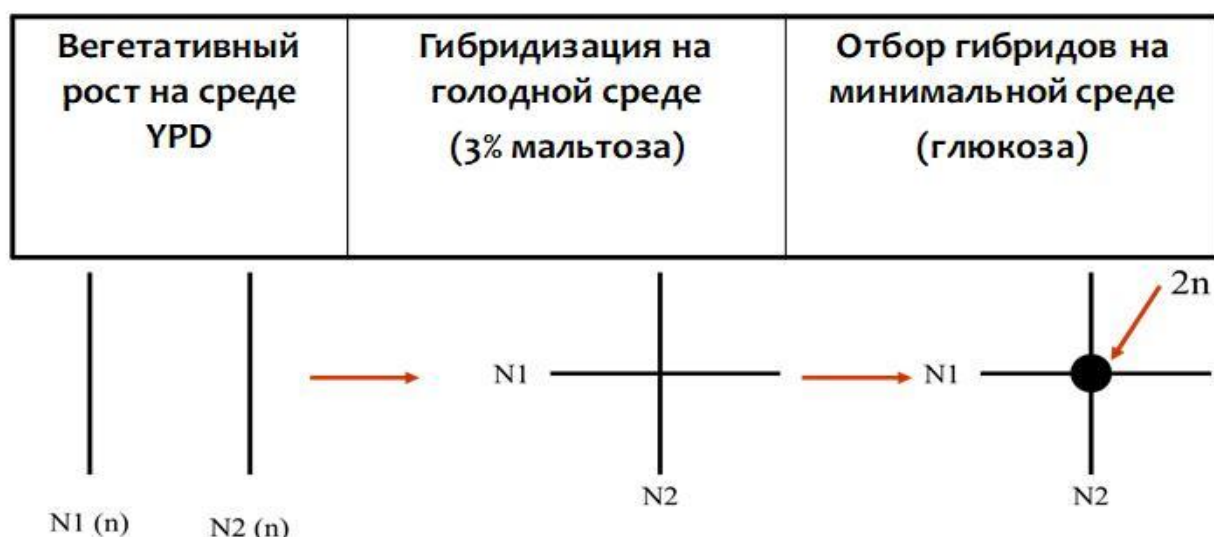


Рис. 7. Схема получения гибридов *K. lactis*



Рис. 8. Колонии гибридов, выросшие на пересечении двух родительских штаммов на селективной минимальной среде

Скращивание штаммов *K. lactis*, маркированных ауксотрофными маркерами проводили на голодной среде. Суточные культуры штаммов с комплементарными ауксотрофными маркерами наносили «крест-накрест» с помощью микробиологической петли с полной среды на голодную среду с мальтозой. Через одни сутки инкубирования дрожжи переносили бархатным репликатором на минимальную среду. Рост прототрофных гибридов наблюдали через 2–3 суток в местах пересечения родительских культур (рис. 8). Выросшие колонии гибридов клонировали на минимальной среде для гарантии освобождения от ауксотрофных родительских культур, затем гибриды пересевали на YPD-среду.

3.3.2.2. Анализ гибридов

Гибриды анализировали тетрадным анализом, основанном на технике микроманипулирования, позволяющей изолировать отдельные аски и разделить все четыре аскоспоры (Захаров и др., 1984).

Спорообразование гибридов индуцировали на мальтозной среде. Изоляцию спор гибридов проводили с помощью микроманипулятора. Оболочки асков разрушали ферментным препаратом из желудка виноградной улитки *Helix pomatia*. Для манипуляции использовали YPD среду, разлитую в чашки Петри тонким слоем, толщиной не более 1.0–1.5 мм. Агаровую пластинку с тетрадами помещали на чашку с YPD средой и культивировали в

течение 2-х суток при 28°C. Через двое суток подсчитывали процент выживших аскоспор. Выжившие сегреганты отсеивали на YPD-среде для дальнейшего рекомбинационного анализа.

Генетическое родство анализируемых дрожжей анализировали по жизнеспособности гибридного потомства (аскоспор) и рекомбинации контрольных родительских маркеров – ауксотрофностей. Подсчитывали три типа тетрад P, N и T, где P – родительский дитип (две споры имеют генотип одного родителя и две – другого), N – неродительский дитип (все споры имеют рекомбинантный генотип) и T – тетратип (генотип всех спор тетрады различен: в каждой такой тетраде содержится по одной споре родительских генотипов и по одной споре рекомбинантных генотипов). При отсутствии сцепления между генами и при значительном расстоянии изучаемых генов от центромера соотношение типов тетрад соответствует расщеплению 1P : 1N : 4T.

При плохой споруляции гибридов применяли случайную выборку спор. Для этого спорующую культуру гибридов предварительно подвергали обработке раствором этилового спирта в концентрации, при которой вегетативные клетки погибают, а более устойчивые споры остаются жизнеспособными (Орлова, 1991). Обработанные спиртовым раствором суспензии спор втирали шпателем по 200 мкл на чашки с YPD средой, затем культивировали в течение двух суток. Выросшие колонии пересеивали штрихами на YPD среду, культивировали 2-е суток и перепечатавали бархатом с полной среды на минимальные среды с соответствующими добавками аминокислот и азотистых оснований. Подсчитывали число прототрофных и ауксотрофных колоний.

3.4. Молекулярные методы

3.4.1. ПЦР-анализ

Дрожжевую ДНК выделяли по протоколу, разработанному Löoke et al. (2011). Петлю дрожжей 2-х суточной культуры суспендировали в 100 мкл 0.2 М растворе ацетат-лития-SDS (200mM LiOAc, 1% SDS). Смесь инкубировали в течение 5 минут при 70°C для лизиса клеток. Затем добавляли 300 мкл 96%

этанолом и встряхивали на вортексе, после чего центрифугировали при 15 000 g в течение 3 минут. Сливали надосадочную жидкость, а осадок промывали 70% этанолом. Осадок, содержащий осаждённую ДНК, растворяли в 100 мкл TE буфера (1 mM трис HCl, pH 7.8, 0.1 mM ЭДТА).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на ДНК-амплификаторе «Bio-Rad» (США). В табл. 6 представлены использованные в работе праймеры. Дизайн олигонуклеотидных праймеров для амплификации и секвенирования генов *LAC4*, *LAC12* и *EF-1 α* осуществляли онлайн на сайте <https://www.yeastgenome.org>.

Для амплификации рибосомных последовательностей 5.8S-ITS, IGS2 и ядерного гена *ACT1* использовали стандартные праймеры (White et al., 1990; Nguyen et al., 2000; Daniel et al., 2001).

ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM каждого дНТФ, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы Taq-полимеразы («Helicon», Россия), 20–200 нг ДНК. Для амплификации различных участков ДНК использовали следующие 4 режима:

- 1) 5.8S-ITS и *ACT1*: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 3 мин, затем 30 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 2 мин, отжиг праймеров при 60°C – 1 мин, синтез ДНК при 72°C – 2.5 мин.
- 2) *EF-1 α* : начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 3 мин, затем 30 циклов в следующем режиме: денатурация при 94°C – 45 с; отжиг праймеров при 52°C – 30 с; синтез ДНК при 72°C – 120 с; конечная достройка при 72°C – 10 мин.
- 3) IGS2: начальная денатурация ДНК при 94°C в течение 3 мин, затем 25 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 1 мин, отжиг праймеров при 48°C – 30 сек, синтез ДНК при 72°C – 1 мин.
- 4) *LAC4*, *LAC12* и *LAC9*: начальная денатурация ДНК 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.

Таблица 6. Праймеры, использованные в работе

| Праймер | Последовательность (5'-3') | Ген или район амплификации |
|---------|--------------------------------|--------------------------------|
| KL1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | <i>ACT1</i> |
| KL5R | GTGAACGATGGATGGACCAGATTCGTCG | <i>ACT1</i> |
| ITS1 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG | 5.8S-ITS |
| ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATTGC | 5.8S-ITS |
| EF2F | GGTAAGGGTTCTTTCAAGTACGCTTGGG | <i>EF-1α</i> |
| EF2R | CGTTCTTGGAGTCACCACAGACGTTACCTC | <i>EF-1α</i> |
| NTS2 | AACGGTGCTTTCTGGTAG | IGS2 |
| ETS1 | TGTCTTCAACTGCTTT | IGS2 |
| MR11 | ATGTCTTGCCTTATTCCTG | <i>LAC4</i> |
| MR12 | CGAAGCTTGTTATGGCAG | <i>LAC4</i> |
| MR13 | CGCGTACTTAGACAGAGC | <i>LAC4</i> |
| MR14 | GATCTCGCTTTTGAATAA | <i>LAC4</i> |
| MR15 | TGTTGAACGAGGAGAATGGGA | <i>LAC4</i> |
| MR16 | TTGTTGGGTAAAATTGAAAGCCT | <i>LAC4</i> |
| MR17 | GCTTATGGTGGTGACTTTAAGGA | <i>LAC4</i> |
| MR18 | GGTTCTTCAATCACTTTCTGGA | <i>LAC4</i> |
| AC19 | CGGTCTAGAATGGCTTTAAACAGATTCTGC | <i>LAC12</i> |
| LC95 | ATGGCAGATCATTCGAGC | <i>LAC12</i> |
| LC91 | GCTCGAATGATCTGCCAT | <i>LAC9</i> |
| LC92 | GGACTGCACTACATCAGAG | <i>LAC9</i> |
| LC93 | GGACTGCACTACATCAGAG | <i>LAC9</i> |
| LC94 | ATGTCTTGCCTTATTCCTG | <i>LAC9</i> |

Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5× TBE буфере (45 мМ трис, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота; рН 8.0) в течение 1–1.5 часов. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат “1 kb DNA Ladder” (“Thermo Fisher”, США).

3.4.2. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ анализ)

ПДРФ-анализ IGS2 района рДНК осуществляли с помощью эндонуклеазы *AluI* (“Fermentas” Литва) в течение ночи при 37°C (рис. 9). Разделение фрагментов рестрикции проводили в 2.5%-ном агарозном геле при 50 В в 0.5×TBE буфере в течение 2 часов. Гель окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл) в течение 3–4 часов, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных весов использовали препарат 100 bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

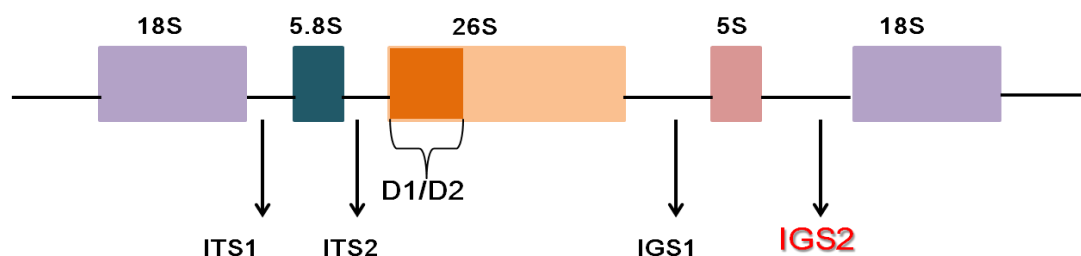


Рис. 9. Организация генного кластера рибосомальной ДНК у дрожжей *Kluyveromyces*.

3.4.3. Секвенирование и филогенетический анализ

Аmplифицированные фрагменты ITS, IGS2, генов *LAC4*, *LAC12*, *LAC9*, *ACT1* и *EF-1α* элюировали из геля при помощи набора Cleanup Mini (“Евроген”, Москва) согласно протоколу фирмы изготовителя.

Для секвенирования генов *LAC4* использовали следующие праймеры (пары праймеров): MR11/MR12, MR13/MR14, MR15/MR16, MR17/MR18; для

генов *LAC12*: AC19/LC95; для регуляторной области *LAC9*: LC91/LC92, LC93/LC94.

Нуклеотидную последовательность ПЦР-продуктов по двум цепям определяли прямым секвенированием по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США). Последовательности анализировали, используя программу SeqMan package (“DNA Star Inc.”, США). Поиск сходства с известными нуклеотидными последовательностями соответствующих генов и рибосомальных последовательностей проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank. Множественные выравнивания изученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили, используя программу BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Neighbor-Joining является дистанционным методом, основанном на принципе установления попарных эволюционных дистанций между анализируемыми последовательностями, представленных в виде матрицы дистанций. Эволюционная дистанция между двумя последовательностями измеряется их различиями, числом и качеством нуклеотидных замен или аминокислотных замещений. Сначала строится дерево со звездоподобной топологией (т.е. с отсутствующими кластерами). Затем происходит перебор каждой пары последовательностей и объединение в кластер последовательностей, имеющих наименьшую сумму всех ветвей дерева. Таким образом происходит последовательное объединение данных до тех пор, пока все последовательности не объединятся в некорневое дерево. Корнем для дерева будет являться последовательность, выбранная в качестве внешней группы. Достоверность топологии построенных деревьев определяли с помощью бутстреп-анализа, основанного на методе повторных выборок. Основные этапы проведения бутстреп-анализа включают: создание случайных выборок на основе анализируемой последовательности; анализ филогенетических

деревьев, полученных для каждой случайной выборки (подсчитывается процент деревьев, в которых присутствуют те же внутренние узлы); интерпретация и сравнение результатов для всех случайных выборок; создание консенсусного дерева (Лукашов, 2009). Индексы бутстрепа, определяющие статистическую достоверность выделения групп, определяли для 1000 псевдореплик.

Выравнивание последовательностей генов *LAC12* было осуществлено с использованием программы MUSCLE в редакторе AliView (<https://www.ormbunkar.se/aliview/>) (Edgar, 2004; Larsson, 2014).

3.4.4. Молекулярное кариотипирование

3.4.4.1. Выделение интактной хромосомной ДНК

Дрожжи выращивали в 10 мл жидкой YPD среды на качалке при 28°C в течение 12–16 часов. Суспензию выросших клеток осаждали центрифугированием и осадок промывали в 1 мл раствора ЭДТА/трис (50 мМ ЭДТА, 10 мМ трис, pH 7.5), затем ресуспендировали в 0.2 мл раствора ЭДТА/трис, содержащего 4 мкг/мл энзиматического препарата Novozym 234 (Novo Industri A/S, Дания) и выдерживали на водяной бане при 42°C в течение 10–15 мин. К суспензии добавляли 0.8 мл 1%-ной легкоплавкой агарозы (Bio-Rad, США), охлажденной до 38–42°C, и помещали в специальные формы для образования блоков. Выдерживали на льду в течение 30–60 мин. Агарозные блоки инкубировали в 1–2 мл раствора ЭДТА/трис (0.5 М ЭДТА, 10 мМ трис) при 48°C в течение 8–10 ч. Затем инкубировали в лизисном буфере с протеиназой К (0.5 М ЭДТА, 10 мМ трис, pH 7.5, 1% N-лаурол-саркозин pH 9.5, 2 мг/мл протеиназы К) при 50°C в течение 8–10 ч. Агарозные блоки промывали в растворе ЭДТА/трис (50 мМ ЭДТА, 10 мМ трис, pH 7.5) и хранили при 4°C.

3.4.4.2. Пульс-электрофорез интактной хромосомной ДНК

Разделение хромосомных ДНК проводили в 0.85%-ном агарозном геле с использованием аппарата CHEF-DR III фирмы “Bio-Rad” (USA). В качестве

буфера использовали 0.5 x TBE (45 mM ТрисHCl, pH 8.0, 10 mM ЭДТА, 45 mM борная кислота), охлажденный до 14°C.

Для оптимального разделения хромосомных полос дрожжей использовали 4 различных режима кариотипирования:

1) 150 В, в течение 24 ч при времени переключения полей 150 с; 150 В, в течение 24 ч при времени переключения полей 300 с. Использовали 0.8%-ю агарозу;

2) 150 В, в течение 10 ч при времени переключения полей 40–120 с; 40 В, в течение 24 ч при времени переключения полей 120–360 с; 100 В, в течение 10 ч при времени переключения полей 360–1200 с. Использовали 0.85%-ю агарозу;

3) 65 В, в течение 50 ч при времени переключения полей 1600–2000 с; 70 В, в течение 48 ч при времени переключения полей 800–1600 с; 75 В, в течение 22 ч при времени переключения полей 120–600 с. Использовали 1.2%-ю агарозу.

4) 150 В, в течение 12 ч при времени переключения полей 240 с; 150 В, в течение 12 ч при времени переключения полей 160 с; 150 В, в течение 16 ч при времени переключения полей 90 с; 150 В, в течение 8 ч при времени переключения полей 60 с. Использовали 0.85%-ю агарозу;

Для гибридов *K. lactis* и *K. marxianus* использовали следующий режим кариотипирования: 170 В, в течение 10 ч при времени переключения полей 40–120 сек; 130 В, в течение 28 ч при времени переключения полей 120–360 сек; 100 В, в течение 9 ч при времени переключения полей 360–1200 сек. Использовали 0.8%-ю агарозу.

В качестве кариотипических стандартов использовали коммерческие препараты ДНК штаммов *S. cerevisiae* YNN 295 (=ATCC 20358) и *Wickerhamomyces canadensis* (syn. *Hasenula wingei*) YB-4662-VIA (=ATCC 28162) (“BioRad”, США), имеющих известные размеры и порядок хромосом. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

3.4.4.3. Саузерн-гибридизация

Хромосомную ДНК переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя аппарат Vacuum blotter (“Bio-Rad”, США). Использовали четыре типа растворов: 1) 0.25 М HCl для депуринизации ДНК, 2) 1.5 М NaCl, 0.5 М NaOH для денатурации ДНК, 3) 1 М Tris HCl, 1.5 М NaCl, pH 7.5 для нейтрализации, 4) 20×SSC для переноса ДНК на мембрану. Обработку первыми тремя растворами проводили по 20 мин, а четвертым в течение 1.5 ч.

ДНК фиксировали на мембране путем отжига при 80°C в течение двух часов. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный фрагмент гена *LAC4* штамма *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140. Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием дигоксигенина (dig-II-dUTP) из набора “DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit I” (“Roche”, Германия) по протоколу фирмы-изготовителя.

Гибридизацию проводили в гибридизационном растворе 5×SSC (0.02% SDS, 0.1% N-лаурилсаркозинат натрия (Sigma, США), 1% блокирующий реагент (“Roche”, Германия)) при 68°C в течение 12–16 ч. Детекцию гибридизационных сигналов осуществляли проводили по инструкции фирмы “Roche” (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

ГЛАВА 4. ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS*: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОПУЛЯЦИИ

Согласно принятой в настоящее время классификации аскомицетовых дрожжей, вид *K. lactis* разделен на две разновидности: культурные молочные дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и не сбраживающие лактозу природные штаммы *K. lactis* var. *drosophilarum* (Lachance, 1998, 2011). Последняя разновидность включает в качестве синонимов типовые культуры таксономических видов *K. krassilnikovii* (ВКМ Y-831), *K. vanudenii* (ВКМ Y-1535) и *K. phaseolosporus* (ВКМ Y-1296). С помощью молекулярных и генетических методов было показано, что разновидность *K. lactis* var. *drosophilarum* гетерогенна и включает несколько генетических популяций, таксономический статус которых остается не ясным (Naumov, Naumova, 2002; Naumova et al., 2004; Friedrich et al., 2023).

С целью изучения генетического внутривидового полиморфизма дрожжей *K. lactis*, определения таксономического статуса дивергентных природных популяций и обнаружения молекулярных маркеров для их достоверной дифференциации были использованы различные молекулярные методы (ПДРФ-анализ межгенного спейсера IGS2 рДНК, молекулярное кариотипирование, мультигенный филогенетический анализ) и гибридологический анализ.

4.1. ПДРФ-анализ IGS2 района рДНК

Мы провели ПДРФ-анализ IGS2 последовательности кластера генов рДНК с эндонуклеазой *AluI* для 67 штаммов *K. lactis* различного происхождения (табл. 2, 3). Изученные дрожжи были выделены из различных молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира: Европа (Россия, Украина, Беларусь, Эстония, Великобритания, Франция, Норвегия, Испания, Португалия), Средняя Азия (Туркмения, Таджикистан), США, Канада и ЮАР.

По сходству *AluI*-профилей изученные штаммы были разделены на восемь групп (рис. 10). Идентичные паттерны имели штаммы *var. lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 (рис. 10, дорожки 1–3 и 4). Во вторую группу вошли европейские природные изоляты популяции «krassilnikovii», а также выделенные в Таджикистане штаммы UCM Y-1891 и UCM Y-1892 (рис. 10, дорожки 5–8 и 9, 10 соответственно). Третья группа сформирована штаммами популяции «восточная» (рис. 10, дорожки 11–13). Остальные пять групп образованы штаммами североамериканских популяций: «drosophilorum», «новая», «phaseolosporus», «pseudovanudenii» и «водная» (рис. 10, дорожки 14–16, 17–18, 19–21, 22–26 и 27–31). Название популяций приводится согласно Naumova et al. (2004).

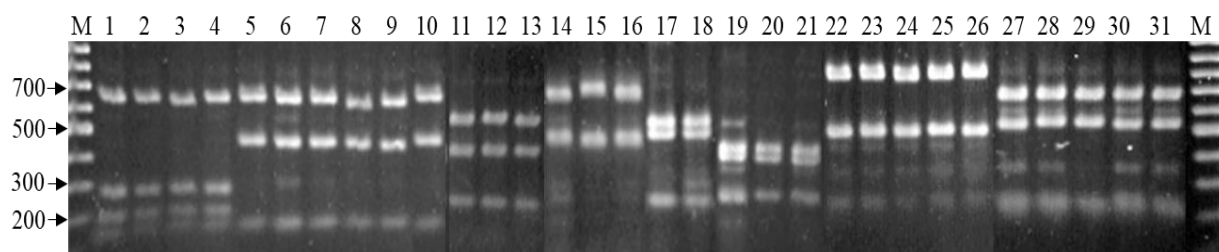


Рис. 10. ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 рДНК штаммов *Kluyveromyces lactis* с помощью эндонуклеазы *AluI*. *K. lactis var. lactis*: 1 – ВКМ Y-868 (Т), 2 – NRRL Y-1140, 3 – ВКПМ Y-3737; «vanudenii»: 4 – ВКМ Y-1535 (Т); «krassilnikovii»: 5 – ВКМ Y-831 (Т), 6 – ВКМ Y-834, 7 – СЕСТ 1122, 8 – CBS 9058; «среднеазиатская»: 9 – UCM Y-1891, 10 – UCM Y-1892; «восточная»: 11 – CBS 9815, 12 – UCDFST 69-8, 13 – UCDFST 72-212; «drosophilorum»: 14 – ВКМ Y-1302 (Т), 15 – UWO(PS) 79-261, 16 – UWO(PS) 82-233; «новая»: 17 – UWO(PS) 80-45, 18 – UWO(PS) 85-256.1; «phaseolosporus»: 19 – ВКМ Y-1296 (Т), 20 – UCDFST 51-272, 21 – UCDFST 61-200; «pseudovanudenii»: 22 – UWO(PS) 79-127, 23 – UWO(PS) 79-168, 24 – UWO(PS) 80-12, 25 – UWO(PS) 80-49, 26 – UWO(PS) 82-210; «водная»: 27 – UCDFST 71-45, 28 – CBS 6076, 29 – CBS 6169, 30 – CBS 6171, 31 – CBS 6172. М – маркер молекулярных весов (п.н.) 100 bp DNA Ladder (“Fermentas”, Литва).

Дальнейшее изучение внутривидового молекулярного полиморфизма дрожжей *K. lactis* проводили с помощью молекулярного кариотипирования и мультигенного филогенетического анализа.

4.2. Установление таксономического статуса природных популяций

K. lactis

4.2.1. Молекулярное кариотипирование

Ранее было показано, что штаммы *K. lactis* var. *lactis*, выделенные из различных молочных продуктов в разных регионах мира, имеют практически идентичные молекулярные кариотипы (Sor, Fukuhara, 1989; Наумова и др., 2005). Сходные кариотипические профили были обнаружены также у природных штаммов популяции «krassilnikovii» (Naumov, Naumova, 2002; Наумова и др., 2005). Показано, что типовые культуры таксономических видов *K. drosophilorum* (ВКМ Y-1302), *K. phaseolosporus* (ВКМ Y-1296) и *K. vanudenii* (ВКМ Y-1535) отличаются по молекулярным кариотипам друг от друга и от *K. lactis* var. *lactis* (Belloch et al., 1998a, 2002; Naumov, Naumova, 2002). Однако использованные авторами условия пульс-электрофореза не позволили добиться хорошего разделения хромосомных полос последних трех таксономических видов. Молекулярные кариотипы остальных природных популяций ранее не изучались.

Для достижения оптимального разделения хромосомных полос изучаемых штаммов *K. lactis* мы использовали четыре различных режима кариотипирования: двухступенчатый, два трехступенчатых (44-часовой и 120-часовой) и четырехступенчатый. Детали каждого из режимов приведены в разделе «Материалы и методы». Размеры хромосом определяли по кариотипическим стандартам *Wickerhamomyces canadensis* YB-4662-VIA и *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295.

На рис. 11(a, б) и 12 представлены молекулярные кариотипы штаммов из различных популяций при использовании, соответственно, трехступенчатого и двухступенчатого режимов. Хромосомная ДНК различных штаммов разделилась на 3–6 электрофоретических полос размером от 950 до 2900 т.п.н.

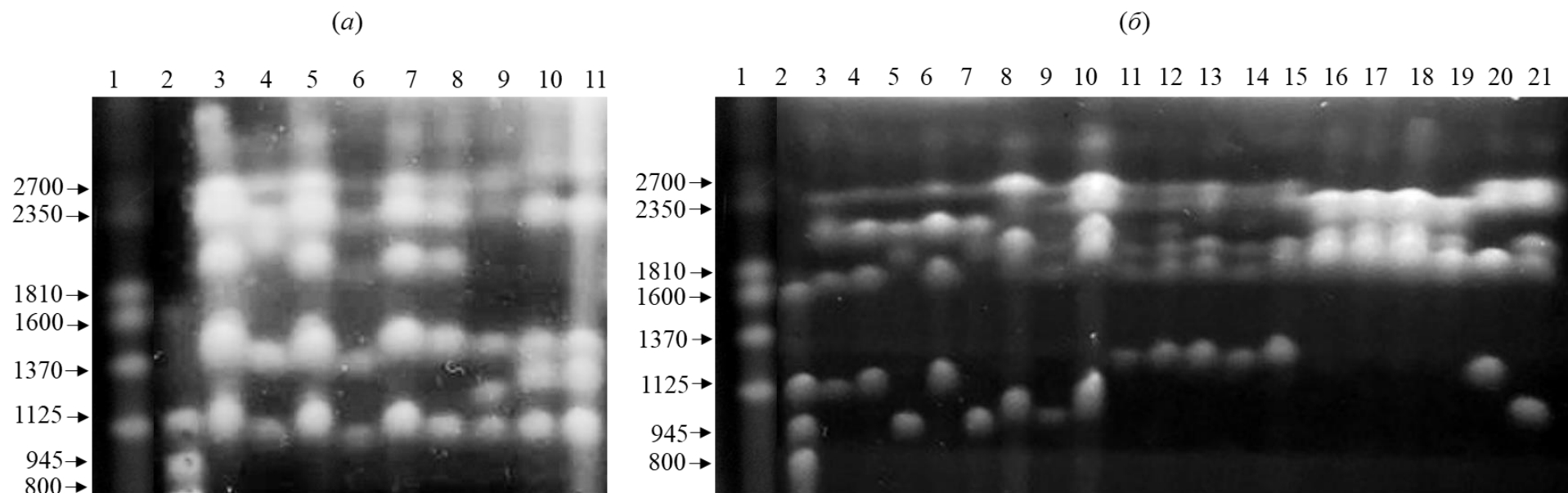


Рис. 11. Молекулярные кариотипы генетических популяций *K. lactis* при использовании трёхступенчатого 44-часового режима пульс-электрофореза.

(а) Дорожки: *K. lactis* var. *lactis*: 3 – ВКМ Y-868, 4 – NRRL Y-1140; 5 – SM 48.7; 6 – ВКПМ Y-3737; «krassilnikovii»: 7 – ВКМ Y-831, 8 – CBS 9058; 9 – «vanudenii» ВКМ Y-1535; «среднеазиатская»: 10 – UCM Y-1891, 11 – UCM Y-1892.

(б) Дорожки: «водная»: 3 – UCDFST 71-45; 4 – CBS 6076; 5 – CBS 6169; 6 – CBS 6171; 7 – CBS 6172; «восточная»: 8 – UCDFST 69-8, 9 – CBS 9815, 10 – UCDFST 72-212; «pseudovanudenii»: 11 – UWO(PS) 79-127, 12 – UWO(PS) 79-168, 13 – UWO(PS) 80-12; 14 – UWO(PS) 80-49; 15 – UWO(PS) 82-210; 16 – «новая» UWO80-45; «drosophilorum»: 17 – ВКМ Y-1302; 18 – UWO(PS) 81-109; 19 – UWO(PS) 79-169; «phaseolosporus»: 20 – ВКМ Y-1296; 21 – UCDFST 51-272. Хромосомные стандарты: 1 – *W. canadensis* YB-4662-VIA; 2 – *S. cerevisiae* YNN 295. Размеры хромосом (т.п.н.) приведены по стандартным штаммам.

Дрожжи *var. lactis* и природные европейские штаммы популяции «krassilnikovii» имеют практически идентичные кариотипы с пятью хромосомными полосами размером от 1000 до 2600 т.п.н. (рис.11а, дорожки 3–8; рис. 12, дорожка 3). Отмечен незначительный полиморфизм размеров второй и третьей (снизу геля) хромосомных полос. Согласно интенсивности свечения окрашенных бромистым этидием электрофоретических полос, третья снизу полоса, по-видимому, содержит две хромосомы.

Хромосомная ДНК типовой культуры *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 и среднеазиатских штаммов UCM Y-1891, UCM Y-1892 также разделилась на пять хромосомных полос (рис. 11а, дорожки 9–11). Для указанных штаммов характерно наличие трех хромосомных полос в диапазоне 1000–1600 т.п.н., вместо двух у штаммов *var. lactis* и популяции «krassilnikovii». Кариотипический профиль *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 характеризуется наличием хромосомной полосы размером ~2700 т.п.н., а в кариотипе среднеазиатских штаммов самая верхняя хромосомная полоса имеет размер ~2900 т.п.н. (рис. 11а, дорожки 9, 10 и 11). С помощью 120-часового режима кариотипирования было установлено, что у штамма ВКМ Y-1535 четвертая снизу полоса содержит две хромосомы.

Наименьший диапазон размеров хромосомных полос характерен для кариотипа дрожжей «drosophilatum», хромосомная ДНК которых разделилась на четыре полосы размером от 1600 до 2200 т.п.н. (рис.11б, дорожки 17–19; рис. 12, дорожки 9,10). Самая верхняя и нижняя полосы, по-видимому, двойные. Такой же кариотипический профиль имеет штамм UWOPS 80-45 из популяции «новая» (рис.11б, дорожка 16; рис. 12, дорожка 11). У дрожжей «phaseolosporus» обнаружен полиморфизм размеров хромосомных полос (рис. 11б, дорожки 20, 21; рис. 12, дорожки 12, 13). Хромосомная ДНК типовой культуры *K. phaseolosporus* ВКМ Y-1296 разделилась на три электрофоретические полосы размером от 1100 до 2500 т.п.н., которые согласно интенсивности свечения, по-видимому, двойные (рис. 11б, дорожка 20; рис. 12, дорожка 12). Идентичный типовой культуре кариотип имеет

штамм «phaseolosporus» UCDFST 61-200. Другой изученный нами штамм UCDFST 51-272 имеет молекулярный кариотип, для которого характерно наличие электрофоретической полосы размером 1000 т.п.н. (рис. 11б, дорожка 21). Согласно интенсивности свечения окрашенных бромистым этидием полос, верхняя и нижняя полосы, по-видимому, двойные. Действительно, с помощью 48-часового режима кариотипирования нам удалось разделить самую верхнюю полосу на две хромосомы размером ~2400 т.п.н. и 2600 т.п.н. (рис. 12, дорожка 13).

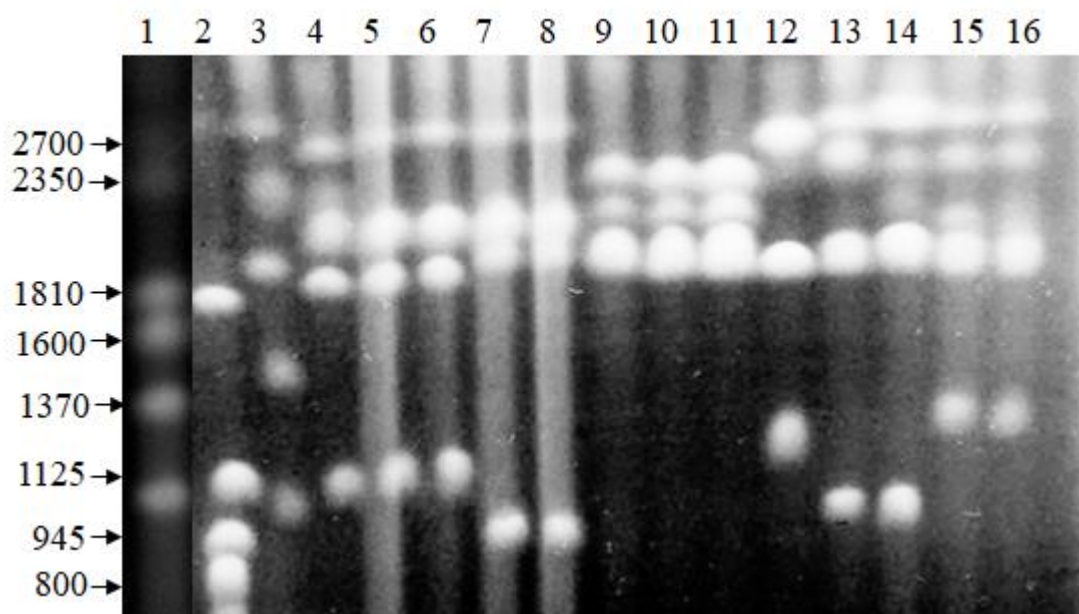


Рис. 12. Молекулярные кариотипы генетических популяций *K. lactis* при использовании двухступенчатого 48-часового режима пульс-электрофореза. Дорожки: 3 – *K. lactis* var. *lactis* ВКПМ Y-3737; «водная»: 4 – UCDFST 71-45; 5 – CBS 6076; 6 – CBS 6171; 7 – CBS 6169; 8 – CBS 6172; «drosophilorum»: 9 – ВКМ Y-1302; 10 – UWO(PS) 81-109; 11 – «новая» UWO80-45; «phaseolosporus»: 12 – ВКМ Y-1296; 13 – UCDFST 51-272; 14 – «восточная» UCDFST 69-8; «pseudovanudenii»: 15 – UWO(PS) 79-168; 16 – UWO(PS) 79-127. Хромосомные стандарты: 1 – *W. canadensis* YB-4662-VIA; 2 – *S. cerevisiae* YNN 295. Размеры хромосом (т.п.н.) приведены по стандартным штаммам.

Характерные кариотипы имеют штаммы популяций «pseudovanudenii», «водная» и «восточная». Изученные штаммы популяции «pseudovanudenii» имеют сходные кариотипические профили: их хромосомная ДНК разделилась на 5–6 полос размером от 1200 до 2600 т.п.н. (рис. 11б, дорожки 11–15; рис. 12, дорожки 15, 16). Штаммы популяции «восточная» также имеют сходные

кариотипические паттерны (от 1100 до 2700 т.п.н.) (рис. 11б, дорожки 8–10; рис. 12, дорожка 14). Два кариотипических профиля выявлено у штаммов популяции «водная». Хромосомная ДНК штаммов UCDFST 71-45, CBS 6076 и CBS 6171 разделилась на четыре электрофоретические полосы размером от 1100 до 2700 т.п.н. (рис. 11б, дорожки 3, 4 и 6; рис. 12, дорожки 4–6). Молекулярный кариотип штаммов CBS 6169 и CBS 6172 характеризуется наличием хромосомной полосы размером 950 т.п.н. (рис. 11б, дорожки 5 и 7; рис. 12, дорожки 7 и 8). По-видимому, первая и третья снизу геля хромосомные полосы двойные.

На рис. 13 приведена схема молекулярных кариотипов дрожжей *K. lactis*, составленная на основании нескольких электрофоретических гелей при использовании четырех различных режимов пульс-электрофореза. Выявлен значительный внутривидовой полиморфизм молекулярных кариотипов дрожжей *K. lactis*. Хромосомная ДНК изученных штаммов разделилась на 3 – 6 электрофоретических полос размером от 950 до 2900 т.п.н. Наименьший диапазон размеров хромосомных полос обнаружен у штаммов популяции «*drosophilum*» (от 1600 до 2200 т.п.н.), а наибольший – у штаммов из Средней Азии (от 1000 до 2900 т.п.н.).

Штаммы популяций «*krassilnikovii*», «среднеазиатская», «*drosophilum*», «новая», «*pseudovanudenii*» и «восточная» гомогенны по молекулярным кариотипам, тогда как полиморфизм размеров хромосомных полос характерен для штаммов популяций «*phaseolosporus*», «водная» и var. *lactis*. Следует отметить одинаковые паттерны штаммов «*drosophilum*» и популяции «новая».

Таким образом, несмотря на значительный полиморфизм индивидуальных размеров электрофоретических полос, все изученные популяции *K. lactis*, по-видимому, имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести. При этом предельные размеры хромосом у штаммов из различных популяций существенно отличаются.

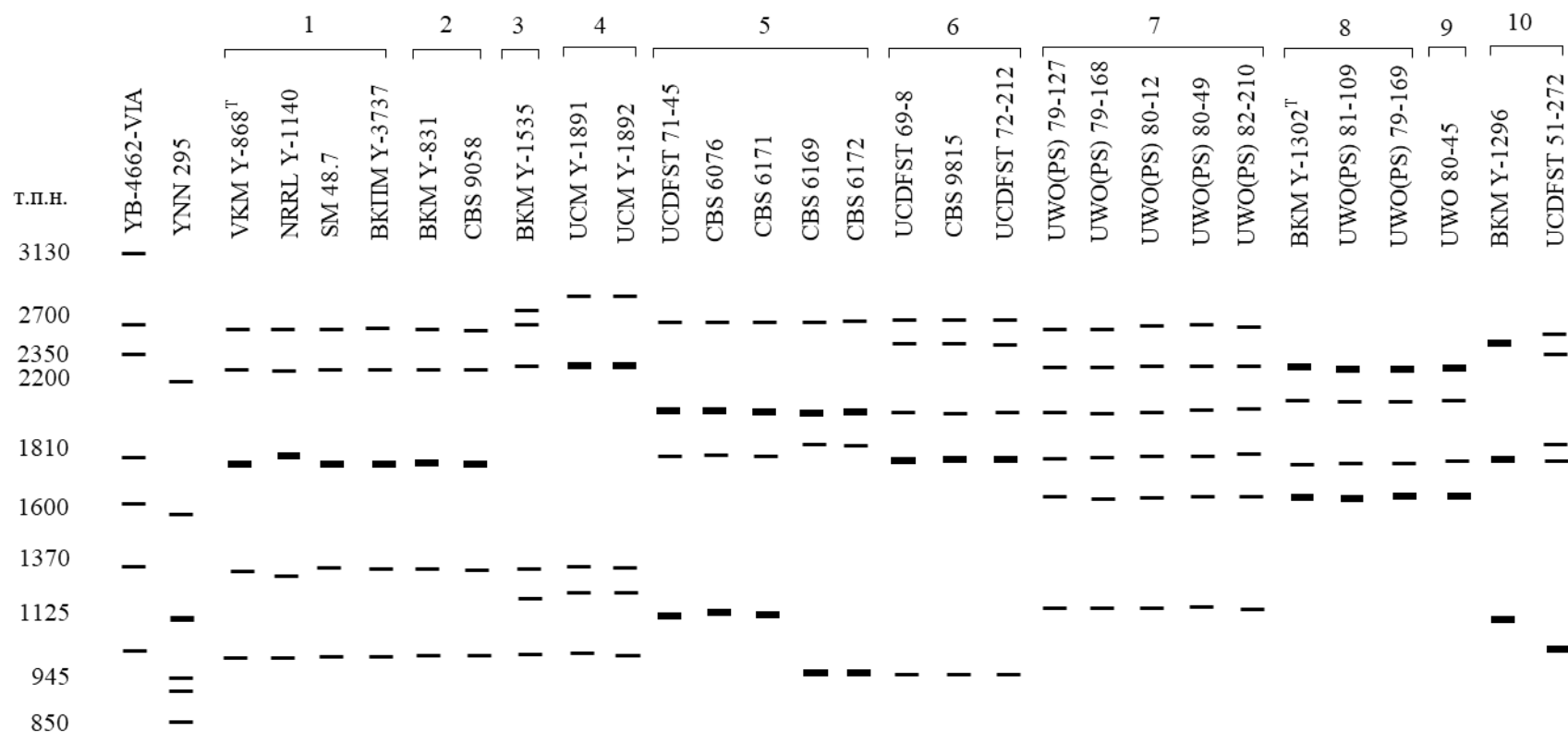


Рис. 13. Суммарная схема молекулярных кариотипов дрожжей. 1 – *K. lactis* var. *lactis*: ВКМ Y-868 (Т), NRRL Y-1140, SM 48.7, ВКПМ Y-3737; 2 – «krassilnikovii»: ВКМ Y-831, CBS 9058; 3 – «vanudenii» ВКМ Y-1535; 4 – «среднеазиатская»: UCM Y-1891, UCM Y-1892; 5 – «водная»: UCDFST 71-45, CBS 6076, CBS 6171; CBS 6169; CBS 6172; 6 – «восточная»: UCDFST 69-8, CBS 9815, UCDFST 72-212; 7 – «pseudovanudenii»: UWO(PS) 79-127, UWO(PS) 79-168, UWO(PS) 80-12; UWO(PS) 80-49; UWO(PS) 82-210; 8 – «drosophilarum»: ВКМ Y-1302 (Т), UWO(PS) 81-109; UWO(PS) 79-169; 9 – «новая» UWO80-45; 10 – «phaseolosporus»: ВКМ Y-1296, UCDFST 51-272. Размеры хромосомных полос (т.п.н.) приводятся по стандартным штаммам *S. cerevisiae* YNN 295 и *W. canadensis* YB-4662-VIA. Использовались 4 режима кариотипирования.

4.2.2. Мультигенный филогенетический анализ

В настоящее время баркодинг, или штрих-кодирование ДНК, широко применяется в систематике грибов, включая дрожжи, для идентификации видов и родов. В качестве универсальных молекулярных маркеров для баркодинга ДНК дрожжей часто используются ITS-область, фактор элонгации трансляции *EF-1 α* и ген *ACT1* (Daniel et al., 2001; Kurtzman, 2003; James et al., 2006; Schoch et al., 2012; Шнырева, Шнырева, 2015).

Для установления филогенетического родства изученных популяций мы провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ITS-района, *EF-1 α* и *ACT1* генов.

Для 18 штаммов, относящихся к различным генетическим популяциям, мы провели секвенирование 5.8S-ITS-фрагмента рДНК: SM 48.7, CBS 1797, ВКПМ Y-3737, NRRL Y-1118, ВКМ Y-869, ВКМ Y-870, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339, ВКМ Y-1343, ВКМ Y-1868 (*K. lactis* var. *lactis*), UWO(PS) 79-168, UWO(PS) 80-49, UWO(PS) 82-210 («*pseudovanudenii*»), CBS 2877 («*krassilnikovii*»), UCM Y-1891, UCM Y-1892 («среднеазиатская»), UCDFST 72-212 («восточная»). Полученные нуклеотидные ITS-последовательности сравнили между собой и с соответствующими последовательностями других штаммов, депонированными в базу данных GenBank. ITS-последовательности 24 штаммов: UWO(PS) 79-169, UCDFST 51-144, UCDFST 52-163, UCDFST 52-190, UCDFST 52-204, UCDFST 81-535.1 («*drosophilorum*»), UWOPS 80-45 («новая»), UCDFST 61-200, UCDFST 50-112, UCDFST 50-152, UCDFST 50-81, UCDFST 51-237, UCDFST 57-107, UCDFST 60-407, UCDFST 61-177 («*phaseolosporus*»), UWOPS 79-127, UWOPS 80-12 («*pseudovanudenii*»), UCDFST 71-45, CBS 6171, UCDFST 71-47, UCDFST 71-52 («водная»), UCD 69-8, CBS 9815, UCDFST 67-376 («восточная») – взяты из публикаций (Naumova et al., 2004; Friedrich et al., 2023).

Изученные штаммы var. *lactis* имеют идентичные ITS-последовательности или отличаются 0–6 нуклеотидами. Наибольшее количество замен имел штамм var. *lactis* ВКМ Y-870, выделенный из чала в

Туркмении. У всех североамериканских и восточных Lac⁻ штаммов имеется характерная транзиция нуклеотидов Т→С в 69 позиции (согласно нумерации последовательности типовой культуры *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868) (рис. 14). Европейские штаммы популяции «krassilnikovii», среднеазиатские изоляты (UCM Y-1891, UCM Y-1892) и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 имеют идентичные ITS-последовательности. Не отличаются по нуклеотидным последовательностям также штаммы популяций «drosophilarum», «новая» и «phaseolosporus».

| | ITS | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
| | 14 | 25 | 28 | 69 | 115 | 117 | 199 | 218 | 419 | 421 | 459 | 540 | 552 | 565 | 608 | |
| 1. ВКМ Y-868 (Т) | A | C | T | T | - | T | T | T | C | T | T | G | A | C | T | T |
| 2. ВКМ Y-1535 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C |
| 3. ВКМ Y-831 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C |
| 4. UCM Y-1891 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C |
| 5. ВКМ Y-1302 (Т) | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C |
| 6. UWO(PS) 80-45 | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C |
| 7. ВКМ Y-1296 (Т) | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C |
| 8. UWO(PS) 80-49 | . | . | . | C | . | . | . | A | . | . | . | . | . | . | . | C |
| 9. UCDFST 71-45 | G | T | C | C | . | . | C | . | T | . | . | . | . | . | G | C |
| 10. CBS 9815 | . | . | . | C | T | A | . | . | . | C | . | A | T | G | . | C |

Рис. 14. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 5.8-ITS-района рДНК различных популяций *K. lactis*: 1 – var. *lactis*; 2 – «vanudenii»; 3 – «krassilnikovii»; 4 – «среднеазиатская»; 5 – «drosophilarum»; 6 – «новая»; 7 – «phaseolosporus»; 8 – «pseudovanudenii»; 9 – «водная», 10 – «восточная». Выделены уникальные для каждой популяции нуклеотидные замены. Т – типовая культура.

Последовательности «pseudovanudenii», «восточная» и «водная» являются наиболее дивергентными. Штаммы «pseudovanudenii» характеризуются одной трансверсией Т→А в 199 позиции, а популяции «восточная» и «водная» имеют по шесть уникальных нуклеотидных замен (рис. 14).

У 43 штаммов *K. lactis*, относящихся к различным генетическим популяциям, было проведено секвенирование генов *ACT1* и *EF-1α*. Штаммы, чьи нуклеотидные последовательности определены в данной работе,

помечены жирным шрифтом на рис. 17. Остальные последовательности взяты из работы Friedrich et al. (2023) и базы данных GenBank. Нуклеотидные последовательности гена *EF-1 α* сравнили между собой и с соответствующими последовательностями других штаммов *K. lactis* (рис. 15).

| | <i>EF-1α</i> | | | | | | |
|-------------------|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 139 | 184 | 346 | 427 | 428 | 616 | 661 |
| 1. ВКМ Y-868 (Т) | С | С | С | Т | Т | Т | Т |
| 2. ВКМ Y-1535 | . | . | . | . | . | . | . |
| 3. ВКМ Y-831 | . | . | . | . | . | . | С |
| 4. UCM Y-1891 | . | . | . | . | . | . | С |
| 5. ВКМ Y-1302 (Т) | . | . | . | . | . | . | С |
| 6. UWO(PS) 80-45 | . | . | . | . | . | . | С |
| 7. CBS 1296 (Т) | Т | Т | . | . | . | . | С |
| 8. UWO(PS) 80-49 | . | . | . | . | . | . | С |
| 9. UCDFST 71-45 | . | . | Т | С | . | С | С |
| 10. CBS 9815 | . | . | . | . | С | . | С |

Рис. 15. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена фактора элонгации *EF-1 α* различных популяций *K. lactis*: 1 – var. *lactis*; 2 – «vanudenii»; 3 – «krassilnikovii»; 4 – «среднеазиатская»; 5 – «drosophilorum»; 6 – «новая»; 7 – «phaseolosporus»; 8 – «pseudovanudenii»; 9 – «водная», 10 – «восточная». Выделены уникальные для каждой популяции нуклеотидные замены. Т – типовая культура.

Внутрипопуляционные различия были незначительны и не более четырех нуклеотидов. Идентичные *EF-1 α* -последовательности имеют сбрасывающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535. У всех европейских, среднеазиатских, североамериканских и восточных *Lac*⁻ штаммов имеется общая транзиция Т→С в 661 позиции (согласно нумерации последовательности типовой культуры ВКМ Y-868), а у штаммов популяции «phaseolosporus» выявлены дополнительные уникальные замены нуклеотидов С→Т в 139 и 184 позициях (рис. 15). Уникальными заменами обладают штаммы популяции «восточная» (транзиция Т→С в 428 позиции) и наиболее дивергентная популяция «водная» (три транзиции С→Т, Т→С и Т→С в 346, 427, 616 позициях соответственно).

Нуклеотидные последовательности гена *ACT1* оказались более вариабельными (до 44 замен), что позволило дифференцировать разные популяции дрожжей *K. lactis* (рис. 16).

Штаммы *var. lactis* имеют идентичные *ACT1*-последовательности или отличаются 1–2 нуклеотидными заменами. Типовые культуры *K. lactis var. lactis* ВКМ Y-868 и *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 отличаются одной заменой Т→С в 295 позиции, которая является вариабельной для штаммов *var. lactis*. С другим штаммом *var. lactis* ВКМ Y-870 дрожжи *K. vanudenii* имеют идентичные последовательности гена *ACT1*. Все остальные не утилизирующие лактозу штаммы характеризуются тремя общими транзициями: Т→С (121 и 484 позиции) и А→G (196 позиция). Штаммы популяции «krassilnikovii» и среднеазиатские изоляты UCM Y-1891, UCM Y-1892 имеют идентичные *ACT1*-последовательности с уникальной транзицией G→А в 394 позиции. У штаммов «drosophilorum» и «новая» выявлено пять уникальных однонуклеотидных замен, или SNP (от английского Single Nucleotide Polymorphism). Шесть уникальных замен (четыре транзиции и две трансверсии) обнаружено в *ACT1*-последовательностях типовой культуры *K. phaseolosporus* ВКМ Y-1296 и штаммов UCDFST 51-272, UCDFST 61-200. Транзиции А→G (97 позиция) и Т→С (124 позиция) характерны для штаммов популяции «pseudovanudenii». Наибольшее количество (12 SNP) обнаружено в *ACT1*-последовательностях штаммов популяции «водная» (рис. 16).

На основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-фрагмента, генов *EF-1 α* и *ACT1* было построено филогенетическое древо (рис. 17). В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Комплексный филогенетический анализ разделил изучаемые дрожжи на семь кластеров, имеющих $\geq 96\%$ бутстреп поддержки (рис. 17). В первом кластере с 99%-ной статистической поддержкой объединились сбразивающие лактозу штаммы *var. lactis* и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535.

ACT1

| | 1 | 16 | 37 | 67 | 73 | 97 | 100 | 121 | 124 | 172 | 196 | 226 | 247 | 250 | 259 | 262 | 265 | 283 | 295 | 325 | 328 | 361 | 367 | 370 | 382 |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1. BKM Y-868 (T) | C | C | T | A | C | A | C | T | T | T | A | C | C | G | T | C | C | C | T | C | T | C | T | T | C |
| 2. BKM Y-1535 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . |
| 3. BKM Y-831 | . | . | . | . | . | . | . | C | . | C | G | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . |
| 4. UCM Y-1891 | . | . | . | . | . | . | . | C | . | C | G | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . |
| 5. BKM Y-1302 (T) | . | . | . | G | T | . | . | C | . | . | G | . | . | . | C | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . |
| 6. UWO(PS) 80-45 | . | . | . | G | T | . | . | C | . | . | G | . | . | . | C | . | . | . | C | . | C | . | . | . | . |
| 7. VKM Y-1296 (T) | T | . | A | . | . | . | . | C | . | C | G | . | T | . | . | . | . | . | C | T | A | . | . | . | . |
| 8. UWO(PS) 80-49 | . | . | . | . | . | G | . | C | C | C | G | . | . | . | . | . | . | . | C | . | C | . | . | . | . |
| 9. UCDFST 71-45 | . | . | . | . | . | . | T | C | . | . | G | T | T | A | . | . | . | T | C | T | C | T | C | C | . |
| 10. CBS 9815 | . | T | . | . | . | . | . | C | . | . | G | . | . | . | . | T | T | . | C | T | . | T | . | . | T |
| | 394 | 400 | 424 | 448 | 457 | 484 | 490 | 505 | 507 | 574 | 595 | 607 | 616 | 631 | 661 | 673 | 772 | 832 | 925 | | | | | | |
| 1. BKM Y-868 (T) | G | C | T | G | C | T | C | C | C | T | G | A | C | C | T | A | C | T | T | | | | | | |
| 2. BKM Y-1535 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 3. BKM Y-831 | A | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 4. UCM Y-1891 | A | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 5. BKM Y-1302 (T) | . | . | C | . | . | C | . | . | T | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . |
| 6. UWO(PS) 80-45 | . | . | C | . | . | C | . | . | T | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . |
| 7. VKM Y-1296 (T) | . | T | . | . | . | C | . | T | . | . | . | . | . | . | T | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 8. UWO(PS) 80-49 | . | . | . | . | . | C | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| 9. UCDFST 71-45 | . | . | . | . | . | C | T | T | T | C | A | G | . | . | . | . | T | . | C | . | . | . | . | . | . |
| 10. CBS 9815 | . | . | C | A | T | C | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . |

Рис. 16. Сравнительный анализ последовательностей гена *ACT1* различных популяций *K. lactis*: 1 – var. *lactis*; 2 – «vanudenii»; 3 – «krassilnikovii»; 4 – «среднеазиатская»; 5 – «drosophilorum»; 6 – «новая»; 7 – «phaseolosporus»; 8 – «pseudovanudenii»; 9 – «водная», 10 – «восточная». Выделены уникальные для каждой популяции нуклеотидные замены. Т – типовая культура.

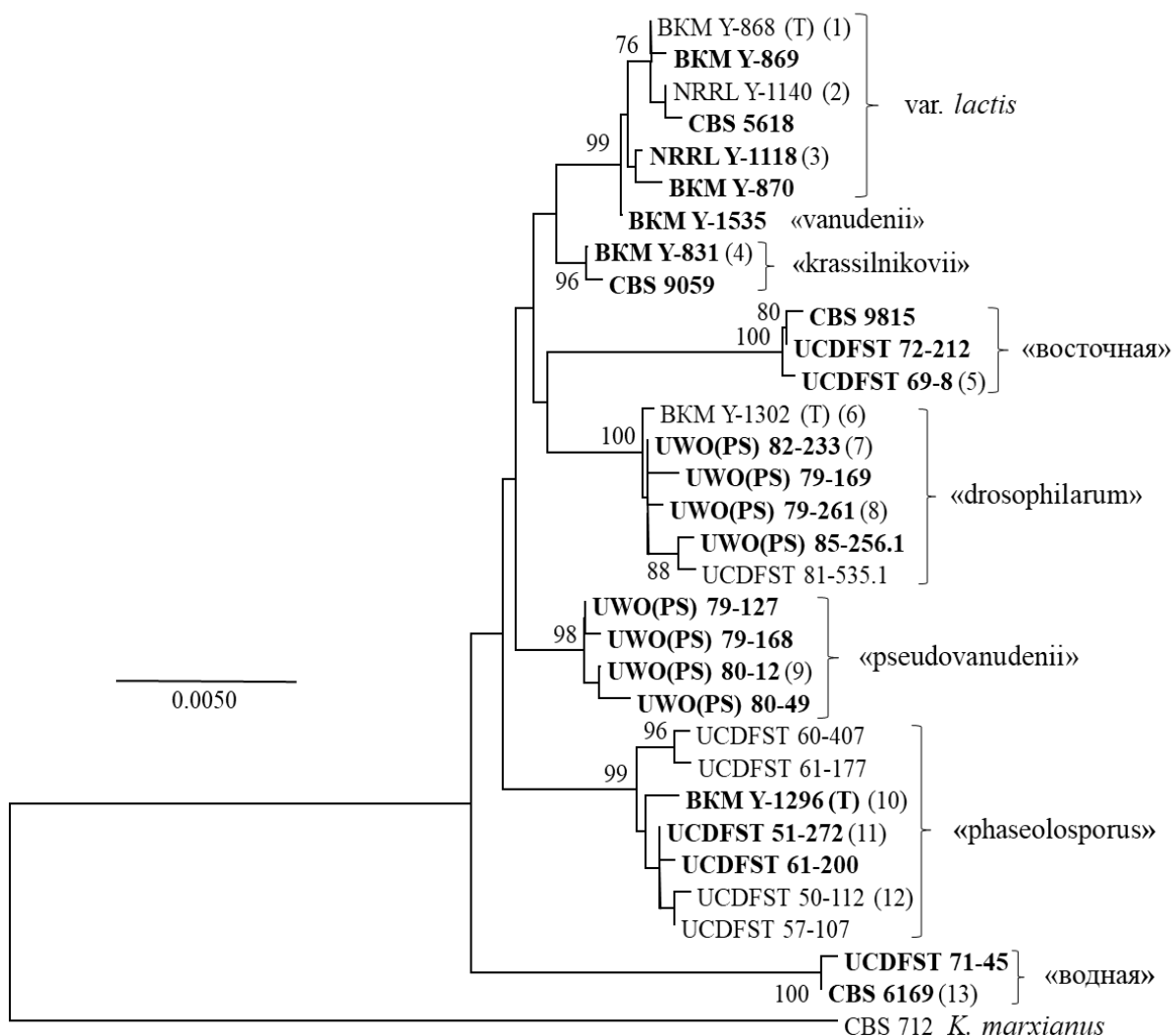


Рис. 17. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей 5.8S-ITS-участка, фактора элонгации *EF-1 α* и гена *ACT1* различных популяций дрожжей *K. lactis*. Приводятся значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 5 нуклеотидным заменам на 1000 нуклеотидных позиций. В качестве внешней группы использовали типовую культуру *K. marxianus* CBS 712. Т – типовая культура. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные нуклеотидные последовательности: **1 – CBS 1797, ВКМ Y-1527, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1343; 2 – SM 48.7, ВКПМ Y-3737, ВКМ Y-1339; 3 – ВКМ Y-1868; 4 – CBS 9058, CBS 2877, CBS 2896, UCM Y-1891, UCM Y-1892; 5 – UCDFST 67-376; 6 – UCDFST 51-144, UCDFST 52-163, UCDFST 52-190, UCDFST 52-204; 7 – UWO(PS) 80-45; 8 – UWO(PS) 81-109; 9 – UWO(PS) 82-210; 10 – UCDFST 50-81; 11 – UCDFST 51-237; 12 – UCDFST 50-152; 13 – CBS 6076, CBS 6171, CBS 6172, UCDFST 71-47, UCDFST 71-52.** Жирным шрифтом выделены последовательности, определённые в настоящей работе.

Второй кластер сформировали среднеазиатские изоляты и европейские штаммы популяции «krassilnikovii», имеющие идентичные ITS, *EF-1 α* и *ACT1* последовательности. Только у штамма CBS 9059 имеется транзигия С→Т в 463 позиции гена *EF-1 α* . По-видимому, среднеазиатские штаммы относятся к популяции «krassilnikovii». Североамериканские штаммы распределились между четырьмя четко обособленными кластерами (98–100% бутстрепа). В первом кластере объединились штаммы «drosophilorum» и «новая». Отдельные кластеры сформировали популяции «phaseoporus», «pseudovanudenii» и «водная» (рис. 17). Последняя популяция является наиболее дивергентной и отличается от всех остальных популяций *K. lactis* по нуклеотидным последовательностям всех трех молекулярных маркеров: шесть замен в ITS-участке, три в гене *EF-1 α* и 12 в гене *ACT1*. Со 100% статистической поддержкой отдельный кластер сформировали штаммы популяции «восточная».

4.2.3. Гибридологический анализ

В опытах по гибридизации использовали высокофертильные моноспоровые культуры гомоталлических штаммов ВКМ Y-1296, ВКМ Y-1302, ВКМ Y-1535, ВКМ Y-1333, CBS 9058, UCDFST 61-200, UCM Y-1891, UCDFST 71-45, CBS 6171, CBS 9815, UCDFST 69-8, UCDFST 72-212, UWO(PS) 79-127 и моноколониальные клоны гетероталлических дрожжей NRRL Y-1118, NRRL Y-1140 и ВКМ Y-1339. Ауксотрофные мутанты получали с помощью УФ-облучения или на селективной 5-FOA-среде (табл. 5). Принимая во внимание гаплонтный жизненный цикл дрожжей *K. lactis*, комплементарные ауксотрофные мутанты были скрещены на голодной мальтозной среде с последующим отбором прототрофных гибридов на минимальной среде. Генетическое родство изученных штаммов определяли по жизнеспособности полового гибридного потомства (аскоспор) и рекомбинации контрольных родительских маркеров ауксотрофности (табл. 7, 8).

Таблица 7. Тетрадный анализ внутри- и межпопуляционных гибридов *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (NRRL Y-1118, NRRL Y-1140, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339), «krassilnikovii» (CBS 9058), «vanudenii» (ВКМ Y-1535), «среднеазиатская» (УСМ Y-1891) и «drosophilarum» (ВКМ Y-1302)

| № гибрида | Гибриды | Число тетрад | Жизнеспособность спор, % | Расщепление* аВ:Ab:AB:ab | Генотипы гибридов |
|---|--|--------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| <i>var. lactis</i> × <i>var. lactis</i> | | | | | |
| H1 | 1118 (<i>lys</i>) × 1333 (<i>met9</i>) | 82 | 91 | 11P : 8N : 39T | <i>MATa lys MET9/LYS met9</i> |
| H2 | 1140 (<i>his</i>) × 1333 (<i>met9</i>) | 82 | 88 | 9P : 6N : 33T | <i>MATa his MET9/HIS met9</i> |
| H3 | 1118 (<i>lys</i>) × 1339 (<i>met5</i>) | 85 | 84 | 9P : 5N : 19T | <i>MATa lys MET5/MATa LYS met5</i> |
| H4 | 1333 (<i>trp7</i>) × 1339 (<i>met5</i>) | 43 | 97 | 10P : 6N : 24T | <i>trp7 MET5/MATa TRP7 met5</i> |
| «krassilnikovii» × <i>var. lactis</i> | | | | | |
| H5 | 9058 (<i>ura6-2</i>) × 1140 (<i>his</i>) | 35 | 93 | 3P : 5N : 18T | <i>ura6-2 HIS/MATa URA6-2 his</i> |
| «среднеазиатская» × <i>var. lactis</i> | | | | | |
| H6 | 1891 (<i>ura</i>) × 1140 (<i>his</i>) | 30 | 76 | 4P : 4N : 9T | <i>ura HIS/MATa URA his</i> |
| «среднеазиатская» × «vanudenii» | | | | | |
| H7 | 1891 (<i>ura</i>) × 1535 (<i>lys</i>) | 25 | 64 | 3 : 14 : 28 : 19 | <i>lys URA/LYS ura</i> |
| «среднеазиатская» × «drosophilarum» | | | | | |
| H8 | 1891 (<i>ura</i>) × 1302 (<i>his1</i>) | 11 | 16 | 2:2:2:1 | <i>ura HIS1/URA his1</i> |

* P, N, T – тетрады родительского, неродительского дитипов и тетратипа соответственно. а, b – ауксотрофности первого (до знака скрещиваемости) и второго родителя соответственно; А, В – прототрофности.

Таблица 8. Тетрадный анализ внутри- и межпопуляционных гибридов *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (NRRL Y-1118, NRRL Y-1140), «*drosophilarum*» (ВКМ Y-1302), «*phaseolosporus*» (ВКМ Y-1296), «водная» (UCDFST 71-45, CBS 6171), «восточная» (CBS 9815, UCDFST 69-8, UCDFST 72-212), «*pseudovanudenii*» (UWO(PS) 79-127)

| № гибрида | Гибриды | Число тетрад | Жизнеспособность спор, % | Расщепление* аВ:Ab:AB:ab | Генотипы гибридов |
|-----------|--|--------------|---|--------------------------|----------------------------------|
| Н8 | 6171 (<i>ura</i>) × 71-45 (<i>ade4</i>) | 46 | «водная» × «водная» 51 | 20 : 22 : 23 : 27 | <i>ura ADE4/URA ade4</i> |
| Н9 | 9815 (<i>cys,met</i>) × 69-8 (<i>ura</i>) | 23 | «восточная» × «восточная» 87 | 1P : 5N : 12T | <i>cys,met URA/CYS,MET ura</i> |
| Н10 | 1296 (<i>lys</i>) × 61-200 (<i>ura</i>) | 24 | « <i>phaseolosporus</i> » × « <i>phaseolosporus</i> » 63 | 2P : 2N : 4T | <i>lys URA/LYS ura</i> |
| Н11 | 71-45 (<i>cys,met</i>) × 1118 (<i>lys</i>) | 24 | «водная» × var. <i>lactis</i> 6 | 0 : 2 : 3 : 0 | <i>cys,met LYS/CYS,MET lys</i> |
| Н12 | 71-45 (<i>ade4</i>) × 1302 (<i>arg1</i>) | 40 | «водная» × « <i>drosophilarum</i> » 2 | 1 : 2 : 0 : 0 | <i>ade4 ARG1/ADE4 arg1</i> |
| Н13 | 71-45 (<i>ade4</i>) × 1302 (<i>lys</i>) | 27 | 5 | 2 : 3 : 0 : 0 | <i>ade4 LYS /ADE4 lys</i> |
| Н14 | 71-45 (<i>cys,met</i>) × 1296 (<i>arg1</i>) | 22 | «водная» × « <i>phaseolosporus</i> » 11 | 0 : 6 : 4 : 0 | <i>cys,met ARG1/CYS,MET arg1</i> |
| Н15 | 71-45 (<i>ade4</i>) × 9815 (<i>his</i>) | 20 | «водная» × «восточная» 15 | 4 : 4 : 4 : 0 | <i>ade4 HIS/ADE4 his</i> |
| Н16 | 71-45 (<i>cys,met</i>) × 79-127 (<i>ura</i>) | 20 | «водная» × « <i>pseudovanudenii</i> » 6 | 0 : 2 : 1 : 2 | <i>cys,met URA/CYS,MET ura</i> |
| Н17 | 79-127 (<i>ura</i>) × 1140 (<i>his</i>) | 18 | « <i>pseudovanudenii</i> » × var. <i>lactis</i> 18 | 5 : 6 : 1 : 1 | <i>ura HIS/URA his</i> |
| Н18 | 79-127 (<i>ura</i>) × 1118 (<i>lys</i>) | 19 | 0 | 0 : 0 : 0 : 0 | <i>ura LYS/URA lys</i> |

Продолжение табл. 8.

| | | | | | |
|-----|--|--------------------------------------|----|----------------|---------------------------|
| | | «pseudovanudenii» × «drosophilarum» | | | |
| H19 | 79-127 (<i>ura</i>) × 1302 (<i>arg1</i>) | 20 | 7 | 0 : 4 : 1 : 1 | <i>ura ARG1/URA arg1</i> |
| H20 | 79-127 (<i>ura</i>) × 1302 (<i>his1</i>) | 20 | 11 | 0 : 2 : 2 : 5 | <i>ura HIS1/URA his1</i> |
| | | «pseudovanudenii» × «phaseolosporus» | | | |
| H21 | 79-127 (<i>ura</i>) × 1296 (<i>arg1</i>) | 22 | 14 | 6 : 5 : 0 : 1 | <i>ura ARG1/URA arg1</i> |
| | | «pseudovanudenii» × «восточная» | | | |
| H22 | 79-127 (<i>ura</i>) × 9815 (<i>his</i>) | 35 | 26 | 15 : 9 : 8 : 5 | <i>ura HIS/URA his</i> |
| | | «восточная» × «drosophilarum» | | | |
| H23 | 9815 (<i>his</i>) × 1302 (<i>arg1</i>) | 20 | 14 | 4 : 3 : 4 : 0 | <i>his ARG1/HIS arg1</i> |
| | | «восточная» × «phaseolosporus» | | | |
| H24 | 9815 (<i>his</i>) × 1296 (<i>trp1</i>) | 20 | 0 | 0 : 0 : 0 : 0 | <i>His TRP1/HIS trp1</i> |
| H25 | 72-212 (<i>ade</i>) × 1296 (<i>arg1</i>) | 44 | 5 | 2 : 2 : 3 : 2 | <i>ade ARG1/ ADE arg1</i> |

* P, N, T – тетрады родительского, неродительского дитипов и тетратипа соответственно. a, b – ауксотрофности первого (до знака скрещиваемости) и второго родителя соответственно; A, B – прототрофности.

Сначала для установления таксономического статуса среднеазиатских штаммов был проведен гибридологический анализ. В опытах по гибридизации использовали следующие штаммы: var. *lactis* (NRRL Y-1118, NRRL Y-1140, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339), «krassilnikovii» (CBS 9058), «vanudenii» (ВКМ Y-1535), «среднеазиатская» (UCM Y-1891) и типовую культуру var. *drosophilarum* ВКМ Y-1302 (популяция «drosophilarum»).

Все гибриды между штаммами var. *lactis* NRRL Y-1140, NRRL Y-1118, ВКМ Y-1333 и ВКМ Y-1339 были высокофертильны, с выживаемостью аскоспор 84–97% и регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров (табл. 7, гибриды № Н1–Н4). Высокую выживаемость аскоспор (93%) также имел гибрид «krassilnikovii» × var. *lactis* (табл. 7, гибрид № Н5). Хотя выживаемость аскоспор гибридов штамма UCM Y-1891 с var. *lactis* NRRL Y-1140 и *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 была несколько ниже (76 и 64% соответственно), также наблюдалась регулярная мейотическая сегрегация контрольных ауксотрофных маркеров (табл. 7, гибриды № Н6 и Н7). Напротив, гибрид UCM Y-1891 × ВКМ Y-1302 «drosophilarum» имел низкую выживаемость аскоспор: 16% (табл. 7, гибрид № Н8). Ранее показано, что ВКМ Y-1302 «drosophilarum» образует со штаммами var. *lactis*, «krassilnikovii» и *K. vanudenii* полустерильные гибриды, имеющие, как правило, аномальную мейотическую сегрегацию контрольных маркеров (Naumov, Naumova, 2002).

Штаммы var. *lactis*, «krassilnikovii», среднеазиатские изоляты и типовая культура *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 образуют фертильные гибриды (64–96% выживаемости аскоспор) с регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров.

Таким образом, гибридологическим анализом установлено близкое генетическое родство среднеазиатских штаммов с группой var. *lactis*/«krassilnikovii»/*K. vanudenii*. Принимая во внимание идентичные *AluI*-профили, а также отсутствие различий по молекулярным маркерам 5.8S-ITS, *EF-1α* и *ACT1* среднеазиатские штаммы, по-видимому, относятся к популяции

«krassilnikovii». Штамм *K. vanudenii* ВКМ У-1535 давал высокофертильные гибриды со штаммами *K. lactis* var. *lactis* (71–85%), и эти штаммы продемонстрировали наибольшее генетическое родство по результатам филогенетического анализа. Недавно проведенный геномный анализ дрожжей *K. lactis* также подтвердил близкое генетическое родство *K. vanudenii* и var. *lactis* (Friedrich et al., 2023).

Для установления таксономического статуса североамериканских популяций и популяции «восточная» были проведены внутри- и межпопуляционные скрещивания (табл. 8). Выживаемость аскоспор внутрипопуляционных гибридов «водная», «phaseolosporus» и «восточная» составила 51, 63 и 87% соответственно (табл. 8, гибриды № Н8, Н10 и Н9). Межпопуляционные гибриды «водная» × var. *lactis*, «водная» × «drosophilum», «водная» × «phaseolosporus», «водная» × «pseudovanudenii» и «водная» × «восточная» были стерильны или низкофертильны: 0–18% выживаемость аскоспор. Как правило, двойные рекомбинанты (ab) отсутствовали, за исключением гибрида Н16 «водная» × «pseudovanudenii» (табл. 8). Межпопуляционные гибриды североамериканских популяций «drosophilum», «phaseolosporus» и «pseudovanudenii» (табл. 8, Н19, Н20, Н21) также имели низкую выживаемость аскоспор: 7–24%. Гибриды «pseudovanudenii» × var. *lactis* были стерильными или полустерильными: выживаемость аскоспор 0–18% (гибриды № Н17 и Н18). Ранее показано, что гибриды var. *lactis* с «drosophilum», «phaseolosporus» и «восточная» имели низкую выживаемость аскоспор: 10–45, 0–8 и 13% (Naumov, Naumova, 2002). Наибольший процент выживаемости аскоспор (26%) зарегистрирован для гибрида «pseudovanudenii» × «восточная» (табл. 8, гибрид № Н22). Гибриды «восточная» × «drosophilum» и «восточная» × «phaseolosporus» низкофертильны: 14% и 0–5% (табл. 8, гибрид № Н23 и Н24, Н25).

На рис. 18 суммированы результаты гибридологического анализа популяций дрожжей *K. lactis*, полученные в данной работе, и ранее опубликованные данные. По выживаемости гибридных аскоспор изученные

популяции разделились на две группы. Штаммы *var. lactis* и «krassilnikovii» образуют фертильные гибриды (64–96% выживаемости аскоспор) с регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров.

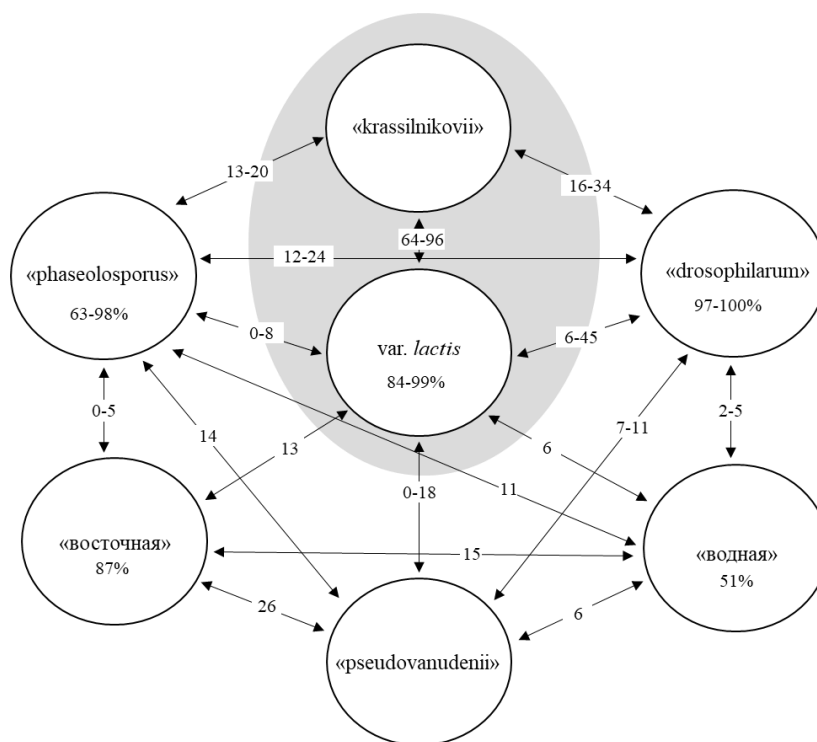


Рис. 18. Суммарные результаты гибридологического анализа генетических популяций дрожжей *K. lactis* (Naumov, Naumova, 2002; настоящее исследование).

Во вторую группу попали штаммы четырех североамериканских популяций («drosophilarum», «phaseolosporus», «pseudovanudenii» и «водная») и популяция «восточная», образующие полустерильные гибриды: 0–26% выживаемости аскоспор (рис. 18). Гибриды между *var. lactis*/«krassilnikovii» и популяциями второй группы были стерильны или имели очень низкую выживаемость аскоспор: 0–45%. При этом, во всех комбинациях наблюдалось нерегулярное мейотическое расщепление ауксотрофных маркеров. Даже в случае сравнительно высокой выживаемости полных тетрад (45%), отмеченной в некоторых комбинациях скрещиваний «drosophilarum» × *var. lactis*, не наблюдалось рекомбинации родительских ауксотрофных маркеров (Naumov, Naumova, 2002). Следует отметить, что все внутривидовые гибриды имели высокую выживаемость аскоспор (51–100%) и

характеризовались нормальной дигенной сегрегацией контрольных маркеров ауксотрофности (рис. 18).

4.3. Обсуждение

С помощью различных молекулярных методов и гибридологического анализа показано сложное строение комплексного вида *K. lactis*, включающего семь генетических популяций: var. *lactis*, «drosophilum», «phaseolosporus», «krassilnikovii», «pseudovanudenii», «водная» и «восточная».

Несмотря на значительный полиморфизм индивидуальных размеров хромосомных полос, дрожжи указанных популяций имеют одинаковое гаплоидное число хромосом, равное шести. Наибольший диапазон размеров хромосомных полос отмечен у штаммов из Средней Азии (от 1000 до 2900 т.п.н.), а наименьший – у штаммов «drosophilum» (от 1600 до 2200 т.п.н.).

Сбраживающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* выделяются в различных регионах мира, тогда как остальные шесть популяций приурочены к определенным регионам мира: Северная Америка, Дальневосточная Азия и Юго-Восточная Азия. Популяция «krassilnikovii» представлена европейскими и среднеазиатскими изолятами.

Установлено, что на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* можно достоверно дифференцировать все семь генетических популяций комплексного вида *K. lactis*.

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ *LAC* ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES*

Локусы *LAC* дрожжей *K. lactis* var. *lactis* включают тесно сцепленные структурные гены *LAC4* (ген β -галактозидазы) и *LAC12* (ген пермеазы лактозы), а также регуляторную последовательность *LAC9*. С помощью полифазного подхода (применения методов пульс-электрофореза, Саузерн-гибридизации и секвенирования) мы провели изучение генов *LAC* у 33 сбраживающих лактозу штаммов *K. lactis* var. *lactis*, выделенных в различных регионах бывшего СССР, Европы, США и Новой Зеландии из молочных продуктов, почвы и клинических источников (мокроты и кишечника) (табл. 2).

5.1. Хромосомный полиморфизм генов *LAC*

Все изученные штаммы активно сбраживали лактозу в пробирках с поплавками уже на первые сутки. Кариотипические профили штаммов приведены на рис. 19а. Размеры отдельных хромосом определяли по кариотипам стандартных штаммов *W. canadensis* YB-4662-VIA и *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 19а, дорожки 1 и 2). Изученные штаммы характеризовались сходными молекулярными кариотипами с шестью хромосомными полосами размером от 1050 до 2600 т.п.н. (рис. 19а). Отмечен некоторый полиморфизм размеров хромосом II и III.

С помощью Саузерн-гибридизации с зондом *LAC4* определена хромосомная локализация генов *LAC*. Локус *LAC1* выявлен у семи штаммов, *LAC2* – у 19 штаммов и *LAC3* – у четырёх штаммов (рис. 19б). У штаммов UCM Y-328 и ВКПМ Y-492 (молочные продукты, Украина) обнаружены полимерные локусы *LAC1* и *LAC2* (рис. 19б, дорожки 20 и 29). Штамм ВКМ Y-1868 (чал, Туркмения) имеет полимерные гены *LAC1* и *LAC3* (рис. 20б, дорожка 11). Не обнаружено корреляции между происхождением штаммов и наличием определённых локусов *LAC* (табл. 2). Например, клинические изоляты CBS 5618 и CBS 8043, выделенные, соответственно, из мокроты в

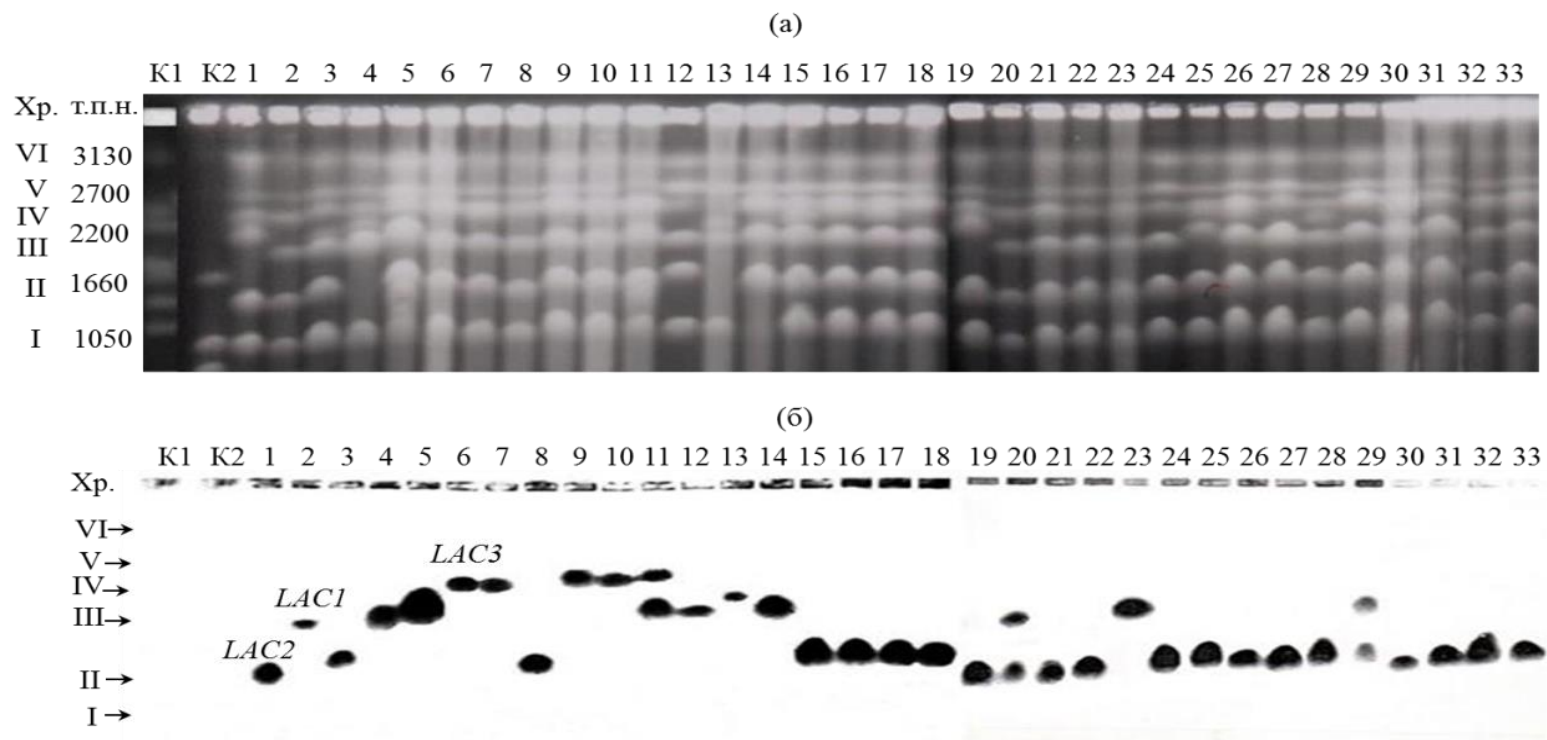


Рис. 19. Пульс-электрофорез хромосомных ДНК дрожжей *K. lactis* var. *lactis* (а) и Саузерн-гибридизация с зондом *LAC4* (б). Дорожки: K1 – *W. canadensis* (хромосомный стандарт); K2 – *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); *K. lactis* var. *lactis*: 1 – NRRL Y-1140; 2 – NRRL Y-1118; 3 – ВКМ Y-868; 4 – ВКМ Y-869; 5 – ВКМ Y-870, 6 – ВКМ Y-1186; 7 – ВКМ Y-1333; 8 – CBS 762; 9 – ВКМ Y-1339; 10 – ВКМ Y-1343; 11 – ВКМ Y-1868; 12 – ВКМ Y-762; 13 – ВКМ Y-896; 14 – ВКМ Y-1527; 15 – SM 3.8; 16 – SM 5.8; 17 – SM 6.7; 18 – SM 16.9; 19 – SM 48.7; 20 – UCM Y-328; 21 – CBS 845; 22 – CBS 1065; 23 – CBS 1067; 24 – CBS 1797; 25 – CBS 2360; 26 – CBS 2619; 27 – CBS 5618; 28 – CBS 8043; 29 – ВКПМ Y-492; 30 – ВКПМ Y-3737; 31 – Н1; 32 – Н2; 33 – Н3. Размеры хромосом (т.п.н.) приведены по кариотипическим стандартам *S. cerevisiae* YNN 235 и *W. canadensis* YB-4662-VIA. Хр. – хромосома.

Норвегии и кишечника ребенка в Новой Зеландии, обладают локусом *LAC2* (табл. 2). Напротив, клинический изолят ВКМ Y-1527 (мокрота, Испания) имеет локус *LAC1*. Независимо от источника выделения (молочные продукты, почва или клинические изоляты), большинство изученных штаммов обладали локусом *LAC2* (табл. 2).

5.2. Нуклеотидный полиморфизм генов *LAC4* и *LAC12*

Мы провели секвенирование генов *LAC4* и *LAC12* различной хромосомной локализации у 11 штаммов *K. lactis* var. *lactis*: локус *LAC1* (штаммы NRRL Y-1118, ВКМ Y-869, ВКМ Y-870 и ВКМ Y-1527), локус *LAC2* (штаммы ВКМ Y-868, ВКПМ Y-3737 и SM 48.7) и локус *LAC3* (штаммы ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339 и ВКМ Y-1343) (табл. 2). Анализируемые штаммы выделены из молочных продуктов, почвы и в условиях госпиталя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с соответствующими последовательностями штаммов *K. lactis* var. *lactis*, депонированными в базе данных GenBank: штаммы NRRL Y-1140, F61, GG799, CBS 845, CBS 1797 (локус *LAC2*) и CBS 1067 (*LAC1*).

Последовательности генов *LAC4* у штаммов, обладающих локусом *LAC1*, были идентичны или отличались 1–2 нуклеотидами. У штаммов с локусом *LAC2* обнаружено от нуля до трёх нуклеотидных замен в последовательностях генов *LAC4*. Все четыре изученных нами штамма с локусом *LAC3* имели идентичные β-галактозидазные последовательности. Различия между генами *LAC4* локусов *LAC1*, *LAC2* и *LAC3* составили 1–5 нуклеотидов. Анализ спектра нуклеотидных замен показал, что наиболее часто встречаются транзиции типа С-Т, большинство из которых расположены в третьем положении кодона и являются молчащими, не вызывая изменений в аминокислотной последовательности кодируемого белка. Мы также провели секвенирование гена *LAC4* у молочного штамма *K. marxianus* CBS 397, выделенного из йогурта в Нидерландах. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *LAC4* дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* CBS 397 выявил их большое сходство: всего 1–3 нуклеотидные замены.

В базе данных GenBank имеются нуклеотидные последовательности геномов типовых культур видов *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. wickerhamii*, а также десять штаммов вида *K. marxianus*, выделенных из молочных продуктов и различных природных источников (табл. 4). Нуклеотидные последовательности β -галактозидазных генов штаммов *K. marxianus* молочного происхождения (B0399, UFV-3 и L03) и клинического изолята 100656-19, выделенного из крови человека, были идентичны и не отличались от соответствующей последовательности штамма CBS 397.

С другой стороны, нуклеотидные последовательности природных штаммов *K. marxianus* разделились. Выделяется группа штаммов, уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена β -галактозидазы которых составляет от 99.54 до 100% (0–3 замены). Тогда как южноафриканский штамм *K. marxianus* UFS-Y2791, выделенный из сока *Agave americana*, имеет существенно отличающуюся последовательность. Сходство его последовательности с последовательностями остальных природных штаммов составляет 89.95–90.05% (около 300 замен).

Последовательности генов *LAC4* молочных и природных штаммов *K. marxianus* отличались более, чем 60 нуклеотидными заменами. В целом, нуклеотидные последовательности β -галактозидазных генов дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* сходны на 89.90–99.97%, тогда как уровень их сходства с генами *LAC4* типовых культур *K. wickerhamii* CBS 2745, *K. aestuarii* CBS 4438 и *K. nonfermentans* CBS 8778 не превышал 70%.

Нуклеотидные последовательности гена пермеазы лактозы *LAC12* оказались более вариабельными. В целом, между анализируемыми штаммами *K. lactis* var. *lactis* насчитывается до 15 нуклеотидных замен. Большинство замен представлены трансверсиями нуклеотидов T→A, G→T или G→C в первом или втором положении кодона. В локусе *LAC1* имеется две характерные замены – транзиция T→C и трансверсия G→T (485 и 953 позиции согласно нумерации последовательности типового штамма ВКМ Y-868). Все

штаммы с локусом *LAC3* отличаются трансверсией G→С и молчащей транзицией С→Т в 1408 и 1530 позициях соответственно.

Штаммы *K. lactis* var. *lactis*, обладающие локусом *LAC1*, имеют идентичные последовательности гена *LAC12* или отличаются 1–4 нуклеотидами. Идентичные *LAC12* последовательности обнаружены у всех изученных штаммов с локусом *LAC3*. Наиболее вариабельными оказались гены *LAC12* у штаммов, обладающих локусом *LAC2*: 0–14 нуклеотидных замен. *LAC12* последовательности типовой культуры ВКМ Y-868 и штаммов NRRL Y-1140, CBS 845, CBS 1797, GG799 идентичны или отличались 1–3 нуклеотидами. Нуклеотидные последовательности генов *LAC12* молочного штамма SM 48.7 и почвенного изолята ВКПМ Y-3737 были идентичны и отличались 11–14 заменами от последовательностей остальных штаммов, обладающий локусом *LAC2*. Различия между *LAC12* последовательностями разных локусов составили: 6–15 замен между локусами *LAC2* и *LAC3*, 9–12 нуклеотидные замены между локусами *LAC2* и *LAC1* и 8–10 замен между *LAC1* и *LAC3*.

Мы сравнили нуклеотидные последовательности генов *LAC12* штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*. Молочные штаммы *K. marxianus* (CBS 397, B0399) и клинический изолят 100656-19 имеют идентичные последовательности, которые отличаются от *LAC12*-последовательности локуса *LAC3* одной молчащей заменой С→Т (позиция 1530). Различия между нуклеотидными последовательностями генов *LAC12* указанных штаммов *K. marxianus* и штаммов var. *lactis*, обладающих локусами *LAC1* и *LAC2*, составили, соответственно, 7–11 и 5–14 замен. При этом, *LAC12*-последовательности молочных штаммов UFV-3 и L03 отличались пятью нуклеотидными заменами от соответствующей последовательности штамма CBS 397. У природных штаммов *K. marxianus* (CBS 6556, FIM1, DMKU3-1042, DMB1 и NBRC 1777) выявлено от 11 до 16 синонимичных нуклеотидных замен, не влияющих на аминокислотную последовательность белка *LAC12*. Наиболее дивергентной является *LAC12*-последовательность выделенного из

сока *Agave americana* штамма UFS-Y2791: 131–137 замен в сравнении с остальными природными штаммами. В целом, нуклеотидные последовательности генов *LAC12* штаммов *K. marxianus* идентичны на 92%–100%. Гены *LAC12* дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* имеют 91.5–99% сходства, тогда как уровень их сходства с генами *LAC12* типовых культур *K. wickerhamii* CBS 2745, *K. aestuarii* CBS 4438 и *K. nonfermentans* CBS 8778 не превышает 73%.

5.3. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей *LAC4* и *LAC12*

По полученным нуклеотидным последовательностям генов *LAC4* и *LAC12* были определены первичные структуры соответствующих белков, состоящих, соответственно, из 1025 и 587 аминокислотных остатков. В сравнительный анализ были также включены утилизирующие лактозу дрожжи *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 и *Debaryomyces hansenii* CBS 767.

Сначала был проведен сравнительный анализ β -галактозидаз дрожжей *Kluveromyces* (рис. 20). β -галактозидазы дрожжей рода *Kluveromyces* образовали отдельный кластер со 100%-ной статистической поддержкой. Внутри этого кластера выделяются два основных подкластера. Первый представлен аминокислотными последовательностями *LAC4* штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*, которые идентичны на 94.00–100%. Этот подкластер включает две группы штаммов: молочные дрожжи видов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* (99.80–100% сходства) и природные изоляты, β -галактозидазы которых идентичны на 94.25–98.34%. Наиболее дивергентной является β -галактозидаза штамма *K. marxianus* UFS-Y2791. Второй подкластер включает белки *LAC4* видов *K. wickerhamii*, *K. aestuarii* и *K. nonfermentans* (69.60%–79.98% сходства). Сходство β -галактозидаз двух подкластеров составило 63.67–70.37%. Между белками дрожжей *Scheffersomyces* и *Debaryomyces* и дрожжей рода *Kluveromyces* уровень сходства не превышал 45%.

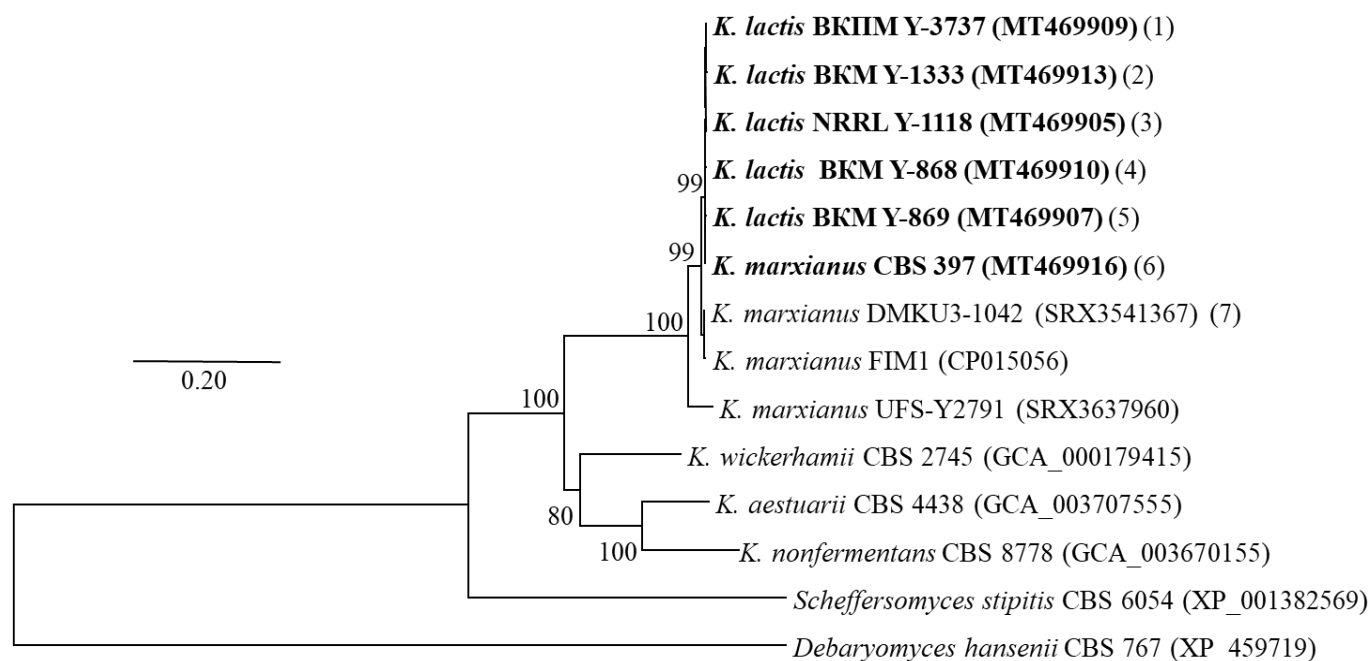


Рис. 20. Филогенетическое дерево сходства аминокислотных последовательностей β -галактозидаз дрожжей рода *Kluveromyces*. В качестве внешней группы использовали β -галактозидазы дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, *Debaromyces hansenii* CBS 767. Приведены значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 20 заменам на 100 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов с идентичными аминокислотными последовательностями: (1) – **SM 48.7 (MT469911)**; (2) – **ВКМ Y-1186 (MT469912), ВКМ Y-1339 (MT469915), ВКМ Y-1343 (MT469914)**; (3) – NRRL Y-1140 (XP_452194.1), **ВКМ Y-1527 (MT469908)**, F61 (KF420203.1), CBS 1797 (ERR2881716), CBS 1067 (ERR2881718); (4) – GG799 (CP021240.1), CBS 845 (ERR2881720); (5) – **ВКМ Y-870 (MT469906)**; (6) – B0399 (CM004407.1), 100656-19 (CABJCSX010000079.1), UFV-3(SRX3637959), L03 (SRX3541362); (7) – DMB1 (BBIL00000000.1) NBRC 1777 (AP014601.1), CBS 6556 (KQ039400.1). После номера штамма приведены регистрационные номера последовательностей в GenBank. Жирным шрифтом выделены последовательности, определённые в настоящей работе.

На рис. 21 представлено филогенетическое дерево сходства аминокислотных последовательностей LAC12. Пермеазы дрожжей *Kluveromyces* образовали отдельный кластер относительно внешней группы (с бутстреп поддержкой 86%). Внутри данного кластера выделяются два подкластера. Первый со 100% статистической поддержкой включает белки LAC12 дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* (97.79–100% сходства) и природные изоляты *K. marxianus*, идентичные на 97.44–100%. Сходство пермеаз двух групп составляет от 94.38 до 95.06%. Наиболее дивергентной является последовательность южноафриканского штамма *K. marxianus* UFS-Y2791. К этому подкластеру примыкает также пермеаза LAC12 дрожжей *K. wickerhamii*.

Пермеазы видов *K. aestuarii* и *K. nonfermentans* сформировали второй подкластер (статистическая поддержка 99%). Белки LAC12 дрожжей *K. wickerhamii*, *K. aestuarii* и *K. nonfermentans* сходны на 76.4–85.39%. Их сходство с пермеазами *K. lactis* и *K. marxianus* составило 66.67–75.27%. Отдельное положение на древе занимают пермеазы дрожжей *Scheffersomyces* и *Debaryomyces*, сходство которых с пермеазами видов *Kluveromyces* было менее 72.3%.

На рис. 22 представлено филогенетическое дерево сходства аминокислотных последовательностей генов LAC4 и LAC12. Сходство молочных штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* по белкам LAC4 и LAC12 составляет 99.10–99.79%. Уровень сходства аминокислотных последовательностей β -галактозидаз и пермеаз природных изолятов *K. marxianus* и молочных дрожжей *K. lactis*/*K. marxianus* значительно ниже: 94.61–98.69%.

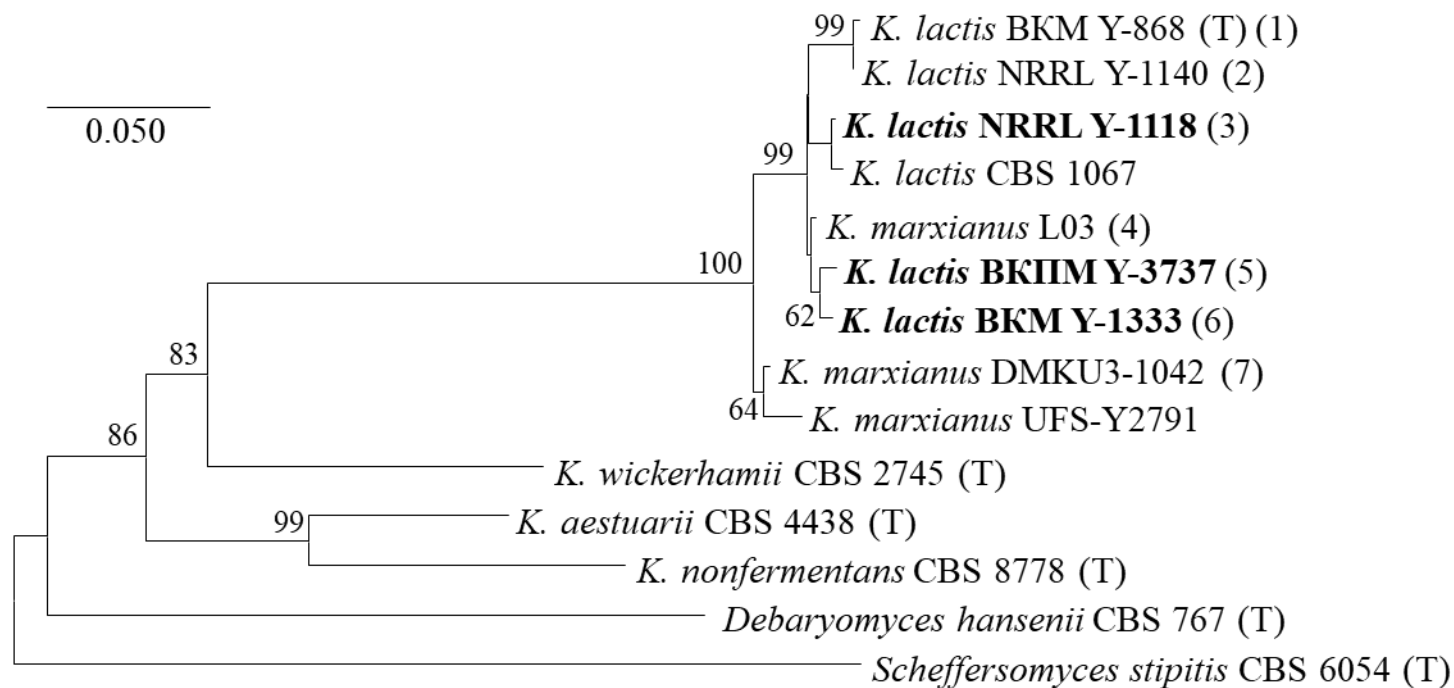


Рис. 21. Филогенетическое дерево сходства аминокислотных последовательностей пермеаз (LAC12) дрожжей рода *Kluyveromyces*. В качестве внешней группы использовали пермеазы дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 и *Debaromyces hansenii* CBS 767. Приведены значения бутстрепа >60%. Шкала соответствует 5 заменам на 100 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов с идентичными аминокислотными последовательностями: (1) – CBS 845, GG799; (2) – CBS 1797; (3) – **ВКМ Y-869, ВКМ Y-870, ВКМ Y-1527**; (4) – UFV-3; (5) – **SM 48.7**; (6) – *K. lactis* **ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1339, ВКМ Y-1343**, *K. marxianus* CBS 397, B0399, 100656-19; (7) – DMB1, NBRC 1777, CBS 6556, FIM1. Жирным шрифтом выделены последовательности, определённые в настоящей работе.

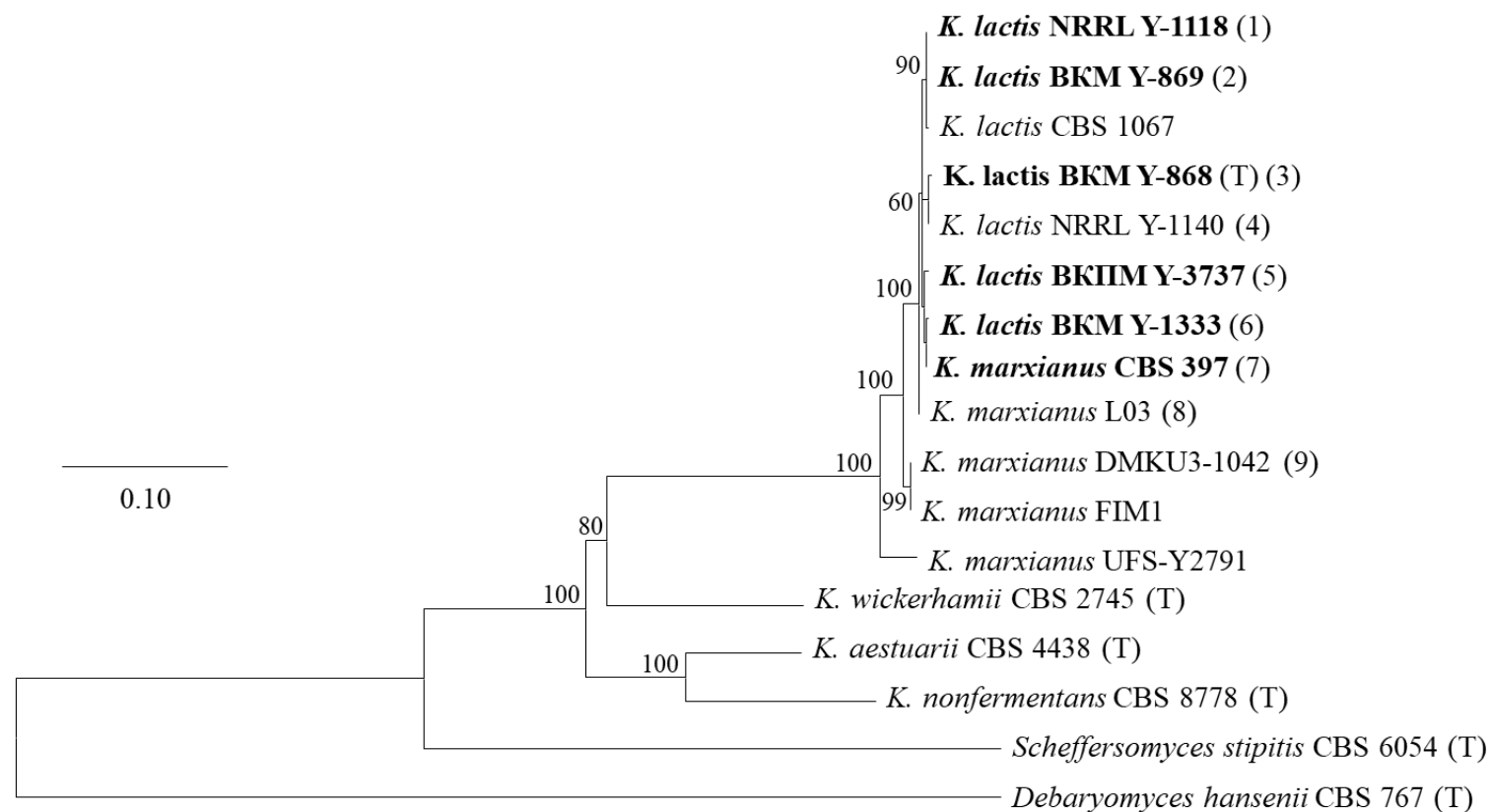


Рис. 22. Филогенетическое дерево сходства аминокислотных последовательностей β -галактозидаз и пермеаз лактозы дрожжей рода *Kluyveromyces*. В качестве внешней группы использовали пермеазы дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 и *Debaryomyces hansenii* CBS 767. Приведены значения бутстрепа >60%. Шкала соответствует 10 заменам на 100 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов с идентичными аминокислотными последовательностями: (1) – **ВКМ Y-1527**; (2) – **ВКМ Y-870**; (3) – CBS 845, GG799; (4) – CBS 1797; (5) – **SM 48.7**; (6) – **ВКМ Y-1186**, **ВКМ Y-1339**, **ВКМ Y-1343**; (7) – B0399, 100656-19; (8) – UFV-3, L03; (9) – DMB1, NBRC 1777, CBS 6556. Жирным шрифтом выделены последовательности, определённые в настоящей работе.

5.4. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *LAC9*

У шести штаммов *K. lactis* var. *lactis*, обладающих различными локусами *LAC* - NRRL Y-1118, ВКМ Y-869 (*LAC1*); ВКПМ Y-3737, SM 48.7 (*LAC2*); ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339 (*LAC3*) – были определены нуклеотидные последовательности гена *LAC9*. Полученные нуклеотидные последовательности длиной 2841 п.н. сравнили между собой и с соответствующими последовательностями штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*, депонированными в базы данных GenBank. Указанные штаммы и их происхождение представлены в табл. 2 и 4.

| | <i>LAC9</i> | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| | 71 | 72 | 230 | 231 | 451 | 519 | 615 | 723 | 1497 | 2394 | 2612 |
| 1. ВКМ Y- 868 (Т) (<i>LAC2</i>) | С | А | Т | Т | С | А | С | С | А | Г | С |
| 2. NRRL Y-1140 (<i>LAC2</i>) | . | . | . | . | . | . | . | Т | . | . | . |
| 3. ВКПМ Y-3737 (<i>LAC2</i>) | Т | . | . | А | . | Г | Т | . | . | . | . |
| 4. NRRL Y-1118 (<i>LAC1</i>) | . | . | . | . | . | Г | Т | . | . | Т | . |
| 5. ВКМ Y-869 (<i>LAC1</i>) | . | . | . | . | . | Г | Т | . | . | . | . |
| 6. ВКМ Y-1333 (<i>LAC3</i>) | . | Т | А | А | . | Г | Т | . | Т | . | Т |
| 7. В0399 | . | . | . | . | Т | Г | Т | . | . | . | . |
| 8. L03 | . | . | . | . | . | Г | Т | . | . | . | . |

Рис. 23. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *LAC9* молочных штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*.

Различия между *LAC9*-последовательностями разных локусов *LAC* составили от двух до восьми нуклеотидных замен. Штаммы, обладающие локусом *LAC3*, имели идентичные последовательности гена *LAC9*, тогда как у штаммов с локусами *LAC1* и *LAC2* наблюдали от одной до четырех замен соответственно.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *LAC9* выявил большое сходство в регуляторной области у молочных штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*: 99.81–100% (0–3 нуклеотидные замены) (рис. 23). *LAC9*-последовательности природных штаммов *K. marxianus* идентичны

на 98.35–100%, тогда как их сходство с группой молочных штаммов *K. lactis*/*K. marxianus* не превышало 95.58%.

5.5. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 и ITS участка рДНК

Современная классификация аскомицетовых дрожжей основана на филогенетическом анализе ряда молекулярных маркеров, прежде всего домена D1/D2 гена 26S рРНК и ITS последовательности, включающей ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2. На основании имеющихся в GenBank нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 и ITS-участка дрожжей *Kluuveromyces* было построено филогенетическое древо (рис. 24).

Дрожжи *Kluuveromyces* со 100%-ной достоверностью сформировали отдельный кластер, который, в свою очередь, разделен на два субкластера. Первый включает наземные виды *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* и *K. starmeri*, а второй – морские виды *K. aestuarii*, *K. nonfermentas* и *K. siamensis*. Дрожжи *K. lactis* и *K. marxianus* имеют практически идентичные последовательности домена D1/D2, но достоверно различаются по последовательностям ITS-участка: 23 нуклеотидные замены. Штаммы *K. lactis* var. *lactis* молочного (CBS 683 и NRRL Y-1140) и не молочного (GG799) происхождения имели идентичные D1/D2 и ITS-последовательности. Штаммы *K. marxianus* разделились на две группы, ITS-последовательности которых различались двумя нуклеотидными заменами. Первая группа включает молочные штаммы (CBS 397 и B0399), клинический изолят 100656-19 и штаммы немолочного происхождения (NBRC 1777, CBS 6556, DMKU3-1042, FIM1 и DMB1). Два молочных штамма L03 и UFV-3 составили вторую группу. Деление на группы не связано с географическим происхождением штаммов и источником их выделения.

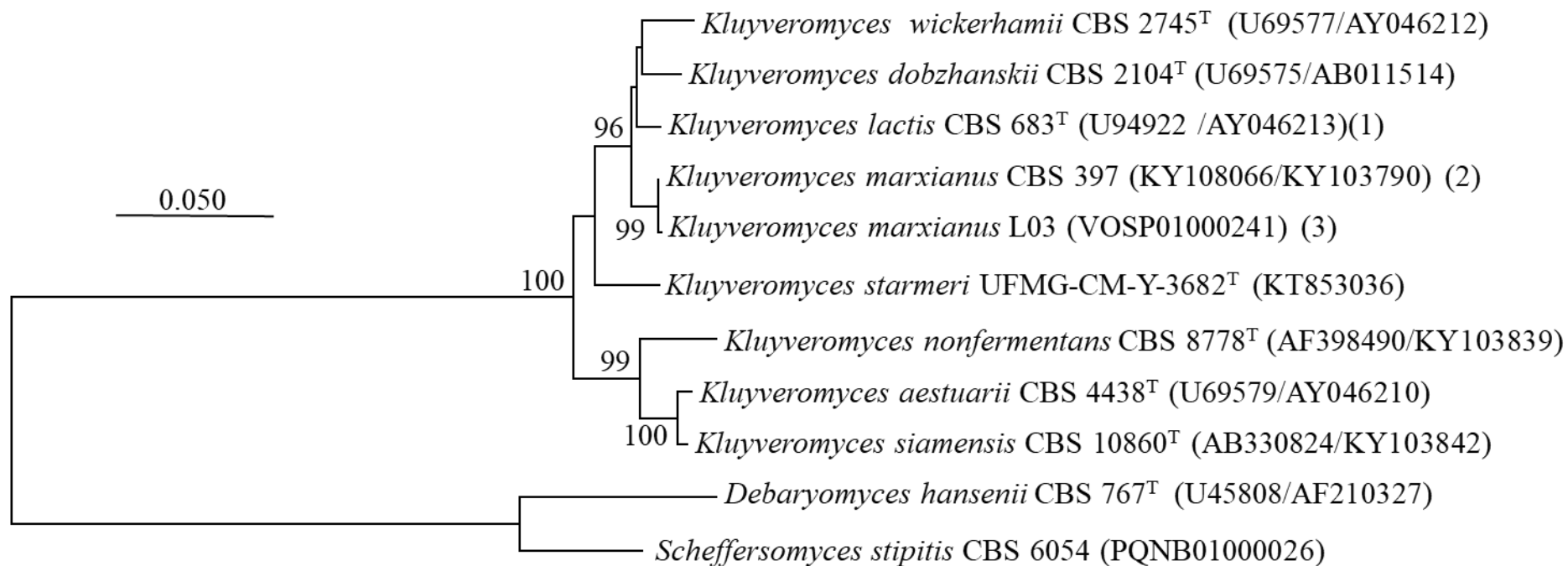


Рис. 24. Филогенетическое дерево сходства нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 гена 26S рРНК и ITS1-5.8S-ITS2 участка дрожжей рода *Kluyveromyces*. В качестве внешней группы использовали соответствующие последовательности дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, *Debaryomyces hansenii* CBS 767 (Т). Приводятся значения бутстрепа >90%. Шкала соответствует 20 нуклеотидным заменам на 1000 позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные последовательности: (1) – NRRL Y-1140 (KY108038/ KY103771), GG799 (KY103771/CP021242); (2) – UFV-3 (CP009307); (3) – B0399 (CM004409), 100656-19 (CABJCX010000020), NBRC 1777 (AB771427/AB771426), CBS 6556 (KY108061/KY103826), DMKU3-1042 (AP012217), FIM1 (KY108083/KY103823), DMB1 (GCA_000747785). После номера штамма приводятся регистрационные номера последовательностей в GenBank. Т – типовая культура.

В целом, топологии деревьев, представленных на рис. 22 и 24, хорошо согласуются. Со 100%-ной достоверностью выделяется кластер, объединяющий виды рода *Kluuveromyces*, который, в свою очередь, разделен на два субкластера, соответствующие наземным и морским видам; при этом молочные дрожжи *K. lactis* и *K. marxianus* являются наиболее близкородственными.

5.6. Обсуждение

На материале штаммов *K. lactis* var. *lactis* различного происхождения впервые проведен молекулярный скрининг генов *LAC* контролирующих ферментацию лактозы. Установлено, что способность ферментировать лактозу у дрожжей *K. lactis* var. *lactis* контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хр. II) и *LAC3* (хр. IV). Выявлено большое сходство нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *LAC4*, *LAC12* и *LAC9* молочных штаммов *K. lactis* и *K. marxianus*, что указывает на общее происхождение их *LAC* локусов. Наиболее вариабельными оказались нуклеотидные последовательности гена пермеазы лактозы *LAC12*. Филогенетические данные хорошо согласуются с результатами комплементационного анализа, с помощью которого было установлено, что молочные, клинические и природные штаммы *K. marxianus* обладают активными генами *LAC4*, но имеют различные типы лактозных пермеаз (Наумов, 2006). На специальной среде с ингибитором дыхания антимицином А было показано, что молочные штаммы («*fragilis*») имеют не зависящую от дыхания активную лактозную пермеазу, тогда как природные изоляты («*marxianus*») характеризуются зависящей от дыхания слабой пермеазной активностью. У неспособных ферментировать лактозу природных штаммов *K. marxianus* обнаружено 13 замен в белке *LAC12* по сравнению с соответствующим белком молочных и госпитальных штаммов, при этом все изученные штаммы *K. marxianus* обладали функциональным геном *LAC4* (Varela et al., 2017).

ГЛАВА 6. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЛОКУСОВ *LAC* МОЛОЧНЫХ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS VAR. LACTIS*

Ранее была проведена генетическая идентификация локусов *LAC1* (NRRL Y-1118) и *LAC2* (NRRL Y-1140), а с помощью комплементационного анализа установлено сцепление генов *LAC4* и *LAC12* в каждом из этих локусов (Наумов, 2008).

С помощью тестов на аллелизм с локусами *LAC1* и *LAC2* мы провели генетическую идентификацию локуса *LAC3*.

6.1. Рекомбинационный анализ полимерных генов *LAC*

Прежде всего, были получены фертильные культуры гомоталличного (ВКМ Y-1333) и гетероталличного (ВКМ Y-1339) штаммов, которые, согласно Саузерн-гибридизации, обладают локусом *LAC3*. С помощью УФ-облучения у этих штаммов были индуцированы ауксотрофные мутации *trp* и *met*. Были получены гибриды между штаммами, обладающими различными локусами *LAC* и маркированные комплементарными ауксотрофными мутациями. Результаты тетрадного анализа полученных гибридов представлен в табл. 9.

Таблица 9. Идентификация локуса *LAC3* у дрожжей *Kluuyveromyces lactis var. lactis* с использованием маркированных штаммов NRRL Y-1118 (*LAC1 lys*), NRRL Y-1140 (*LAC2 his*), ВКМ Y-1333 (*LAC3 met9*) и ВКМ Y-1339 (*LAC3 met5*).

| Гибрид | Происхождение гибридов | Число тетрад с расщеплением Lac ⁺ : Lac ⁻ | | | Генотип |
|--------|------------------------|---|-----|-----|---------------------------------|
| | | 2:2 | 3:1 | 4:0 | |
| H1 | Y-1118×Y-1140 | 9 | 38 | 7 | <i>MATaLAC1lys/MATaLAC2his</i> |
| H2 | Y-1118×Y-1333 | 10 | 34 | 14 | <i>MATaLAC1lys/LAC3met9</i> |
| H3 | Y-1140×Y-1333 | 7 | 31 | 10 | <i>MATaLAC2his/LAC3met9</i> |
| H4 | Y-1118×Y-1339 | 2 | 25 | 6 | <i>MATaLAC1lys/MATaLAC3met5</i> |
| H5 | Y-1333×Y-1339 | 0 | 0 | 40 | <i>LAC3 trp7/MATa LAC3 met5</i> |

Все полученные гибриды имели регулярное мейотическое расщепление ауксотрофных маркеров. При скрещивании штаммов с разными локусами *LAC* (гибриды Н1–Н4) наблюдали дигенное расщепление по способности ферментировать лактозу. У гибрида Н5 (ВКМ Y-1333 × ВКМ Y-1339) не наблюдали сегрегацию по признаку ферментации лактозы: все сегреганты имели локус *LAC3* и были способны сбраживать лактозу (табл. 9).

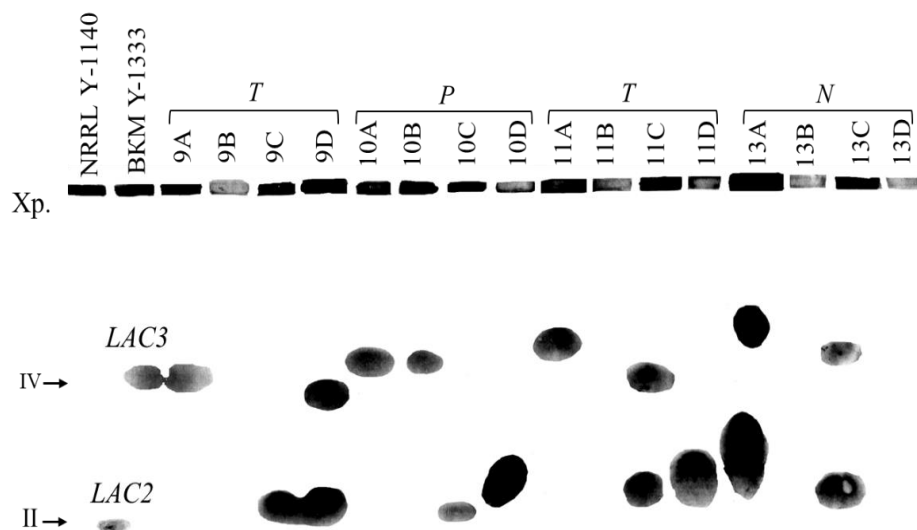


Рис. 25. Саузерн-гибридизация с зондом *LAC4* родительских штаммов NRRL Y-1140 (*LAC2*), ВКМ Y-1333 (*LAC3*) и сегрегантов гибрида. Типы тетрад: *T* – тетратип, *P* – родительский дитип, *N* – неродительский дитип. Хр. – хромосома.

На рис. 25 представлены результаты Саузерн-гибридизации четырех полных тетрад гибрида NRRL Y-1140 (*LAC2*) × ВКМ Y-1333 (*LAC3*) с зондом *LAC4*. У указанного гибрида выявлено три типа тетрад (рис. 25): *P* – родительский дитип (две аскоспоры имеют генотип родительского штамма NRRL Y-1140 (*LAC2*), а две аскоспоры – генотип другого родителя ВКМ Y-1333 (*LAC3*) (тетрада 10); *N* – неродительский дитип (две споры имеют рекомбинантный генотип и объединяют гены как одного родителя NRRL Y-1140 (*LAC2*), так и другого родителя ВКМ Y-1333 (*LAC3*), у двух других аскоспор гены *LAC* отсутствуют) (тетрада 13); *T* – тетратип (генотип всех спор различен – *LAC2*, *LAC3*, *LAC2/LAC3* и *lac2/lac3* (тетрады 9 и 11).

Таким образом, с помощью рекомбинационных тестов на аллелизм и Саузерн-гибридизации у молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* идентифицирован третий полимерный локус *LAC3*, расположенный на хромосоме IV.

6.2. Результаты эксперимента по межвидовой гибридизации *K. marxianus* и *K. lactis* популяция «krassilnikovii»

По-видимому, дрожжи *K. lactis* var. *lactis* приобрели лактозные локусы *LAC* от молочных штаммов вида *K. marxianus*. В пользу этого свидетельствует общий источник выделения (молочные продукты), а также общая система типов спаривания, позволяющая им скрещиваться и образовывать межвидовые гибриды (Наумов, 2005). Усваивающие лактозу штаммы *K. marxianus* встречаются в природных условиях, тогда как природные изоляты *K. lactis*, за редкими исключениями, не только не утилизируют лактозу, но даже не имеют молчащей последовательности генов *LAC* (Naumov et al., 2006; Varela et al., 2019). У штамма *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140 и дрожжей *K. marxianus* генный кластер *LAC4–LAC12* расположен в субтеломерной области хромосом IIR и 3L, соответственно (Fairhead, Dujon, 2006; Varela et al., 2017). У дрожжей *K. marxianus* выявлена дупликация гена *LAC12*, в результате которой образовалось четыре копии, локализованные в субтеломерных районах различных хромосом: хромосомы 8, хромосомы 2 и обоих плеч хромосомы 3. Однако, только расположенный на левом плече третьей хромосомы предковый ген *LAC12* кодирует функциональную пермеазу лактозы, а остальные копии участвуют в транспорте другого дисахарида – целлобиозы (Varela et al., 2019)

Остается неясным, каким образом *K. lactis* var. *lactis* приобрели генный кластер *LAC4–LAC12*, и какие дрожжи выступили в качестве первых реципиентов.

6.2.1. Получение межвидовых гибридов

С помощью точечно-матричного анализа (анг. dot matrix plots) Varela et al. (2019) сравнили субтеломерные области хромосом IIR и 3L у *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140, типовой культуры *K. lactis* var. *drosophilae* CBS 2105

(=ВКМ Y-1302) и трех штаммов *K. marxianus* различного происхождения: L03 (молочный продукт), NBRC 1777 (почва) и UFS Y-2791 (сок *Agave americana*). На основании полученных данных авторы сделали предположение о том, что ассоциированный с насекомыми предшественник молочных дрожжей *K. lactis* var. *drosophilarum* приобрел лактозный кластер *LAC*, обеспечивающий ферментацию лактозы, от адаптированной к молочным продуктам популяции *K. marxianus*.

На наш взгляд, это утверждение является ошибочным. Штамм ВКМ Y-1302 выделен из *Drosophila azteca* в Калифорнии (США). Этот штамм (популяция «*drosophilarum*») образует полустерильные гибриды с молочными дрожжами *K. lactis* var. *lactis*: 6–45% выживаемости аскоспор (рис. 18), а также существенно отличается от них по молекулярному кариотипу (рис. 11а, дорожки 3–6; рис. 11б, дорожки 17–19). В то же время, в Европе обитают не усваивающие лактозу дрожжи популяции «*krassilnikovii*», которые имеют идентичные молекулярные кариотипы с дрожжами *K. lactis* var. *lactis* (рис. 11а, дорожки 7–8) и не изолированы от них генетически: выживаемость гибридных аскоспор 64–96% (рис. 18). Штаммы популяции «*krassilnikovii*» выделяются из различных природных источников (сокотечения дуба, почва, буровая мука), а также из кишечника коровы. Таким образом, наиболее вероятным реципиентом лактозного кластера *LAC4–LAC12* были природные штаммы европейской популяции «*krassilnikovii*», а не североамериканские дрожжи популяции «*drosophilarum*».

Для проверки этого предположения нами были получены межвидовые гибриды между молочным штаммом *K. marxianus* CBS 397 (йогурт, Нидерланды) и *K. lactis* популяции «*krassilnikovii*» CBS 9058 (сокотечение дуба, Воронеж). Гибриды получали массовым скрещиванием гаплоидных клеток на голодной среде с мальтозой. Оба штамма не способны расти на этой среде, так как CBS 397 не ассимилирует мальтозу, а CBS 9058 из-за ауксотрофности по урацилу. Полученные гибриды CBS 397 (*Mal⁻/URA*) × CBS 9058 (*Mal⁺/ura*) были способны расти на минимальной среде с мальтозой.

Гибридные колонии клонировали расеевом на минимальной среде с мальтозой для освобождения от родительских культур, а затем переносили на голодную среду с мальтозой для споруляции. Полученные межвидовые гибриды анализировали с помощью случайной выборки аскоспор, для этого спорулирующую культуру обрабатывали 33%-ным этиловым спиртом. Выросшие колонии переносили бархатным репликатором на минимальные среды с мальтозой и лактозой. Сегреганты, которые росли на минимальных средах с мальтозой и с лактозой, тестировали на способность сбраживать лактозу. Для дальнейшего молекулярного анализа были отобраны девять гибридных сегрегантов, способных расти на мальтозе и активно сбраживать лактозу уже на первые сутки, как и один из родительских штаммов *K. marxianus* CBS 397. Другой родительский штамм CBS 9058, не имеющий генов *LAC*, не сбраживал лактозу. Сегреганты были изучены с помощью пульс-электрофореза и ПДРФ-анализа.

6.2.2. Молекулярные кариотипы межвидовых гибридных сегрегантов *K. marxianus* CBS 397 × *K. lactis* популяция «krassilnikovii» CBS 9058

Дрожжи *K. marxianus* и *K. lactis* популяции «krassilnikovii» существенно различаются по многим молекулярным маркерам, включая молекулярные кариотипы.

Мы провели кариотипический анализ девяти сбраживающих лактозу сегрегантов межвидового гибрида *K. marxianus* CBS 397 × «krassilnikovii» CBS 9058 и родительских штаммов (рис. 26). Родительские штаммы можно легко дифференцировать по молекулярным кариотипам. Штамм *K. marxianus* CBS 397 имеет хромосомный профиль из восьми полос, размером около 950–1900 т.п.н. (рис. 26, дорожки 3 и 14). Согласно интенсивности свечения окрашенных бромистым этидием электрофоретических полос, некоторые из этих полос являются двойными и содержат по две хромосомы.

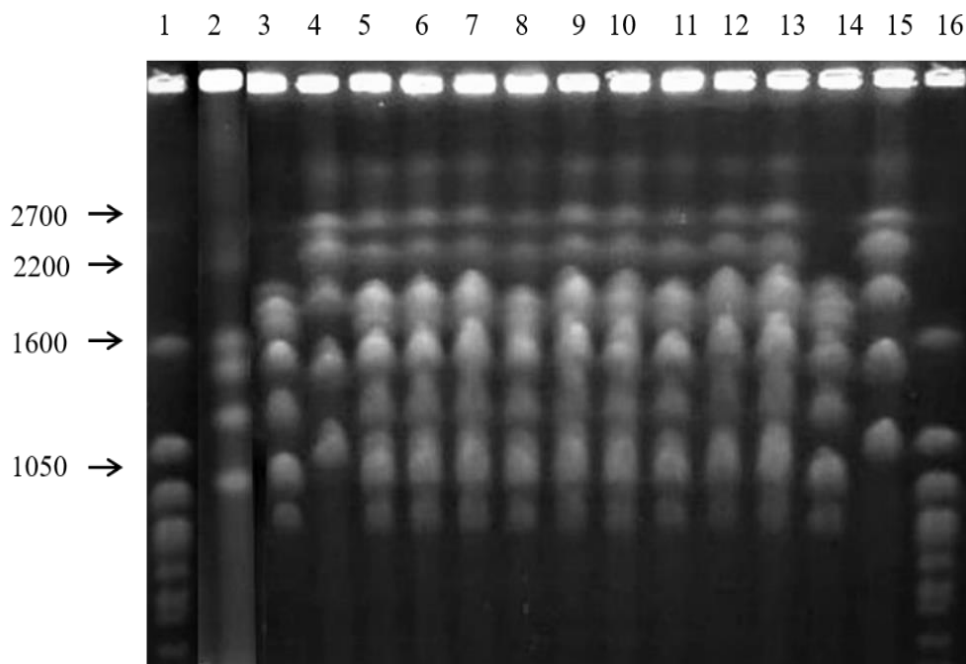


Рис. 26. Молекулярные кариотипы межвидовых гибридов между штаммом CBS 9058 *K. lactis* популяции «krassilnikovii» и молочным штаммом CBS 397 *K. marxianus*. 1, 16 – *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); 2 – *W. canadensis* YB-4662-VIA (хромосомный стандарт); 3,14 – *K. marxianus* CBS 397; 4,15 – *K. lactis* «krassilnikovii» CBS 9058; 5 – 13 – сегреганты гибрида CBS 9058 × CBS 397. Размеры приводятся по кариотипическим стандартам *S. cerevisiae* YNN 295 и *W. canadensis* YB-4662-VIA.

Дрожжи *K. lactis* популяции «krassilnikovii» обладают кариотипическим профилем из пяти хромосомных полос размером от 1000 до 2600 т.п.н. (рис. 26, дорожки 4 и 15). Хромосомная ДНК изученных сегрегантов разделилась на девять электрофоретических полос (рис. 26, дорожки 5–13). В кариотипических профилях девяти сегрегантов объединены хромосомные полосы обоих родителей, включая характерные для «krassilnikovii» полосы размером более 2000 т.п.н.

6.2.3. ПДРФ-анализ амплифицированных IGS2 фрагментов рДНК

Как было показано ранее, дрожжи *K. marxianus* и *K. lactis* можно дифференцировать с помощью ПДРФ-анализа IGS2-района рДНК с использованием рестриктазы *AluI* (Nguyen et. al., 2000).

Мы провели амплификацию межгенного спейсера IGS2 рДНК у всех сегрегантов межвидового гибрида *K. marxianus* CBS 397 × *K. lactis* популяции

«krassilnikovii» CBS 9058 и родительских штаммов. Полученные ПЦР-продукты подвергли рестрикционному анализу с эндонуклеазой *AluI*. Паттерн *K. marxianus* CBS 397 включает три *AluI*-фрагмента размером около 550, 400 и 300 п.н. (рис. 27, дорожки 1 и 12). Рестрикционный профиль штамма «krassilnikovii» CBS 9058 характеризуется наличием трех *AluI*-фрагментов размером около 650, 450 и 100 п.н. (рис. 27, дорожки 2 и 13). ПДРФ-профили девяти изученных сегрегантов разделились на две группы. Шесть сегрегантов обладали паттерном «krassilnikovii»: три фрагмента размерами 650, 450 и 100 п.н. (рис. 27, дорожки 3–8). Остальные три сегреганта имели гибридный *AluI*-профиль, в котором объединились фрагменты, характерные для *K. marxianus* (550, 400 и 300 п.н.) и «krassilnikovii» (650, 450 и 100 п.н.) (рис. 27, дорожки 9–11).

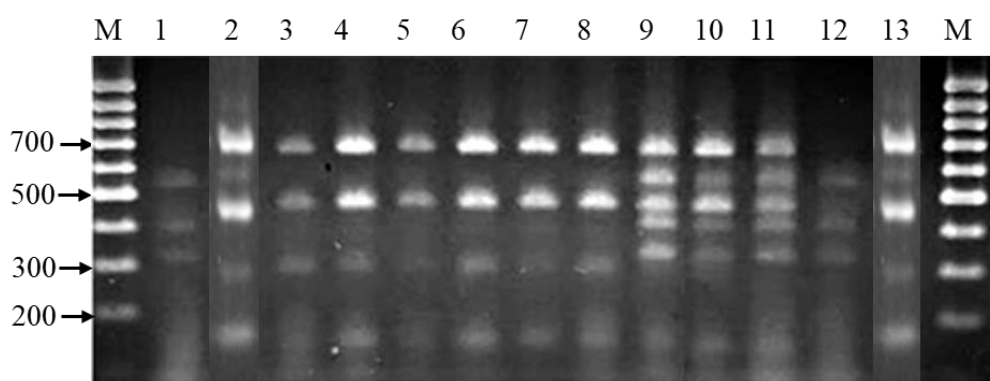


Рис. 27. ПДРФ-анализ амплифицированных фрагментов межгенного спейсера IGS2 рДНК сегрегантов гибрида *K. marxianus* CBS 397 × CBS 9058 *K. lactis* «krassilnikovii» с помощью эндонуклеазы *AluI*. 1,12 – *K. marxianus* CBS 397; 2,13 – «krassilnikovii»; 3–11 – сегреганты гибрида CBS 397 × CBS 9058. М – маркер молекулярных весов (п.н.) препарат 100 bp DNA Ladder («Fermentans», Литва).

С помощью ПДРФ-анализа и Саузерн-гибридизации с зондом *LAC12* мы также изучили 12 сегрегантов гибрида Н5 *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140 (*LAC2*, *URA his*) и «krassilnikovii» CBS 9058 (*ura HIS*) (табл. 7, гибрид № Н5). Гибрид Н5 имел высокую выживаемость аскоспор (93%) и характеризовался регулярной мейотической сегрегацией контрольных ауксотрофных маркеров *his* и *ura* – 3Р:5N:18Т.

На рис. 27 представлены результаты Саузерн-гибридизации с зондом

LAC12. Буквами “l” (*var. lactis*) и “k” («*krassilnikovii*») отмечены соответствующие *AluI*-профили рестрикции межгенного спейсера IGS2. ПДРФ-паттерны штаммов *var. lactis* и «*krassilnikovii*» легко дифференцируются (рис. 10, дорожки 1–3 и 5–8).

Все сегреганты были проверены по способности ферментировать лактозу. Результаты полностью соответствовали данным Саузерн-гибридизации. Большинство сегрегантов с *AluI*-профилем «*krassilnikovii*» не сбраживали лактозу (рис. 28). Исключением является сбраживающий лактозу сегрегант 20D, имеющий ПДРФ-профиль, характерный для дрожжей популяции «*krassilnikovii*».

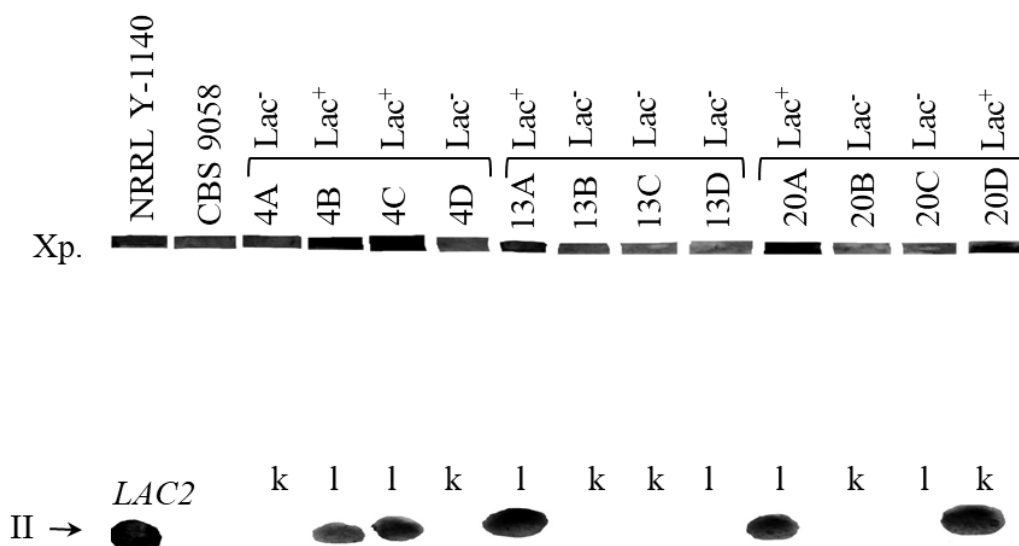


Рис. 28. Саузерн-гибридизация с зондом *LAC12* сегрегантов гибрида NRRL Y-1140 (*his LAC2*) × CBS 9058 (*ura lac*). Хр. – хромосома. Фенотип Lac⁺ отражает способность сбраживать лактозу. Lac⁻ – отсутствие способности сбраживать лактозу.

Таким образом, можно предположить, что в процессе межштаммовой гибридизации и последующей мейотической рекомбинации может происходить перенос локуса *LAC* от дрожжей *K. lactis var. lactis* к дрожжам популяции «*krassilnikovii*».

6.2.4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей дрожжевых и бактериальных β -галактозидаз LAC4

Молочные штаммы *K. marxianus* могли приобрести генный кластер *LAC4–LAC12* в результате горизонтального переноса от обитающих в молочных продуктах бактерий. Мы провели сравнительный анализ β -галактозидаз дрожжей *K. lactis* var. *lactis*, некоторых молочных и природных штаммов *K. marxianus* с бактериальными *lacZ*-последовательностями четырех штаммов бактерий различного происхождения: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 и *Streptococcus thermophilus* LMG 18311 – молочнокислые бактерии, используемые для приготовления заквасок различных кисломолочных продуктов; *Escherichia coli* str. K-12 – клинический изолят, выделенный из стула больного дифтерией человека; *Staphylococcus equorum* 26_S40, используемый для созревания некоторых сыров (Alexa et al., 2021).

На рис. 29 представлен результат множественного выравнивания белковых последовательностей LAC4 штаммов *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1118 (локус *LAC1*), NRRL Y-1140 (локус *LAC2*) и ВКМ Y-1333 (локус *LAC3*), молочного штамма *K. marxianus* CBS 397, природного изолята DMKU3-1042 с бактериальными последовательностями. Выравнивание выполнено в программе MUSCLE редактора AliView (Larsson, 2014). Дрожжевые β -галактозидазы были идентичны на 98.93–100%, тогда как их сходство с бактериальными β -галактозидазами составило всего лишь 28.92–45.41%. Наибольшее сходство выявлено со штаммом *S. equorum* 26_S40 (447 общих позиций). Штаммы *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962, *S. thermophilus* LMG 18311 и *E. coli* str. K-12 имеют, соответственно, по 301, 294 и 313 общих позиций с дрожжевыми LAC4-последовательностями. Бактериальные β -галактозидазы сходны между собой на 30.94–51.23%. Наибольшее сходство обнаружено между белками бактерий *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 и *E. coli* str. K-12:522 идентичных сайта. У изученных дрожжевых и бактериальных β -галактозидаз обнаружено 153 консервативных сайта, большинство из которых расположено в районе N-конца белковых последовательностей.

Poch et al. (1992) секвенировали ген *LAC4* штамма *K. lactis* var. *lactis* CBS 2359 (NRRL Y-1140) и сравнили его аминокислотную последовательность с бактериальными β -галактозидазами, включая штаммы *E. coli* и *S. thermophilus*. Сходство последовательностей наблюдалось практически на протяжении всей длины дрожжевой и бактериальных β -галактозидаз и заметно снижалось только в С-концевых областях.

Таким образом, проведенный нами сравнительный анализ и литературные данные свидетельствуют о близком эволюционном родстве бактериальных и дрожжевых β -галактозидаз.

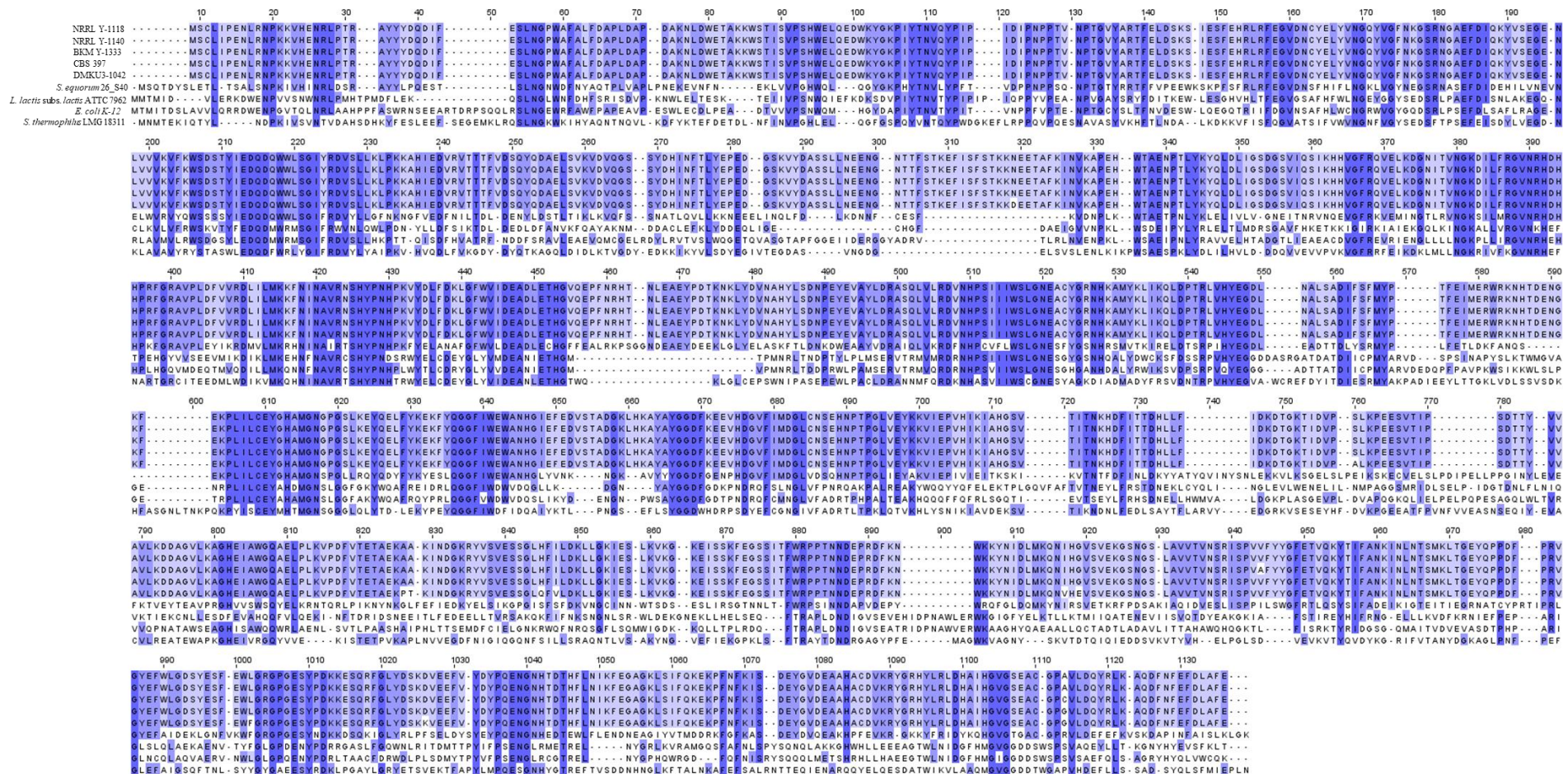


Рис. 29. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей β-галактозидаз штаммов *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1118 (локус *LAC1*), NRRL Y-1140 (локус *LAC2*) и BKM Y-1333 (локус *LAC3*), *K. marxianus* CBS 397, DMKU3-1042, *S. equorum* 26 S40 (MDN5610556.1), *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 7962 (GEB08072.1), *S. thermophilus* LMG 18311 (AAM28587.1), *E. coli* str. K-12 (NP_414878.1). Сходные позиции выделены синим цветом, интенсивность отражает степень консервативности сайта. Выравнивание выполнено с использованием программы MUSCLE.

6.3. Обсуждение

У дрожжей *K. lactis* var. *lactis* способность ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хр. II) и *LAC3* (хр. IV). Доместикация молочных дрожжей *K. lactis*, по-видимому, произошла на основе приобретения генного кластера *LAC4–LAC12* от молочных штаммов *K. marxianus* в процессе межвидовой гибридизации с не утилизирующими лактозу природными дрожжами популяции «krassilnikovii».

По-видимому, межвидовая гибридизация *K. marxianus* × *K. lactis* популяции «krassilnikovii» произошла в процессе изготовления кисломолочного продукта древними фермерами, скорее всего в Европе. Это хорошо согласуется с археологическими данными. После первоначального одомашнивания (~8000–10000 лет назад) в Юго-Западной Азии крупный рогатый скот (*Bos taurus*), овцы (*Ovis aries*) и козы (*Capra hircus*) распространились через Евразийские степи в Среднюю Азию и Восточную Европу (Larson, Fuller, 2014; Vigne, 2015). Согласно протеомному анализу древних керамических сосудов и зубного камня человеческих останков употребление человеком молочных продуктов появилось вскоре после одомашнивания молочных видов животных в степях Евразии: примерно 5500–8000 лет назад (Orlando, 2018; Hendy et al., 2018; Charlton et al., 2019; Wilkin et al., 2020). Используя метод для молекулярных часов дрожжей (Rolland, Dujon, 2011), было подсчитано, что интрогрессия лактозного кластера *LAC4–LAC12* в геном дрожжей *K. lactis* примерно совпадает с периодом одомашнивания молочных животных (Varela et al., 2019).

В свою очередь, дрожжи *K. marxianus* могли приобрести генный кластер *LAC4–LAC12* в результате горизонтального переноса от обитающих в молочных продуктах бактерий.

ГЛАВА 7. МЕЖШТАММОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES LACTIS* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ШТАММОВ, СПОСОБНЫХ АКТИВНО СБРАЖИВАТЬ ЛАКТОЗУ

7.1. Физиологические особенности штаммов *K. lactis* var. *lactis*

7.1.1. Ферментация лактозы

Мы проверили способность ферментировать лактозу у 16 штаммов *K. lactis* var. *lactis*, выделенных из различных молочных продуктов: CBS 683 (Т), NRRL Y-1140, CBS 2360, CBS 2619, SM 48.7, NRRL Y-1118, ВКМ Y-869, ВКМ Y-870, ВКМ Y-896, ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339, ВКМ Y-1343, UCM Y-328, ВКПМ Y-492, ВКМ Y-1868 (табл. 2). Штаммы были изучены по способности ферментировать лактозу в пробирках с поплавками. За исключением штамма CBS 2360, все остальные штаммы сбразживали лактозу уже через сутки. Пятнадцать штаммов были отобраны для дальнейшего изучения ферментационной активности весовым методом в колбах.

7.1.2. Ферментационная активность

Скорость сбразживания лактозы определяли по количеству выделенного углекислого газа в течение 72 ч. Перед засевом опытных колб культуры дрожжей выращивали в жидкой YP-среде в течение 48 ч.

На первые сутки наиболее интенсивное брожение зарегистрировано у штаммов ВКМ Y-870, UCM Y-328, ВКПМ Y-492 и ВКМ Y-1868, тогда как у штаммов CBS 2619 и ВКМ Y-869 процесс брожения начинался только на вторые сутки. Через 72 ч наиболее интенсивным брожением обладали штаммы ВКМ Y-1339 (локус *LAC3*), ВКМ-870 и NRRL Y-1118 (*LAC1*). Хорошо сбразживали лактозу еще шесть штаммов: NRRL Y-1140 и SM 48.7 (*LAC2*), ВКМ Y-1333 (*LAC3*) и обладающие двумя локусами *LAC* штаммы UCM Y-328, ВКПМ Y-492 и ВКМ Y-1868 (рис. 30). У штаммов, обладающих тремя разными локусами *LAC* – ВКМ Y-869 (*LAC1*), CBS 2619 (*LAC2*) и ВКМ Y-1343 (*LAC3*) – эффективность ферментации была очень низкой. Не обнаружено корреляции между интенсивностью ферментации и происхождением штамма. Например, наиболее интенсивно сбразживающие лактозу штаммы ВКМ Y-870 и ВКМ Y-

1339 выделены соответственно из чала в Туркмении и сметаны в Санкт-Петербурге (рис. 30, табл. 2). В тоже время выделенные из сливок в США штаммы NRRL Y-1118 и NRRL Y-1140 различались по эффективности ферментации лактозы.

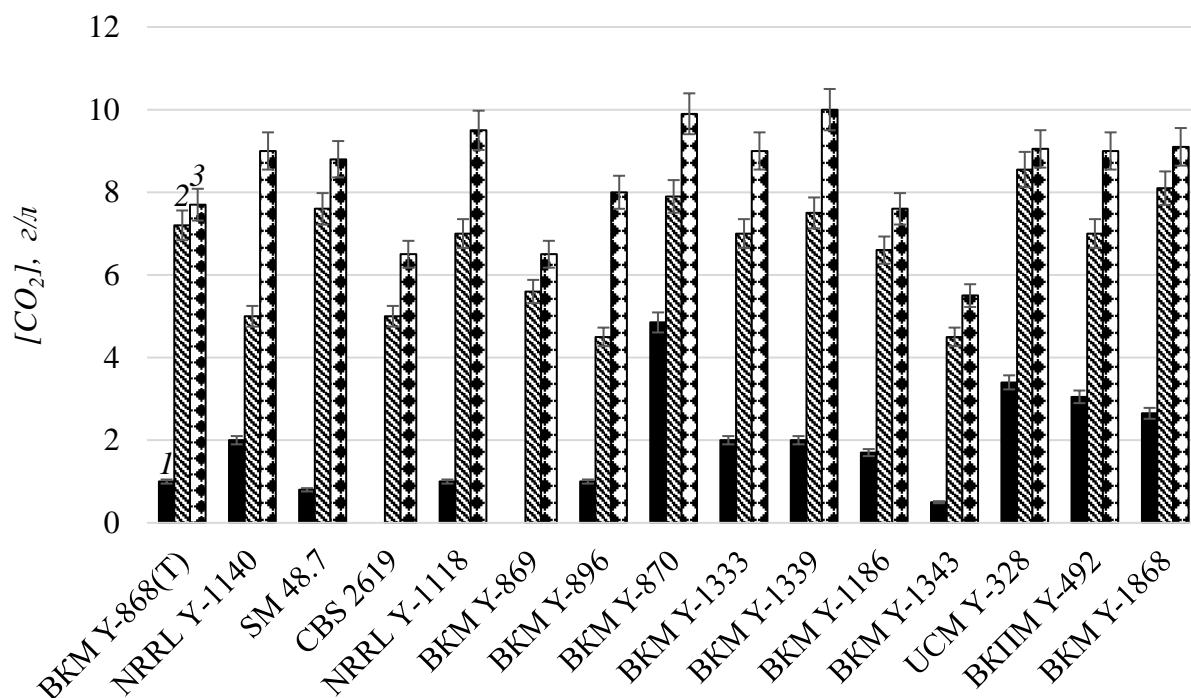


Рис. 30. Эффективность ферментации лактозы разными штаммами *K. lactis var. lactis*. Скорость сбраживания 2%-ного раствора лактозы определяли по количеству углекислого газа, выделенного через 24 (1), 48 (2) и 72 (3) ч.

7.2. Влияние межштаммовой гибридизации на скорость сбраживания лактозы

7.2.1. Получение межштаммовых гибридов *K. lactis var. lactis*

По результатам ферментационных тестов для гибридизации были отобраны четыре штамма, обладающие различными локусами *LAC* и способные интенсивно сбраживают лактозу: ВКМ Y-1339 и ВКМ Y-1333 (*LAC3*), NRRL Y-1118 (*LAC1*) и NRRL Y-1140 (*LAC2*). Активно сбраживающий лактозу штамм ВКМ-870 не спорулировал и не имел типа спаривания, поэтому был непригоден для гибридизации. В табл. 10 указаны гибриды, полученные между отобранными штаммами.

Таблица 10. Происхождение гибридов в скрещиваниях штаммов *K. lactis* NRRL Y-1118, NRRL Y-1140, ВКМ Y-1333 и ВКМ Y-1339

| Гибрид | Происхождение гибридов | Генотип |
|----------------------|------------------------|--|
| Н1-1 Н1-2 | Y-1118 × Y-1140 | <i>MATα lys HIS LAC1 lac2/MATα LYS his lac1 LAC2</i> |
| Н2-1 Н2-2 Н2-3 | Y-1118 × Y-1333 | <i>MATα lys MET9 LAC1 lac3/LYS met9 lac1 LAC3</i> |
| Н3-1 Н3-2 Н3-3 | Y-1140 × Y-1333 | <i>MATα his MET9 LAC2 lac3/HIS met9 lac2 LAC3</i> |
| Н4-1 Н4-2 Н4-3 | Y-1118 × Y-1339 | <i>MATα lys MET5 LAC1 lac3/MATα LYS met5 lac1 LAC3</i> |

7.2.2. Сравнение скорости сбраживания лактозы родительских штаммов и гибридов *K. lactis var. lactis*

На рис. 31 представлены результаты сравнительного анализа ферментации лактозы для 11 полученных гибридов и родительских штаммов. Гибриды существенно различались по скорости и кинетике сбраживания лактозы. Гибриды Н1-1 и Н1-2 (Y-1118 × Y-1140) наиболее активное брожение продемонстрировали на вторые сутки по сравнению с родительскими штаммами, однако, на третьи сутки они практически не отличались от родительских штаммов или их активность снижалась (рис. 31). Гибриды Н2-1, Н2-2 и Н2-3 (Y-1118 × Y-1333) превосходили родительские штаммы по скорости сбраживания лактозы на первые и вторые сутки. На третьи сутки только гибрид Н2-3 более интенсивно сбраживал лактозу по сравнению с родительскими штаммами. Из трех гибридов Y-1140 × Y-1333 только один (Н3-3) превосходил родительские штаммы. Интенсивность сбраживания лактозы у гибрида Н3-1 была такой же, как у штамма ВКМ Y-1333, тогда как гибрид Н3-2 был хуже обоих родительских штаммов по этому показателю. Ни один из гибридов Н4-1, Н4-2 и Н4-3 (Y-1118 × Y-1339) не превосходил по скорости сбраживания лактозы родительские штаммы на третьи сутки. Гибрид

Н4-3 только на первые сутки сбраживал лактозу активнее родительских штаммов. Гибрид Н4-1 на первые и вторые сутки сбраживал лактозу интенсивнее, чем родительские штаммы, однако на третьи сутки интенсивность снижалась.

Таким образом, во всех комбинациях были получены гибриды, которые на первые и вторые сутки по интенсивности сбраживания лактозы были сопоставимы с родительскими штаммами или превосходили их: Н1-1, Н1-2, Н2-1, Н2-2, Н2-3, Н3-1, Н3-3 и Н4-1. Через 72 ч только два гибрида превосходили родительские штаммы по этому показателю: Н2-3 (Y-1118 × Y-1333) и Н3-3 (Y-1140 × Y-1333).

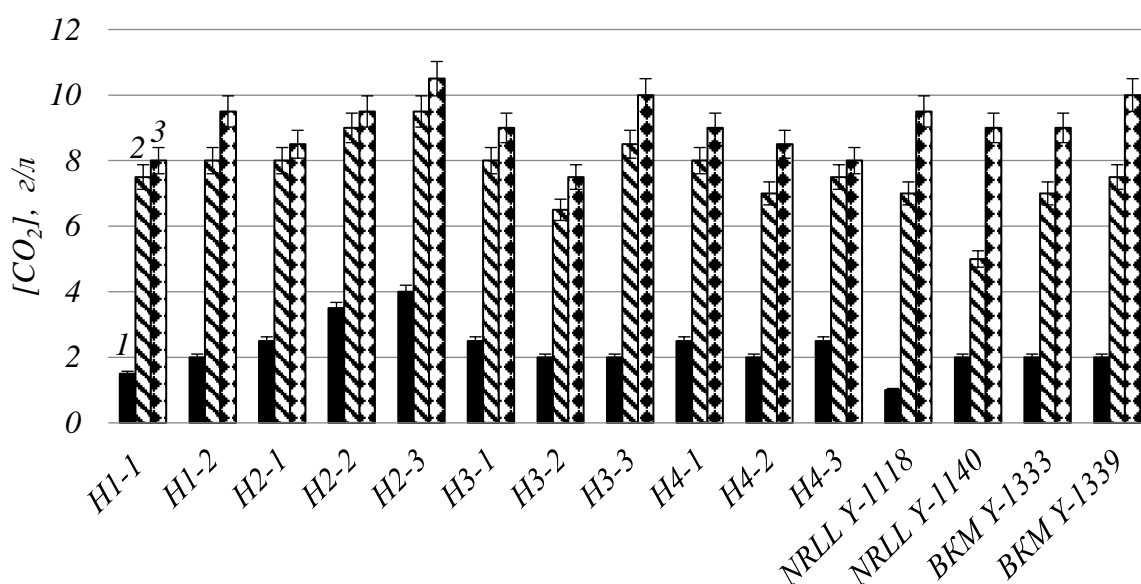


Рис. 31. Эффективность ферментации лактозы межштаммовыми гибридами и родительскими штаммами *K. lactis*. Скорость сбраживания 2%-ного раствора лактозы определяли по количеству углекислого газа, выделяемого через 24 (1), 48 (2) и 72 (3) ч.

7.3. Сравнительный анализ интенсивности ферментации лактозы молочных дрожжей *K. lactis var. lactis*, *K. marxianus* и гибридных штаммов

Для более детального изучения динамики утилизации лактозы и её компонентов, глюкозы и галактозы, а также образования этилового спирта нами было отобрано шесть гибридов (Y-1118 × Y-1140 (Н1-2), Y-1118 × Y-1333 (Н2-2, Н2-3), Y-1140 × Y-1333 (Н3-1, Н3-3), Y-1118 × Y-1339 (Н4-1)), которые обладали наибольшей ферментационной активностью на 2%-ной

лактозе. В анализе также участвовали родительские штаммы: ВКМ Y-1339 (*LAC3*), ВКМ Y-1333 (*LAC3*), NRRL Y-1118 (*LAC1*) и NRRL Y-1140 (*LAC2*). Для сравнения были привлечены восемь наиболее активно сбраживающих лактозу штаммов *K. marxianus*: ВКМ Y-126, ВКМ Y-453, ВКМ Y-459, ВКМ Y-460, ВКМ Y-464, ВКМ Y-1335, ВКМ Y-1337 и CBS 397 (Наумова и др., 2017) (табл. 4).

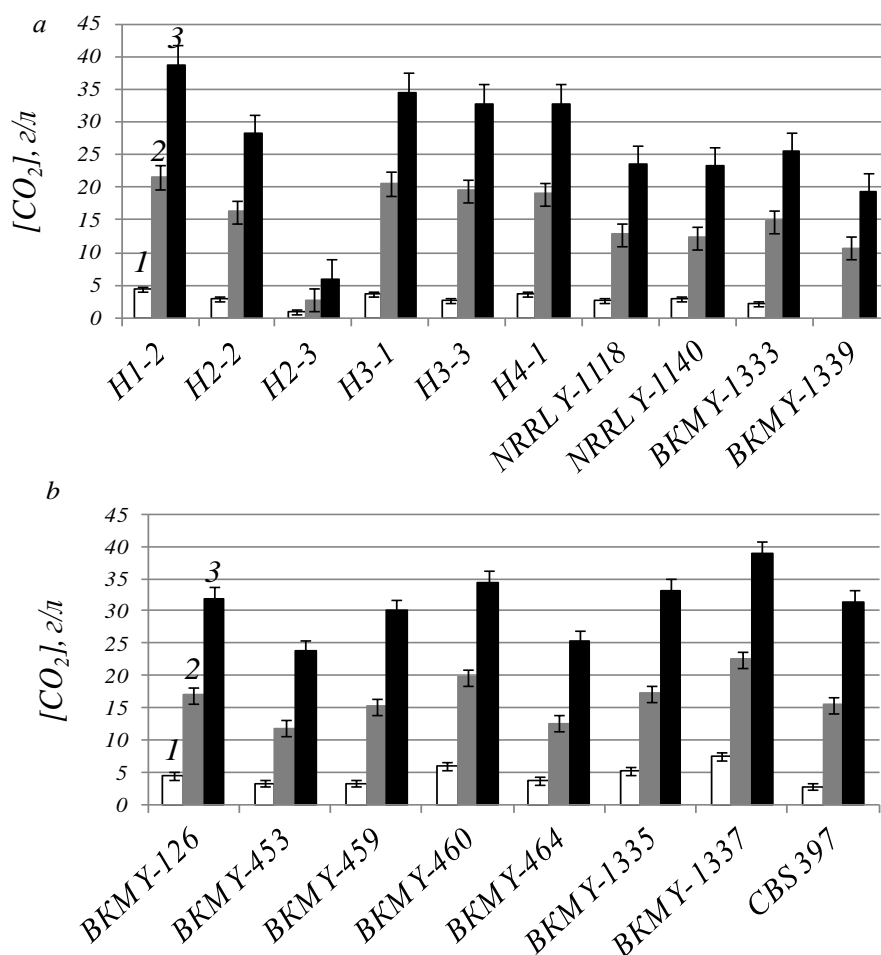


Рис. 32. Эффективность ферментации лактозы штаммами *K. lactis*, межштаммовыми гибридами (а) и дрожжами *K. marxianus* (b). Скорость сбраживания 10%-ного раствора лактозы определяли по количеству углекислого газа, выделяемого через 24 (1), 48 (2) и 72 (3) ч весовым методом.

Содержание лактозы в молочных продуктах в значительной степени зависит от типа молока и конкретного продукта и варьирует от 3 до 6.8% (Scrimshaw, Murray, 1998; Al Haj, Al Kanhal, 2010; Iannotti et al., 2013; Kula, Tegegne, 2016). Принимая это во внимание, мы сравнили изученные штаммы по интенсивности сбраживания 10%-ной лактозы (рис. 32а). Через 72 ч

наиболее интенсивное брожение отмечено у гибридов Н1-2, Н3-1, Н3-3 и Н4-1, которые по этому показателю значительно превосходили родительские штаммы *K. lactis* (рис. 32a). Из восьми изученных штаммов *K. marxianus* наиболее интенсивно сбраживали 10%-ную лактозу штаммы ВКМ Y-1337, ВКМ Y-1335, ВКМ Y-460, ВКМ Y-126 и CBS 397 (рис. 32b). Указанные штаммы *K. marxianus* и гибриды были отобраны для ВЭЖХ анализа. В анализ были также включены родительские штаммы *K. lactis*.

7.3.1. Динамика сбраживания лактозы и образования этилового спирта

На рис. 33a представлена динамика гидролиза лактозы отобранными штаммами *K. lactis* var. *lactis*, включая четыре гибрида и родительские культуры. Штаммы ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339, NRRL Y-1118 и NRRL Y-1140 быстрее утилизировали лактозу, чем гибриды (рис. 33a). По истечении 72 ч штаммы NRRL Y-1118 и ВКМ Y-1333 полностью гидролизировали лактозу. Среди гибридов наиболее быстро утилизировал лактозу штамм Н1-2, который также наиболее интенсивно сбраживал 10%-ную лактозу в колбах (рис. 33a и 32a). Изученные дрожжи *K. marxianus* утилизировали молочный сахар значительно быстрее, чем штаммы *K. lactis* var. *lactis*: через 72 часа все штаммы *K. marxianus* полностью гидролизировали всю лактозу в среде (рис. 33c). Следует отметить, что штаммы ВКМ Y-460, ВКМ Y-1337 и CBS 397 полностью утилизировали лактозу уже через 56 ч.

Согласно ВЭЖХ анализу, изученные штаммы существенно различались по динамике образования этанола при ферментации лактозы (рис. 33b и d). Практически все гибриды, за исключением гибрида Н2-2, образовывали больше спирта, чем родительские штаммы *K. lactis* var. *lactis* (рис. 33b). Наиболее высокие показатели имели гибриды Н1-2 и Н3-1: 43.2 и 39.6 г/л спирта через 72 ч ферментации лактозы. За это же время, родительские штаммы образовывали меньше спирта: <37 г/л.

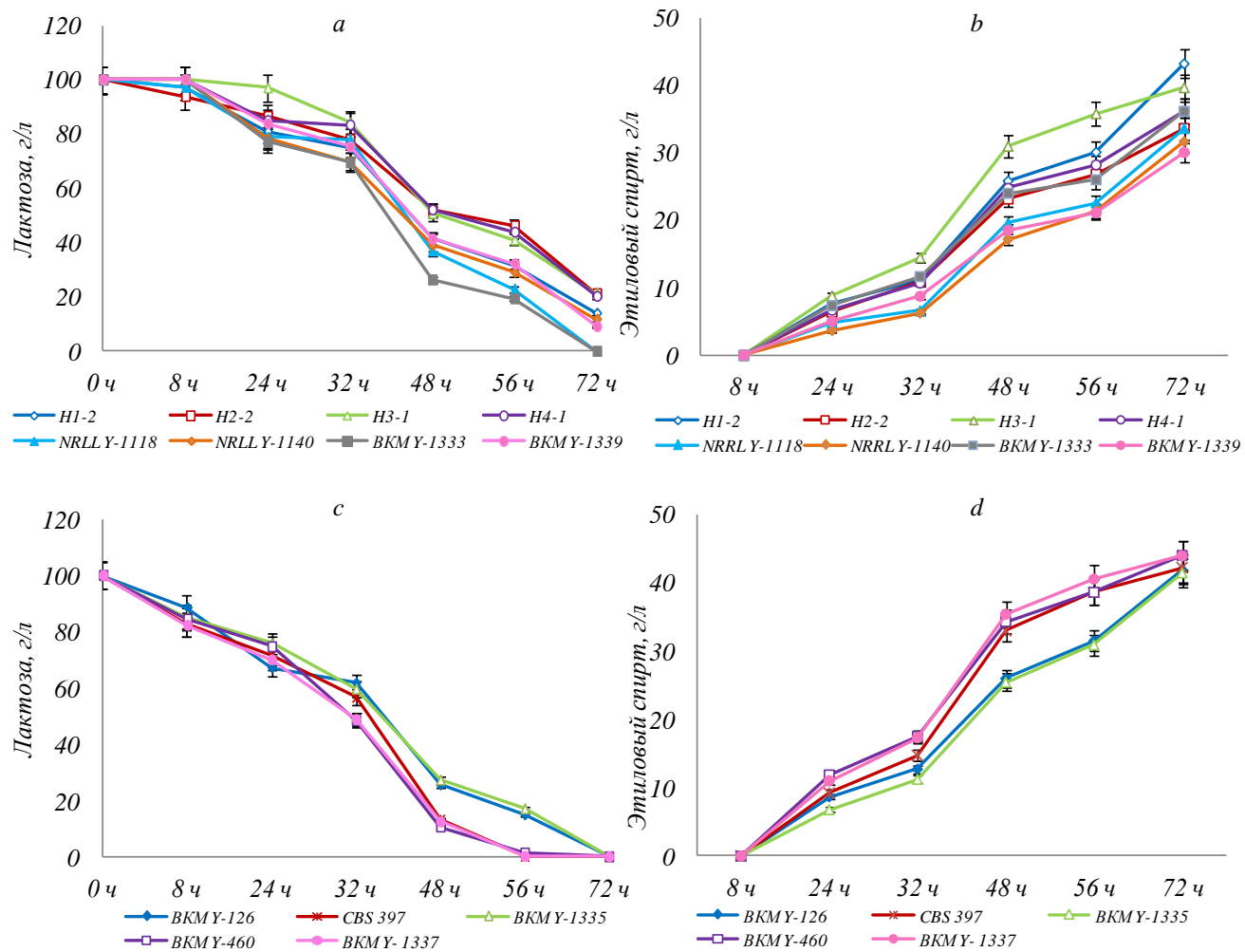


Рис. 33. ВЭЖХ анализ гидролиза 10%-ного раствора лактозы и образования этилового спирта штаммами *K. lactis* var. *lactis* и межштаммовыми гибридами (a, b) и дрожжами *K. marxianus* (c, d) через 8, 24, 32, 48, 56 и 72 ч.

В целом, штаммы *K. marxianus* характеризовались более высокими показателями выхода спирта: >41.39 г/л (рис. 33d). Наиболее интенсивно образовывали спирт штаммы CBS 397, ВКМ Y-1337 и ВКМ Y-460: 42.18, 43.89 и 43.95 г/л через 72 ч ферментации.

7.3.2. Динамика сбраживания глюкозы и галактозы

Для ВЭЖХ анализа были отобраны штаммы, которые наиболее интенсивно сбраживали лактозу и образовывали спирт: *K. marxianus* (ВКМ Y-1337, CBS 397), гибриды Н1-2 и Н3-1, а также родительские штаммы *K. lactis* var. *lactis* (NRRL Y-1118, NRRL Y-1140, ВКМ Y-1333). Через 72 часа полностью гидролизовали глюкозу штаммы *K. marxianus* ВКМ Y-1337, *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1118 и оба гибрида (рис. 34a). Наилучшая динамика гидролиза глюкозы отмечена у гибрида Н3-1. При сбраживании глюкозы наибольший выход спирта отмечен у гибридов Н1-2 (44,8 г/л), Н3-1 (43,4 г/л) и штамма *K. marxianus* ВКМ Y-1337 (46 г/л) (рис. 34b).

Несколько другая картина наблюдалась при сбраживании галактозы (рис. 34c и d). Изученные штаммы характеризовались достаточно низкой скоростью утилизации галактозы и через 72 часа гидролизовали не более 50% сахара в ферментационной среде. Наиболее эффективно сбраживал галактозу штамм *K. marxianus* CBS 397, который также характеризовался наибольшим выходом спирта: 23 г/л. Остальные штаммы образовывали менее 22,1 г/л спирта (рис. 34d). Следует отметить, что гибриды Н1-2 и Н3-1 более эффективно сбраживали галактозу и образовывали спирт, чем родительские штаммы NRRL Y-1118, NRRL Y-1140 и ВКМ Y-1333. Дрожжи *Kluyveromyces* могут утилизировать лактозу в качестве единственного источника углерода, однако, как большинство микроорганизмов, предпочитают глюкозу как наиболее энергоэффективный сахар (Vinuselvi et al., 2012).

Таким образом, изученные дрожжи *Kluyveromyces* существенно различаются по эффективности сбраживания сахаров и выходу спирта.

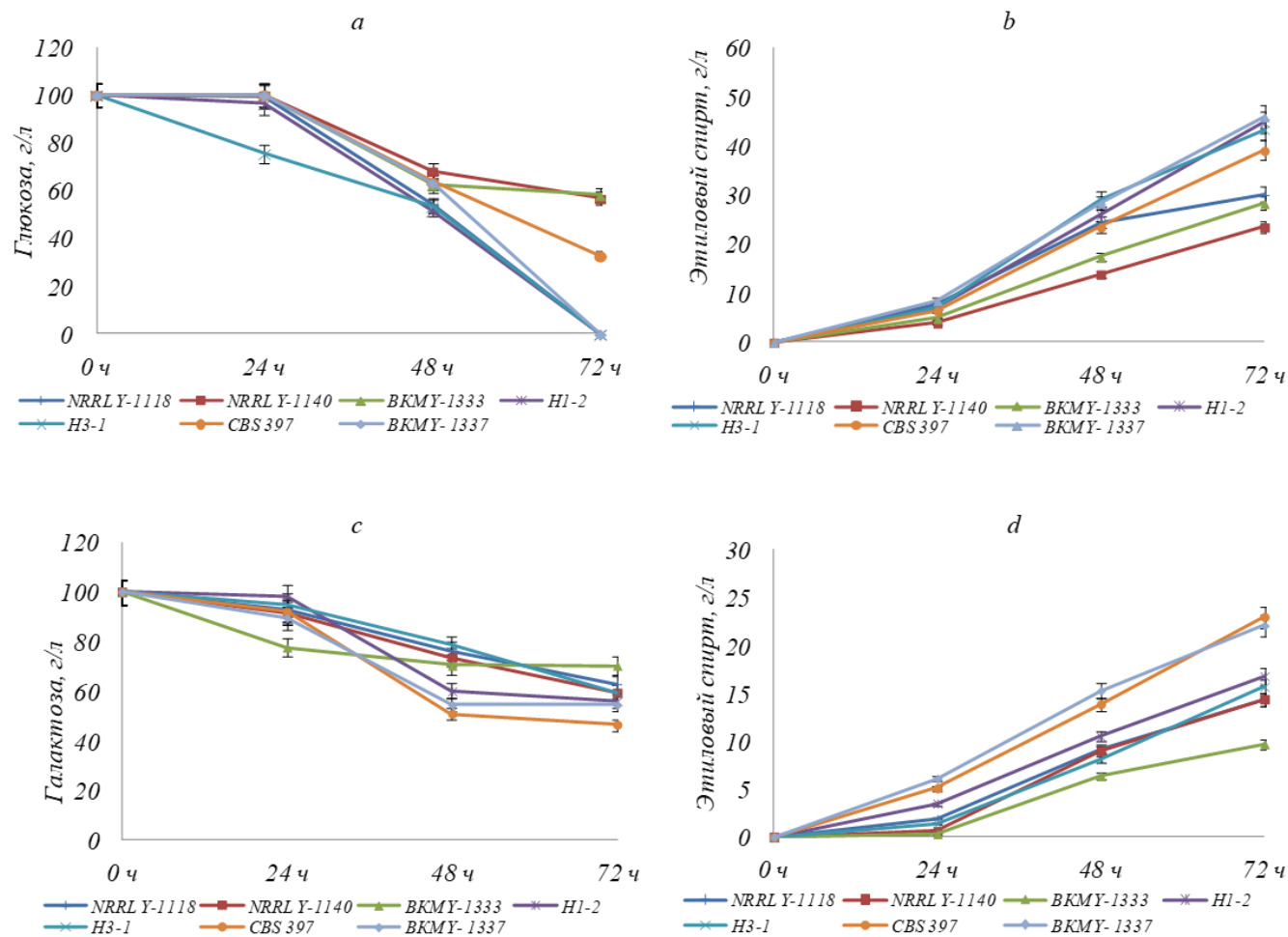


Рис. 34. ВЭЖХ анализ гидролиза 10%-ных растворов глюкозы и галактозы (a и c), а также образования этилового спирта (b, d) штаммами *K. lactis* var. *lactis*, межштаммовыми гибридами и дрожжами *K. marxianus* через 8, 24, 32, 48, 56 и 72 ч.

В целом, изученные штаммы *K. marxianus* превосходили штаммы *K. lactis* по скорости гидролиза 10%-ных растворов лактозы, глюкозы и галактозы и динамике накопления спирта. В то же время, два межштаммовых гибрида *K. lactis* – Н1-2 (NRRL Y-1118 × NRRL Y-1140) и Н3-1 (NRRL Y-1140 × ВКМ Y-1333) – практически не уступали дрожжам *K. marxianus* по большинству показателей, а по динамике сбраживания глюкозы превосходили их.

7.4. Обсуждение

Согласно полученным результатам, межштаммовая гибридизация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* – эффективный метод создания штаммов, способных активно сбраживать лактозу. Гибриды *K. lactis* var. *lactis* Н1-2, Н3-1 и штамм *K. marxianus* ВКМ Y-1337, обладающие высокой ферментационной активностью, представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных работ с молочными дрожжами рода *Kluyveromyces*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наряду с культурными растениями и домашними животными человечество на протяжении многих тысячелетий использует культивируемые микроорганизмы, прежде всего дрожжи-сахаромицеты, в хлебопечении, виноделии, пивоварении, производстве спирта. К одомашненным человеком микроорганизмам можно отнести и молочные дрожжи *Kluveromyces*, которые часто выделяются из различных молочных продуктов (сыр, молоко, кисломолочные продукты), придавая им приятные ароматы и вкусовые свойства. Род *Kluveromyces* включает восемь видов: наземные *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii*, *K. wickerhamii* и *K. starmeri*, а также морские *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. siamensis*, которые существенно различаются по способности утилизировать молочный сахар лактозу (Kurtzman, 2003; Lachance, 2007; Freitas et al., 2020). Молочные штаммы *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* способны ферментировать лактозу, тогда как виды *K. aestuarii*, *K. siamensis*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii* и природные изоляты *K. marxianus* ассимилируют лактозу, но не способны ее ферментировать. Дрожжи *K. dobzhanskii*, *K. starmeri* и *K. lactis* var. *drosophilae* не утилизируют лактозу.

Проведенное молекулярно-генетическое исследование показало сложное строение комплексного вида *K. lactis* и подтвердило правомерность выделения сбразивающих лактозу штаммов в отдельную разновидность *K. lactis* var. *lactis*, которая была предложена на основании физиологических и экологических критериев (Sidenberg, Lachance, 1983, 1986; Lachance, 2011). Штаммы var. *lactis* имеют идентичные IGS2-ПДРФ-паттерны и практически не отличаются по нуклеотидным последовательностям ряда ядерных (ITS-участок, фактор элонгации транскрипции *EF-1 α* , *ACT1*) генов, а также способны образовывать фертильные гибриды с выживаемостью аскоспор 84–99%. К этой разновидности относятся штаммы, выделенные из различных молочных продуктов, клинические изоляты, почвенный штамм ВКПМ У-3737, а также типовая культура таксономического вида *K. vanudenii* ВКМ У-

1535. Этот штамм *K. vanudenii* практически не отличается от типовой культуры *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868 по IGS2-паттернам, ITS, *EF-1 α* и *ACT1* последовательностям и образует фертильные гибриды с выживаемостью аскоспор 71–85%. Ранее было показано, что штамм *K. vanudenii* ВКМ Y-1535 имеет 97% ДНК-ДНК реассоциации с типовой культурой *K. lactis* var. *lactis* ВКМ Y-868, что сопоставимо с ДНК-ДНК реассоциацией разных штаммов в пределах разновидности var. *lactis*: 96–100% (Bicknell, Douglas, 1970; Martini, 1973; Fuson et al., 1987). Недавно проведенное полногеномное секвенирование дрожжей *K. vanudenii* подтвердило их значительное сходство с дрожжами *K. lactis* var. *lactis*. Принимая во внимание средиземноморское происхождение винных дрожжей (Almeida et al., 2015), можно предположить, что штамм *K. vanudenii* ВКМ Y-1535, выделенный с оборудования винзавода в Южной Африке, также имеет европейское происхождение.

Сбраживающие лактозу дрожжи ассоциированы с молочными продуктами и млекопитающими и, по-видимому, являются родоначальниками клинических изолятов. Ранее было установлено, что молочные и госпитальные штаммы также имеют идентичные ПЦР-профили с микросателлитным праймером (GTG)₅ (Наумова и др., 2005). Сбраживающий лактозу штамм ВКПМ Y-3737 был выделен из почвы в Измайловском парке г. Москвы (Наумов и др., 2014). Этот штамм по всем изученным молекулярным маркерам не отличается от типовой культуры var. *lactis* ВКМ Y-868. По-видимому, молочные дрожжи в природе могут распространяться с участием диких млекопитающих, кормящих потомство молоком. Другим источником их распространения в природе может быть молочное скотоводство.

С другой стороны, полученные нами молекулярные и генетические данные, указывают на несостоятельность отнесения природных Lac⁻ штаммов к одной разновидности *K. lactis* var. *drosophilorum*, которая является гетерогенной и включает шесть генетически изолированных популяций: «*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная».

Указанные популяции характеризуются различными молекулярными кариотипами, уникальными SNP-заменами в гене *ACT1* и образуют полустерильные гибриды: выживаемость аскоспор 0–34%. Несмотря на значительный полиморфизм индивидуальных размеров хромосомных полос, дрожжи var. *lactis*, «krassilnikovii», «drosophilum», «phaseolosporus», «pseudovanudenii», «водная» и «восточная», по-видимому, имеют одинаковое гаплоидное число хромосом равное шести. Наибольший диапазон размеров хромосомных полос отмечен у штаммов из Средней Азии «krassilnikovii» (1000–2900 т.п.н.), а наименьший – у «drosophilum» (1600–2200 т.п.н.). Следует обратить внимание на биогеографию дрожжей *K. lactis*. Сбраживающие лактозу штаммы *K. lactis* var. *lactis* выделяются в различных регионах мира; дрожжи «drosophilum», «phaseolosporus», «pseudovanudenii» и «водная» характерны только для Северной Америки; «восточная» – для Дальневосточной Азии, тогда как популяция «krassilnikovii» представлена европейскими и среднеазиатскими изолятами.

Результаты настоящего исследования хорошо согласуются с литературными данными по ДНК-ДНК реассоциации (Martini, 1973; Fuson et al., 1987). Типовые культуры *K. drosophilum* ВКМ У-1302 и *K. phaseolosporus* ВКМ У-1296 имеют 70–83.4% ДНК-ДНК реассоциации, а с типовой культурой *K. lactis* var. *lactis* ВКМ У-868 - 70–79.9 и 70–90.2% соответственно. В свою очередь, штаммы UCDFST 71-45 популяции «водная» и UCDFST 69-8 популяции «восточная» имеют 64–78% ДНК-ДНК реассоциации с типовыми культурами *K. lactis* var. *lactis* CBS 683 и *K. lactis* var. *drosophilum* ВКМ У-1302. Таким образом, можно заключить, что частично генетически изолированные Лас⁻ популяции дрожжей *K. lactis* имеют статус таксономических разновидностей.

В современной систематике для видовой идентификации аскомицетных дрожжей используется филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ряда молекулярных маркеров (баркодов), прежде всего, домена D1/D2 гена 26S рРНК и 5.8S-ITS-фрагмента (Schoch et al., 2012; Vu et

al., 2016). Варибельная ITS последовательность используется также для изучения внутривидовой изменчивости различных дрожжей и дифференциации генетических популяций. Сравнительный анализ дискриминационного потенциала трех использованных нами молекулярных маркеров показал, что все семь генетических популяций могут быть дифференцированы только на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1*. На примере различных родов аскомицетных дрожжей было показано, что во многих случаях ген *ACT1* является предпочтительным маркером по сравнению с последовательностями кластера генов рДНК (Daniel, Meyer, 2003). Принимая во внимание, что в GenBank уже имеется достаточно обширная база данных дрожжевых последовательностей гена *ACT1*, этот маркер может быть рекомендован для достоверной идентификации внутривидовых популяций дрожжей *K. lactis*.

С помощью молекулярного кариотипирования, Саузерн-гибридизации, секвенирования и рекомбинационных тестов на аллелизм мы провели изучение β -галактозидазных и пермеазных генов у сбраживающих лактозу штаммов *K. lactis*, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. Рекомбинационным анализом и молекулярным кариотипированием установлено, что у молочных дрожжей *K. lactis var. lactis* способность ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хр. II) и *LAC3* (хр. IV). Большинство изученных нами штаммов обладали локусом *LAC2*.

Впервые проведен сравнительный анализ β -галактозидаз и пермеаз лактозы дрожжей рода *Kluyveromyces* и аминокислотных последовательностей этих ферментов у других родов дрожжей. Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками *LAC4* и *LAC12* дрожжей рода *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. marxianus*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii*) и *Scheffersomyces stipitis* и *Debaryomyces hansenii*. Установлено,

что β -галактозидазы дрожжей рода *Kluyveromyces* идентичны на 63.67–100%, а пермеазы – на 66.67–100%.

Согласно проведенному нами филогенетическому анализу наибольшим сходством обладают β -галактозидазы и пермеазы дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и молочных штаммов *K. marxianus*: 99.80–100% и 97.79–100%, что указывает на общее происхождение их локусов *LAC*. Филогенетический анализ также указывает на близкое генетическое родство молочных и госпитальных штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*. Клинические изоляты способны сбраживать лактозу и, по-видимому, происходят от молочных дрожжей. Ранее было показано, что клинические изоляты *K. lactis* var. *lactis* по многим молекулярным маркерам не отличаются от штаммов, выделенных из молочных продуктов (Наумова и др., 2005). Ряд характеристик, свойственных патогенным дрожжам, имеются у госпитальных штаммов *K. marxianus*, например, образование псевдомицелия, устойчивость к повышенной температуре и высокая пектолитическая активность (Çuhadar et al., 2017).

В отличие от *K. marxianus*, природные штаммы *K. lactis* не способны утилизировать лактозу. Это указывает на то, что доместикация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* произошла на основе приобретения генного кластера *LAC4–LAC12* от молочных штаммов *K. marxianus*. Наиболее вероятным реципиентом генного кластера *LAC4–LAC12* и прародителем культурных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* являются дрожжи европейской популяции «krassilnikovii», которые генетически не изолированы от молочных штаммов и не отличаются от них по многим молекулярным маркерам. На наш взгляд, приобретение не сбраживающими лактозу дрожжами популяции «krassilnikovii» локусов *LAC* ферментации лактозы происходило по схеме, представленной на рис. 35.

Межвидовые гибриды молочных дрожжей *K. marxianus* и *K. lactis* популяции «krassilnikovii», по-видимому, могли сформироваться в процессе производства кисломолочных продуктов в Европе.

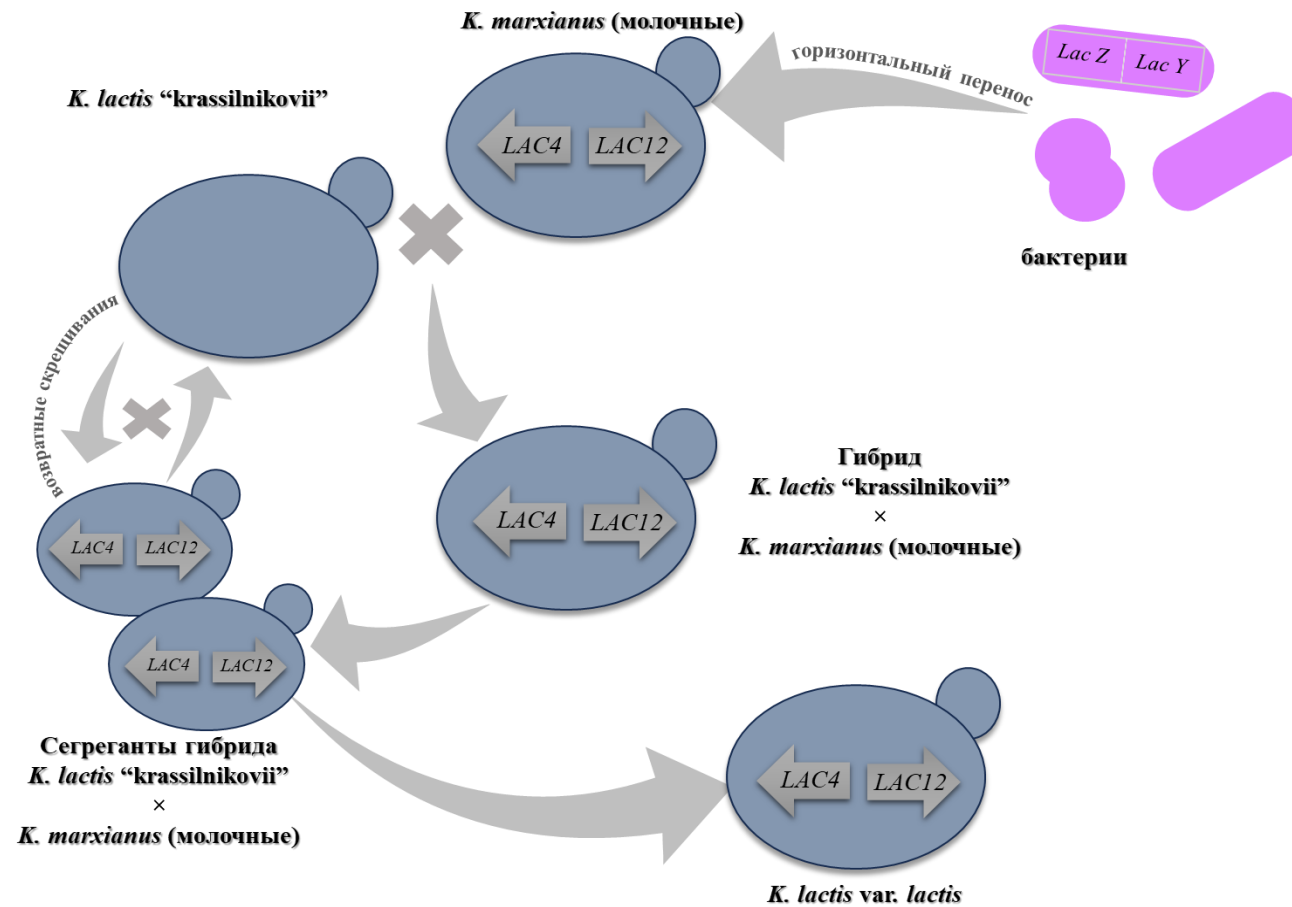


Рис. 35. Схема возможного приобретения генного кластера *LAC4-LAC12* природными дрожжами *K. lactis* популяции «krassilnikovii».

Например, характерные для производства сыра липиды были обнаружены в Юго-Восточной Европе в черепках керамики и фильтровальных сосудах возрастом от 7400 до 6800 лет (Salque et al., 2013; McClure et al., 2018).

В результате межвидовой гибридизации, вероятно, произошел перенос лактозного кластера *LAC4-LAC12* из молочных штаммов *K. marxianus* в геном не сбраживающего лактозу штамма *K. lactis* популяции «krassilnikovii».

Затем под воздействием селекционного отбора происходили многократные возвратные скрещивания межвидовых Lac⁺ сегрегантов с родительским Lac⁻ штаммом популяции «krassilnikovii» (рис. 35). Таким образом, в результате серии возвратных скрещиваний и мейотической рекомбинации мог сформироваться современный геном молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis*. Скорее всего, перенос лактозного кластера генов дрожжей *K. marxianus* был осуществлен на правое плечо хромосомы II дрожжей *K. lactis*. На это указывает тот факт, что большинство изученных нами штаммов *K. lactis* var. *lactis* обладали локусом *LAC2*. Причем, этим локусом обладали молочные, госпитальные, а также природные штаммы ВКПМ Y-3737, H1, H2 и H3, выделенные из почвы в Москве (Наумов и др., 2014). Локусы *LAC1* и *LAC3* могли произойти от локуса *LAC2* в процессе внутривидовой гибридизации за счет рекомбинации гомологичных субтеломерных последовательностей различных хромосом. В свою очередь, дрожжи *K. marxianus* могли приобрести лактозные гены в результате горизонтального переноса соответствующих генов от молочнокислых бактерий (Roch et al., 1992).

Полученные нами результаты показали, что межштаммовая гибридизация молочных дрожжей *K. lactis* является эффективным методом создания штаммов, активно ферментирующих лактозу. Из 11 полученных нами гибридов два из них (H2-3 и H3-3) превосходили по ферментационной активности родительские штаммы. Более того, гибрид H2-3 (Y-1140 × Y-1333) обладал наибольшей ферментационной активностью по сравнению со всеми изученными нами штаммами, включая гибриды. Улучшенная ферментационная способность гибридов, по-видимому, является следствием кумулятивного

эффекта в результате объединения двух локусов *LAC*, содержащих гены β -галактозидазы *LAC4* и пермеазы *LAC12*. Известно, что скрещивание генетически разнокачественных штаммов может приводить к гетерозисному эффекту. На дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* показано, что накопление в одном штамме полимерных генов ферментации сахаров, имеющих кумулятивный эффект, приводит к интенсификации процесса ферментации (Hohmann, 1987). Полученные нами гибриды Н2-3 (NRRL Y-1118 \times ВКМ Y-1333) и Н3-3 (NRRL Y-1140 \times ВКМ Y-1333), наиболее интенсивно сбраживающие лактозу, представляют интерес для дальнейших молекулярно-генетических исследований и селекционных разработок.

ВЫВОДЫ

1. С помощью филогенетического анализа, молекулярного кариотипирования и гибридологического анализа показано сложное строение комплексного вида *K. lactis* и подтверждена правильность выделения сбразивающих лактозу штаммов в отдельную разновидность *K. lactis* var. *lactis*. Установлено, что физиологическая разновидность *K. lactis* var. *drosophilorum* гетерогенна и представлена шестью генетически изолированными популяциями («*drosophilorum*», «*phaseolosporus*», «*krassilnikovii*», «*pseudovanudenii*», «водная» и «восточная») в статусе таксономических разновидностей.
2. Показано, что на основании нуклеотидных последовательностей гена *ACT1* можно достоверно дифференцировать разновидность дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и шесть природных генетических популяций в пределах вида *K. lactis*.
3. Установлено, что у дрожжей *K. lactis* var. *lactis* способность ферментировать лактозу контролируется тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV). С помощью филогенетического и рекомбинационного анализов установлено сложное строение локуса *LAC3*, включающего кластер генов *LAC4–LAC12* (гены β -галактозидазы и пермеазы лактозы).
4. Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками *LAC4* и *LAC12* дрожжей рода *Kluyveromyces*: *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii*. Обнаружена корреляция между последовательностями β -галактозидаз/пермеаз и экологическим происхождением штаммов *Kluyveromyces*: молочные продукты и природные источники.
5. С помощью межвидовой гибридизации, гибридологического анализа, молекулярного кариотипирования и ПДРФ-анализа продемонстрирован

возможный путь переноса лактозного кластера *LAC4–LAC12* из молочного штамма *K. marxianus* в геном природного Lac⁻ штамма *K. lactis* популяции «krassilnikovii».

6. Показано, что межштаммовая гибридизация является перспективным методом создания молочных штаммов *Kluyveromyces*, способных активно ферментировать лактозу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов / Ленинград: Наука. 1984. 144 с.
2. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей / М.: Изд-во АН СССР. 1954. 427 с.
3. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / М.: Бином. Лаборатория знаний. 2009. 256 с.
4. Насонова Е.С. Пульс-электрофорез: теория метода, инструментальный арсенал и области применения // Цитология. 2008. Т. 50. № 11. С. 927–935.
5. Наумов Г.И., Гудкова Н.К. Сравнительная генетика дрожжей Сообщение XVIII. Микроэволюция дрожжей *Saccharomyces bayanus* // Генетика. 1979. V. 15. № 4. P. 605–614.
6. Наумов Г.И. Геносистематика дрожжей рода *Kluveromyces* Kudriavzev emend. G. Naumov // Молек. генетика микробиол. и вирусол. 1986. № 5. С. 10–13.
7. Наумов Г.И. Геносистематика дрожжей-аскомицетов (К выходу определителя "The yeasts. A taxonomic study". 1984) // Микробиология. 1987. Т. 56. № 3. С. 521–524.
8. Наумов Г.И. Идентификация видов дрожжей рода *Zygoxospora* Kudriavzev emend. G. Naumov // Микробиология. 1988. Т. 57. № 1. С. 114–118.
9. Наумов Г.И. Дикий европейский вид *Zygoxospora krassilnikovii* – прародитель молочных дрожжей *Z. lactis* // ДАН. 2000. Т. 372. № 6. С. 846–849.
10. Наумов Г.И. Почему дрожжи *Kluveromyces wickerhamii* ассимилируют, но не сбраживают лактозу? // ДАН. 2005. V. 403. P. 847–849.
11. Наумов Г.И. Генетика полиморфизма утилизации лактозы у дрожжей *Kluveromyces marxianus* // ДАН. 2006. V. 409. P. 422–424.
12. Наумов Г.И. Обнаружение суперсемейств лактозных генов *LAC* у дрожжей *Kluveromyces* // ДАН. 2008. V. 420. P. 832–834.
13. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Баррио Е., Керол А. Генетическое и молекулярное изучение неспособности дрожжей *Kluveromyces lactis* var.

- drosophilorum* сбраживать лактозу // Микробиология. 2006. V. 75. P. 299–304.
14. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. Обнаружение молочных дрожжей *Kluveromyces lactis* var. *lactis* в природе // Микробиология. 2014. Т. 83. № 6. С. 677–681.
15. Наумова Е.С., Наумов Г.И., Никитина Т.Н., Садыкова А.Ж., Кондратьева В.И. Молекулярно-генетическая и физиологическая дифференциация дрожжей *Kluveromyces lactis* и *Kluveromyces marxianus*: анализ штаммов из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) // Микробиология. 2012. Т. 81. № 2. С. 236–243.
16. Наумова Е.С., Ли Ч.-Ф., Наумов Г.И. Молекулярно-генетический полиморфизм дрожжей *Kluveromyces dobzhanskii* // Микробиология. 2021. Т. 90. № 4. С. 492–499.
17. Орлова Н.Н. Генетический анализ: Учебн. Пособие / М.: Изд-во МГУ. 1991. 318 с.
18. Шнырева А. А., Шнырева А. В. Филогенетический анализ видов рода *Pleurotus* // Генетика. 2015. V. 51. № 2. С. 177–187.
19. Яблоков А.В. Популяционная биология. Учебн. пособие для биол. спец. Вузов / М.: Высш. шк. 1987. 303 с.
20. Aktas N., Boyaci I.H., Mutlu M., Tanyolac A. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM) // Biores Technol. 2005. V. 97. P. 2252–2259.
21. Al Haj O. A., Al Kanhal H. A. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk // Int. Dairy J. 2010. V. 20. № 12. P. 811–821.
22. Alexa E., Cobo-Diaz J.F., Renes E., O'Callaghan T.F., Kilcawley K., Mannion D., Skibinska I., Ruiz L., Margolles A., Fernández-Gómez P., Alvarez-Molina A., Crispie F., Puente-Gómez P., López M., Prieto M., Cotter P. Environmental sources along natural cave ripening shape the microbiome and metabolome of artisanal blue-veined cheeses // Research Square. American Chemical Society, Washington, DC. 2022.

23. Am-In S., Yongmanitchai V., Limtong S. *Kluyveromyces siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from water in a mangrove forest in Ranong Province, Thailand // FEMS Yeast Research. 2008. V. 8. P. 823–828.
24. Anisha G.S. β -Galactosidases / Current developments in biotechnology and bioengineering. Amsterdam: Elsevier. 2017. 395–421 pp.
25. Araujo F.V., Soares C.A.G., Hagler A.N., Mendonça-Hagler L.C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a southeast Brazilian mangrove ecosystem // Antonie van Leeuwenhoek. 1995. V. 68. P. 91–99.
26. Araujo F.V., Hagler A.N. *Kluyveromyces aestuarii*, a potential environmental quality indicator yeast for mangroves in the State of Rio de Janeiro, Brazil // Brazilian Journal of Microbiology. 2011. V. 42. № 3. P. 954–958.
27. Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R., McHale A.P. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general // World J Microbiol Biotechnol. 1998. V. 14. P. 809–821.
28. Barnett J.A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces meyeri* ex reess: A short review for non-taxonomists // Yeast. 1992. V. 8. P. 1–23.
29. Becerra M., Rodriguez-Belmonte E., Esperanza Cerdan M., Gonzalez Siso M.I. Engineered autolytic yeast strains secreting *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase for production of heterologous proteins in lactose media // J. Biotechnol. 2004. V. 109. P. 131–137.
30. Belloch C., Barrio E., Uruburu F., Garcia M. D., Querol A. Characterisation of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis // Syst Appl Microbiol. 1997. V. 20. P. 397–408.
31. Belloch C., Barrio E., García M. D., Querol V. Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers // Syst Appl Microbiol. 1998. V.21. №2. P. 266–73.

32. Belloch C., Barrio E., García M. D., Querol V. Inter- and Intraspecific Chromosome Pattern Variation in the Yeast Genus *Kluyveromyces* // *Yeast*. 1998a. V. 14. P. 1341–1354.
33. Belloch C., Querol A., García M.D., Barrio E. Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene // *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000. V.1. P. 405–416.
34. Belloch C., Fernández-Espinar T., Querol A., García M. D., Barrio E. An analysis of inter- and intraspecific genetic variabilities in the *Kluyveromyces marxianus* group of yeast species for the reconsideration of the *K. lactis* taxon // *Yeast*. 2002. V. 19. P. 257–268.
35. Bicknell J. N., Douglas H. C. Nucleic Acid Homologies Among Species of *Saccharomyces* // *Journal of bacteriology*. 1970. V. 101. № 2. P. 505–512.
36. Bilal M., Ji L., Xu Y., Xu S., Lin Y., Iqbal H. M. N., Cheng H. Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* // 2022. V. 20. V. 10. P. 851768.
37. Boeke J.D., Trueheart J., Natsoulis G., Fink G.R. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics // *Methods Enzymol*. 1987. V. 154. P. 164–175.
38. Bonekamp F.J., Oosterom J. On the safety of *Kluyveromyces lactis*: a review // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1994. V. 41. P. 1–3.
39. Breunig K.D., Bolotin-Fukuhara M., Bianchi M.M., Bourgarel D., Falcone C., Ferrero I., Frontali L., Goffrini P., Krijger J.J., Mazzoni C., Milkowski C., Steensma H.Y., Wésolowski-Louvel M., Zeeman A.M. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis* // *Enz. Microb. Techn*. 2000. V. 26. P. 771–780.
40. Brüßow H. Nutrition, population growth and disease: A short history of lactose // *Environ. Microbiol*. 2013. V. 15. P. 2154–2161.

41. Bussereau F., Casaregola S., Lafay J.-F., Bolotin-Fukuhara M. The *Kluyveromyces lactis* repertoire of transcriptional regulators // FEMS Yeast Research. 2006. V. 6. P. 325–335.
42. Cai J., Roberts I.N., Collins M.D. Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small subunit rDNA gene sequences // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. № 2. P. 542–549.
43. Campbell I. Numerical analysis of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* // J. Gen. Microbiol. 1972. V. 73. P. 279–301.
44. Castro R.C.A., Roberto I.C. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. V. 172. P. 1553–1564.
45. Chandra R., Castillo-Zacarias C., Delgado P., Parra Saldívar R. A biorefinery approach for dairy wastewater treatment and product recovery towards establishing a biorefinery complexity index // J. Clean. Prod. 2018. V. 183. P. 1184–1196.
46. Charlton S., Ramsøe A., Collins M., Craig O.E., Fischer R., Alexander M., Speller C.F. New insights into Neolithic milk consumption through proteomic analysis of dental calculus // Archaeol. Anthropol. Sci. 2019. V. 11. P. 6183–6196.
47. Chen S.Y. Sur une nouvelle technique de croisement des levures // Comptes rendus hebdomadaire des seances de l'Academie des sciences. 1950. V. 230. P. 1897–1899.
48. Cottrell M., Kock J. L. F., Lategan P. M., Botes P. J., Britz, T. J. The value of long-chain fatty acid composition in the taxonomy of species representing the genus *Kluyveromyces* // Syst Appl Microbiol. 1987. V. 9. P. 277–279.
49. Curry A. Archaeology: The milk revolution // Nature. 2013. V. 500. № 7460. P. 20–22.

50. Daniel H.-M., Sorrel T.C., Meyer W. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. P. 1593–1606.
51. Daniel H.-M., Meyer W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts // *Int. J. Food Microbiol.* 2003. V. 86. № 1–2. P. 61–78.
52. de Albuquerque T.L., de Sousa M., Gomes Silva N.C., Girao Neto C.A.C., Gonçalves L.R.B., Fernandez-Lafuente R., Rocha M.V.P. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization and applications // *A review International Journal of Biological Macromolecules.* 2021. V. 191. P. 881–898.
53. Dickson R.C. Markin J.S. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis* // *J. Bacteriol.* 1980. V. 142. P. 777–785.
54. Dickson R.C., Barr K. Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis* // *J Bacteriol.* 1983. V. 154. P. 1245–1251.
55. Dickson R.C., Riley M.I. The lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis* / *Yeast Genetic Engineering.* Boston: Butterworth Publ. 1989. 19–40 pp.
56. Dombrowski W. Die Hefen in Milch und Milchprodukten // *Centr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II.* 1910. V. 28. P. 345–403.
57. Edgar R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity // *BMC Bioinformatics.* 2004. V. 5. P. 113.
58. Fabre C.E., Duviau V.J., Blanc P.J., Goma G. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus* // *Biotechnology Letters.* 1995. V. 17. P. 1207–1212.
59. Fairhead C., Dujon B. Structure of *Kluyveromyces lactis* subtelomeres: duplications and gene content // *FEMS Yeast Research.* 2006. V. 6. P. 428–441.
60. Fairhead C., Dujon B. Structure of *Kluyveromyces lactis* subtelomeres: duplications and gene content // *FEMS Yeast Research.* 2006 V. 6. № 3. P. 428–441.

61. Fell J.W. A new species of *Saccharomyces* isolated from a subtropical estuary // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1961. V. 27. № 1. P. 27–30.
62. Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008. V. 79. № 3. P. 339–354.
63. Freitas L.F.D., Batista T.M., Santos A.R.O., Hilário H.O., Moreira R.G., Franco G.R., Morais P.B., Lachance M.-A., Rosa C.A. Yeast communities associated with cacti in Brazil and the description of *Kluyveromyces starmeri* sp. nov. based on phylogenomic analyses // *Yeast*. 2020. P. 1–13.
64. Friedrich A., Gounot J.-S., Tsouris A., Bleykasten C., Freil K., Caradec C., Schacherer J. Contrasting Genomic Evolution Between Domesticated and Wild *Kluyveromyces lactis* Yeast Populations // *Genome Biol. Evol.* 2023. V. 15. № 2. evad004.
65. Fuson G.B., Presley H.L., Phaff H.J. Deoxyribonucleic acid base sequence relatedness among members of the yeast genus *Kluyveromyces* // *Int J Syst Bacteriol*. 1987. V. 37. P. 371–379.
66. Godecke A., Zachariae W., Arvanitidis A., Breunig K.D. 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 // *Nucleic Acids Research*. 1991. V. 19. № 19. P. 5351–5358.
67. Gonz'alez-Catano F., Tovar-Castro L., Casta E., Regalado-Gonzalez C., Garc B., Amaya-Llano S. Improvement of covalent immobilization procedure of β galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for galactooligosaccharides production: Modeling and kinetic study // *Biotechnol. Prog.* 2017. V. 33. № 6. P. 1568–1578.
68. Goshima T., Tsuji M., Inoue H., Yano S., Hoshino T., Matsushika A. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013. V. 77. P. 1505–1010.
69. Guerrero C., Vera C., Conejeros R., Illanes A. Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the

- synthesis of prebiotic carbohydrates // *Enzym. Microb. Technol.* 2015. V. 70. P. 9–17.
70. Guilliermond F., Negroni P. Sur la presence d'une copulation heterogamique dans le *Saccharomyces marxianus* // *Compt. Rend. Soc. Biol.* 1929. V.101. P.565–566.
71. Hang Y.D., Woodams E.E., Hang L.E. Utilization of corn silage juice by *Klyuveromyces marxianus* // *Bioresour Technol.* 2003. V. 86. № 3. P. 305–307.
72. Hansen E.C. Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. VII. Action des ferments alcooliques sur les diverses especes de sucre // *Compte-Rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg.* 1888. V. 2. P. 143–167.
73. Hendy J., Colonese A.C., Franz I., Fernandes R., Fischer R., Orton D., Lucquin A., Spindler L., Anvari J., Stroud E., Biehl P.F., Speller C., Boivin N., Mackie M., Jersie-Christensen R.R., Olsen J.V., Collins M.J., Craig O.E., Rosenstock E. Ancient proteins from ceramic vessels at Çatalhöyük West reveal the hidden cuisine of early farmers // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 4064.
74. Herman A., Halvorson H. Identification of the structural gene for beta-glucosidase in *Saccharomyces lactis* // *J. Bacteriol.* 1963. V. 85. P. 895–900.
75. Heyman M.B. Committee on Nutrition. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents // *Pediatrics.* 2006. V. 118. P. 1279–1286.
76. Hohmann S. A region in the yeast genome, which favours multiple integration of DNA via homologous recombination // *Curr. Genet.* 1987. V. 12. P. 519–526.
77. Husain Q. β -Galactosidases and their potential applications: a review // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010. V. 30. P. 41–62.
78. Hussein L., Elsayed S., Foda S. Reduction of lactose in milk by purified lactase produced by *Klyuveromyces lactis* // *J. Food Prot.* 1989. V. 52. P. 30–34.
79. Iannotti L., Muehlhoff E., McMahon D. Review of milk and dairy programmes affecting nutrition // *J. Dev. Effect.* 2013. V. 5. № 1. P. 82–115.
80. Jacob F., Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins // *J. Mol. Biol.* 1961. P. 318–356.

81. Jacob F., Perrin D., Sanchez C., Monod J. L'operon: Groupe de genes a l'expression coordonnee par un operateur // C. R. Acad. Sci. 1960. V. 245. P.1727–729.
82. James S.A., Cai J., Roberts I.N., Collins M.D. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. V. 47. P. 453–460.
83. James T.Y., Kauff F., Schoch C., Matheny P.B. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny // Nature. 2006. V. 443. P. 818–822.
84. Johannsen E. Hybridization studies within the genus *Kluyveromyces* van der Walt emend, van der Walt. Ph. D // Thesis. V. I and II. Rhodes University, Grahamstown, South Africa. 1978.
85. Johannsen E., van der Walt J.P. Interfertility as basis for the delimitation of *Kluyveromyces marxianus* // Arch. microbiol. 1978. V. 118. P. 45–48.
86. Johannsen E. Hybridization studies within the genus *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt // Antonie van Leeuwenhoek. 1980. V. 46. P. 177–189.
87. Jorgensen A. Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie // 5te Auflage. Parey, Berlin. 1909.
88. Khabarova Y., Tornianen S., Tuomisto S., Järvelä I., Karhunen P., Isokoski M., Mattila K. Lactase non-persistent genotype influences milk consumption and gastrointestinal symptoms in Northern Russians // BMC Gastroenterology. 2011. V. 11. P. 124.
89. Kudrjawzew W.I. Die systematic der Hefen / B.: Academic verlag. Berlin. 1960. P. 275–2761.
90. Kula J.T., Tegege D. Chemical composition and medicinal values of camel milk // Int. J. Res. Stud. Biosci. 2016. V. 4. № 4. P. 13–25.

91. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
92. Kumura H., Tanoue Y., Tsukahara M., Tanaka T., Shimazaki K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications // *J. Dairy Sci.* 2004. 87. P. 4050–4056.
93. Kumura H., Tanoue Y., Tsukahara M., Tanaka T., Shimazaki K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications // *J. Dairy Sci.* 2004. 87. P. 4050–4056.
94. Kurtzman C.P., Phaff H.J., Meyer S.A. Nucleic acid relatedness among yeasts / In J. F. T. Spencer, D. M. Spencer, and A. R. W. Smith (ed.) *Yeast genetics: fundamental and applied aspects*. Springer-Verlag, New York. 1983. P. 139–166.
95. Kurtzman C.P., Lachance M.-A., Nguyen H.-V., Prillinger H. Proposal to conserve *Kluyveromyces* with a conserved type (Ascomycota: *Hemiascomycetes*, *Saccharomycetaceae*) // *Taxon*. 2001. V. 50. P. 907908.
96. 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 *Zygorulospora* // *FEMS Yeast Research*. 2003. V. 4. P. 233–245.
97. Kurtzman C.P., Robnett C.J. Phylogenetic relationships among yeasts of the "Saccharomyces complex" determined from multigene sequence analyses // *FEMS Yeast Res.* 2003. V. 3. P. 417–432.
98. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Robert V. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts / In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. and Boekhout, T., Eds., *The Yeasts*, 5th Edition, Elsevier, Amsterdam. 2011. P. 87–110.
99. Kurtzman C.P., Robnett C.J., Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts from Analysis of Nuclear Large Subunit (25S) Ribosomal DNA Partial Sequences // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998. V. 73. P. 331–371.

100. Lachance M., Kurtzman C.P., Fell J.W. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt / In: The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th ed. // Amsterdam. Elsevier Science. 1998. 227–247 pp.
101. Lachance M. Current status of *Kluyveromyces* systematic // FEMS Yeast Res. 2007. V. 7. P. 642–645.
102. 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.
103. Lacy L.R., Dickson R.C. Transcriptional Regulation of the *Kluyveromyces lactis* β -Galactosidase Gene // Mol Cell Biol. 1981. V. 1. № 7. P. 629–634.
104. Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., Arrizón-Gaviño J., Herrera-Suárez T., García-Mendoza A., Gschaedler-Mathis A. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages // FEMS Yeast Res. 2008. V. 8. № 7. P. 1037–1052.
105. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets // Bioinformatics. 2014. V. 30. № 22. P. 3276–3278.
106. Larson G., Fuller D.Q. The evolution of animal domestication // Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2014. V. 45. P. 115–136.
107. Lee M.F., Krasinski S.D. Human adult-onset lactase decline: an update // Nutr. Rev. 1998. V. 56. P. 1–8.
108. Lehmann P.F., Lemon M.B., Ferencak W.J. Antifungal compounds (“killer factors”) produced by *Kluyveromyces* species and their defection on an improved medium containing glycerol // Mycologia. 1987. V. 79. № 5. P. 790–794.
109. Lehmann P. F., Kahzan U., Wu L.-C., Wickes B. L., KwonChung K. J. Karyotype and isoenzyme profiles do not correlate in *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* // Mycol Res. 1992. V. 96. P. 637–642.
110. Limtong S., Sringiew C., Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* // Bioresour Technol. 2007. V. 98. P. 3367–3374.

111. Lodder J., Kreger-van Rij N.J.W. The Yeasts. A Taxonomic Study / North-Holland: Amsterdam. 1952. 713 pp.
112. Lodder J. (ed.) The Yeasts, a Taxonomic Study / 2nd revised and enlarged edition // North-Holland Publ. Company. Delft. The Netherlands. 1970. 1385 p.
113. Lomer M.C., Parkes G.C., Sanderson J.D. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities // *Aliment Pharmacol Ther.* 2008. V. 27. P. 93–103.
114. Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications // *Biotechniques.* 2011. V. 50. P. 325–8.
115. Maccaferri S., Klinder A., Brigidi P., Cavina P., Costabile A. 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 // *Appl Environ Microbiol.* 2012. V. 78. № 4. P. 956–964.
116. Martini A., Phaff H.J., Douglass S.A. Deoxyribonucleic Acid Base Composition of Species in the Yeast Genus *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt // *Journal of bacteriology.* 1972. V. 111. № 2. P. 481–487.
117. Mayr E. Systematics and the Origin of Species / Columbia University Press, New York. 1942.
118. McClure S.B., Magill C., Podrug E., Moore A.M.T., Harper T.K., Culleton B.J., Kennett D.J., Freeman K.H. Fatty acid specific $\delta^{13}\text{C}$ values reveal earliest Mediterranean cheese production 7,200 years ago // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 9. e0202807.
119. Molina E., Shen P., Jong S. Determination of intraspecific relationships in *Kluyveromyces marxianus* by riboprinting // *Mycotaxon.* 1992. V. 43. P. 49–60.
120. Molina F.I., Seng P., Jong S.C. Determination of infraspecific relationships in *Kluyveromyces marxianus* by riboprinting // *Mycotaxon.* 1992. V. 43. P. 9–60.
121. Molnar O., Prillinger H., Lopandic K., Weigang F., Staudacher E. Analysis of coenzyme Q systems, monosaccharide patterns of purified cell walls, and RAPD-

- PCR patterns in the genus *Kluyveromyces* // Antonie Leeuwenhoek. 1996. V. 70. P. 67–78.
122. Morrissey J. P., Etschmann M. M., Schrader J., de Billerbeck, G. M. Cell Factory Applications of the Yeast *Kluyveromyces marxianus* for the Biotechnological Production of Natural Flavour and Fragrance Molecules // Yeast. 2015. V. 32. № 1. P. 3–16.
123. Nadson G. A., Krassilnikov N. A. Un nouveau genre d'Endomycetacees: *Guilliermondella* // Compt. Rend. 1928. V. 187. P. 307–309.
124. Nagahama T., Hamamoto M., Nakase T., Horikoshi K. *Kluyveromyces nonfermentans* sp. nov, a new yeast species isolated from the deep-sea // Int J Syst Bacteriol. 1999. V. 49. P. 1899–1905.
125. Naumov G.I., Naumova E.S. Five new combinations in the yeast genus *Zygothorax* Kudriavzev emend. G. Naumov (pro parte *Kluyveromyces*) based on genetic data // FEMS Yeast Research. 2002. V. 2. P. 39–46.
126. Naumova E.S., Sukhotina N.N., Naumov G.I. Molekular-genetic differentiation on the dairy yeast *Kluyveromyces lactis* and its closest wild relatives // FEMS Yeast Research. 2004. V. 5. P. 263–269.
127. Nguyen H.V., Pulvirenti A., Gaillardin C. Rapid differentiation of 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 // Can. J. Microbiol. 2000. V. 12. P. 1115–1122.
128. Nogales J.M.R., Lopez A.D. A novel approach to develop β -galactosidase entrapped in liposomes in order to prevent an immediate hydrolysis of lactose in milk // Int. Dairy J. 2006. V. 16. P. 354–360.
129. Nonklang S., Abdel-Banat B.M.A., Cha-aim K., Moonjai N., Hoshida H., Limtong S., Yamada M., Akada R. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3–1042 // Appl Environ Microbiol. 2008. V. 74. P. 7514–7521.
130. Novak E.K., Zolt J. A new system proposed for yeasts // Acta Botan. Acad. Sci. Hung. 1961. V. 7. P. 93–145.

131. Oliveira C., Guimaraes P.M., Domingues L. Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29. P. 600–609.
132. Orlando L. Late bronze age cultural origins of dairy pastoralism in Mongolia // *PNAS.* 2018. V. 115. № 48. P. 12083–12085.
133. Osbourn A.E., Field B. Operons // *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2009. V. 66. P. 3755–3775.
134. Padilla B., Frau F., Ruiz-Matute A. I., Montilla A., Belloch C., Manzanares P. Production of Lactulose Oligosaccharides by Isomerisation of Transgalactosylated Cheese Whey Permeate Obtained by β -galactosidases from Dairy *Kluyveromyces* // *J. Dairy Res.* 2015. V. 82. № 3. P. 356–364.
135. Panesar P.S., Kumari S., Panesar R. Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries // *Enzyme Research.* 2010. V. 2010. P. 473137.
136. Phaff H.J., Miller M.W., Shifrine M. The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1956. V. 22. P. 117–130.
137. Pomper S., Burkholder P.R. Studies in the biochemical genetics of yeast // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1949. V. 35. P. 456–464.
138. Poncet S., Fiol J.-B. Taxonomy of *Kluyveromyces*: evaluation of DNA base composition // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1972. V. 38. P. 145–152.
139. Prazeres A.R., Carvalho F., Rivas J. Cheese whey management: a review // *J Environ Manag.* 2012. V. 110. P. 48–68.
140. Rajoka M.I., Khan S., Shahid R. Kinetics and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates // *Food Technol Biotechnol.* 2003. V. 41. P. 315–320.
141. Roberts C.J., van Der Walt J.P. The life cycle of *Kluyveromyces polysporus* // *Compt. Rend. Lab. Carlsberg.* 1959. V. 31. P. 129–148.
142. Rodicio R., Heinisch J.J. Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis* // *Yeast.* 2013. V. 30. P. 165–177.

143. Rolland T., Dujon B. Yeasty clocks: dating genomic changes in yeasts // *C. R. Biol.* 2011. V. 334. P. 620–628.
144. Salmeron J.M., Johnston S.A. Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene *LAC9* reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL4* gene // *Nucleic Acids Res.* 1986. V. 14. P. 7767–7781.
145. Salque M., Bogucki P.I., Pyzel J., Sobkowiak-Tabaka I., Grygiel R., Szmyt M., Evershed R.P. Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe // *Nature.* 2013. V. 493. P. 522–525.
146. Sampaio F.C., de Faria J.T., da Silva M.F., de Souza Oliveira R. P., Converti A. Cheese whey permeate fermentation by *Kluyveromyces lactis*: a combined approach to wastewater treatment and bioethanol production // *Environ. Technol.* 2020. V. 41. № 24. P. 3210–3218.
147. Sampaio F.C., Saraiva T.L.C., Silva G.D.L., Faria J.T., Pitangui C.G., Aliakbarian B., Perego P., Converti A. Batch growth of *Kluyveromyces lactis* cells from deproteinized whey: response surface methodology versus artificial neural network – genetic algorithm approach // *Biochem. Eng. J.* 2016. V. 109. P. 305–311.
148. Sampaio F.C., de Faria J. T., da Silva M. F., de Souza Oliveira R.P., Converti A. Cheese whey permeate fermentation by *Kluyveromyces lactis*: a combined approach to wastewater treatment and bioethanol production // *Environ. Technol.* 2020. V. 41. № 24. P. 3210–3218.
149. Scharpf L.G., Seitz E.W., Morris J.A., Farbood M.I. Generation of flavor and odor compounds through fermentation processes / In: Parliament T.H., Croteau R. (eds) // *Biogenesis of aroma*, American Chemical Society, Washington, DC. 1986. V. 317. P. 323–346.
150. Sceda R., Yarrow D. Variation in the Fermentative Pattern of some *Saccharomyces species* // *Arch. Mikrobiol.* 1968. V. 61. № 3. P. 310–6.
151. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a

- universal DNA barcode marker for Fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 6241–6246.
152. Schwan R.F., Cooper R.M., Wheals A.E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulpdegrading yeasts // Enzyme Microb. Technol. 1997. V. 21. P. 234–324.
153. Scrimshaw N.S., Murray E.B. Lactose content of milk and milk products // Am. J. Clin. Nutr. 1998. V. 48. P. 1099–1104.
154. Ségurel L., Bon C. On the Evolution of Lactase Persistence in Humans // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2017. V. 31. № 18. P. 297–319.
155. Shehata A.M.T., Mrak E.M., Phaff. H.J. Yeasts isolated from *Drosophila* and their suspected feeding places in Southern and Central California // Mycologia. 1955. V. 47. P. 799–881.
156. Shehata A.M.T., Mrak E.M., Phaff. H.J. Yeasts isolated from *Drosophila* and their suspected feeding places in Southern and Central California // Mycologia. 1955. V. 47. P. 799–881.
157. Shen P., Jong S.C, Molina F.I. Analysis of ribosomal DNA restriction patterns in the genus *Kluyveromyces* // Antonie van Leeuwenhoek. 1994. V. 65. P. 99–105.
158. Sidenberg D.G., Lachance M-A. Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* population and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt // International Journal of Systematic Bacteriology. 1986. V. 36. P. 94–102.
159. Soares C.A.G., Maury M., Pagnocca F.C., Araujo F.V., Mendonça Hagler L.C., Hagler A.N. Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries // J. Gen. Appl. Microbiol. 1997. V. 43. P. 265–272.
160. Sor F., Fukuhara H. Analysis of Chromosomal DNA Patterns of the Genus *Kluyveromyces* // Yeast. 1989. V. 5. P. 1–10.
161. Spohner S.C., Schaum V., Quitmann H., Czermak P. *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology // J. Biotechnol. 2016. V. 222. P. 104–116.

162. Storhaug C.L., Fosse S.K., Fadnes L.T. Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis // *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2017. № 2. P. 738–746.
163. Sugita T., Nishikawa A., Ikeda R., Shinoda T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification // *J. Clin. Microbiol.* 1999. V. 37. P. 1985–1993.
164. Sukhotina N.N., Naumova E.S., Naumov G.I. Molecular Polymorphism of the Yeast *Kluyveromyces dobzhanskii*: Geographic Populations // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2006. V. 409. P. 236–240.
165. van der Walt J.P. *Kluyveromyces* – a new yeast genus of the *Endomycetales* // *Ant. van Leeuwenhoek.* 1956a. V. 22. P. 265–272.
166. van der Walt J.P. The yeast *Kluyveromyces africanus* nov. spec. and its phylogenetic significance // *Ant. van Leeuwenhoek.* 1956b. V. 22. P. 321–326.
167. van der Walt J.P. The Emendation of the genus *Kluyveromyces* v. d. Walt // *Ant. van Leeuwenhoek.* 1965. V. 31. P. 341–348.
168. van der Walt J. P. *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt / In J. Lodder (ed.) *The yeasts-a taxonomic study* // North Holland Publishing Co., Amsterdam. 1970. P. 316–378.
169. van der Walt J.P., Johannsen E. A comparison of interfertility and in vitro DNA-DNA reassociation as criteria for speciation in the genus *Kluyveromyces* // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1979. V. 45. P. 281–291.
170. van der Walt J.P., Johannsen E. *Kluyveromyces* van der Walt emend, van der Walt / In: *The yeasts: A taxonomic study* (Kreger-van Rij N.J.W. ed.) // Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.Y. 1984. P. 224–251.
171. van Ooyen A.J., Dekker P., Huang M., Olsthoorn M.M., Jacobs D.I., Colussi P.A., Taron C.H. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis* // *FEMS Yeast Research.* 2006. V. 6. № 3. P. 381–92.
172. Varela J.A., Montini N., Scully D., Van der Ploeg R., Oreb M., Boles E., Hirota J., Akada R., Hoshida H., Morrissey J.P. Polymorphisms in the *LAC12* gene

- explain lactose utilisation variability in *Kluyveromyces marxianus* strains // FEMS Yeast Research. 2017. V. 17. № 3.
173. Varela J.A., Puricelli M., Ortiz-Merino R.A., Giacomobono R., Braun-Galleani S., Wolfe K. H., Morrissey J.P. Origin of lactose fermentation in *Kluyveromyces lactis* by interspecies transfer of a neofunctionalized gene cluster during domestication // Current Biology. 2019. V. 29. P. 4284–4290.
174. Vaughan-Martini A., Martini A. Taxonomic revision of the yeast genus *Kluyveromyces* by nuclear deoxyribonucleic acid reassociation // Int J Syst Bacteriol. 1987. V. 37. P. 380–385.
175. Vaughan-Martini A., Rosini G. Killer Relationships within the Yeast Genus *Kluyveromyces* // Mycologia. 1989. V. 81. № 2. P. 317–321.
176. Vera C., Illanes A. Lactose-derived nondigestible oligosaccharides and other high added-value products / In: Illanes A., Conejeros R., Scott F., Guerrero C., Vera C., Wilson L., editors. Lactosederived prebiotics: a process perspective // New York: Elsevier. 2016. P. 87–110.
177. Vera C., Guerrero C., Aburto C., Cordova A., Illanes A. Conventional and nonconventional applications of β -galactosidases // Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom. 2020. V. 1868. P. 140271.
178. Verdugo Valdez A., Segura Garcia L., Kirchmayr M., Ramírez Rodríguez P., González Esquinca A., Coria R. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana* // Antonie Van Leeuwenhoek. 2011. V. 100. P. 497–506.
179. Vigne J.D. Early domestication and farming: what should we know or do for a better understanding? // Anthropozoologica. 2015. V. 50. 123–150.
180. Vinuselvi P., Kim M.K., Lee S.K., Ghim C.M. Rewiring carbon catabolite repression for microbial cell factory // BMB Rep. 2012. V. 45. № 2. P. 59–70.
181. Vu D., Groenewald M., Szöke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkleij G.J.M., Crous P.W., Boekhout T., Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation // Stud. Mycol. 2016. V. 85. P. 91–105.

182. Webster T.D., Dickson R.C. The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis* // Nucleic Acids Res. 1988. V. 16. P. 8011–8028.
183. Welsh F.W., Murray W.D., Williams R.E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals // Crit. Rev. Biotechnol. 1989. V. 9. P. 105–169.
184. Wesolowski-Louvel M., Fukuhara H. A map of the *Kluyveromyces lactis* genome // Yeast. 1995. V. 11. P. 211–218.
185. White T.J., Bruns T., Lee E., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. New York. Academic Press. 1990. P. 315–322.
186. Wickerham L. J. Taxonomy of yeasts // United States Department of Agriculture, Technical Bulletin. 1951. № 1029. P. 1–56.
187. Wickerham L. J. New materials and procedures for genetic studies of yeasts // Nature. 1955. V. 176. P. 22.
188. Wickerham L.J., Burton, K. A. Hybridization studies involving *Saccharomyces lactis* and *Zygosaccharomyces ashbyi* // J. Bacteriol. 1956a. V. 71. P. 290–295.
189. Wickerham L.J., Burton K.A. Hybridization studies involving *Saccharomyces fragilis* and *Zygosaccharomyces dozhanskii* // J. Bacteriol. 1956b. V. 71. P. 296–302.
190. Wilkin S., Ventresca Miller A., Taylor W.T.T., Miller B.K., Hagan R.W., Bleasdale M., Scott A., Gankhuyg S., Ramsøe A., Uliziibayar S., Trachsel C., Nanni P., Grossmann J., Orlando L., Horton M., Stockhammer P.W., Myagmar E., Boivin N., Warinner C., Hendy J. Dairy pastoralism sustained eastern Eurasian steppe populations for 5,000 years // Nat. Ecol. Evol. 2020. V. 4. № 3. P. 346–355.
191. Winge O., Lautsen O. On 14 new yeast types produced by hybridization // C. R. Lab. Carlsberg. 1939. V. 22. P. 337–352.
192. Wittmann C., Hans M., Bluemke W. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus* // Yeast. 2002. V. 19. P. 1351–1363.

193. Yarrow D., Nakase T. DNA base composition of species of the genus *Saccharomyces* // *Antonie van Leeuwenhoek*. 1975. V.41. P. 81–88.
194. Zenke F.T., Engles R., Vollenbroich V., Meyer J., Hollenberg C.P., Breunig K. D. Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p // *Science*. 1996. V. 272. P. 1662–1665.
195. <https://www.yeastgenome.org>.
196. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
197. <https://www.ormbunkar.se/aliview/>