

УДК 579.66

## Разработка экспресс-метода идентификации промышленно ценных дрожжей

© 2017 Л.Н. БОРЩЕВСКАЯ\*, Т.Л. ГОРДЕЕВА, А.Н. КАЛИНИНА, С.П. СИНЕОКИЙ

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Национального исследовательского центра «Курчатовский Институт» (НИЦ «Курчатовский Институт» – ГосНИИГенетика), Москва, 117545

e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru\*

Поступила 27.10.2017 г.

Принята в печать 01.12.2017 г.

Предложен метод быстрой таксономической идентификации пяти промышленно ценных групп дрожжей – *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluyveromyces lactis* – с использованием в ПЦР специфичных праймеров, подобранных на основании нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих рибосомную РНК. Эффективность метода показана для идентификации как чистых культур, так и компонентов смеси коллекционных штаммов дрожжей; тем самым продемонстрирована потенциальная возможность использования данного метода для выявления исследуемых дрожжей в микробных биопрепаратах, на стадиях конструирования штаммов-продуцентов и для контроля контаминации дрожжевых культур при промышленных ферментациях.

*Ключевые слова:* дрожжи, идентификация, специфичные праймеры.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-6-42-48

Дрожжи широко используются в биотехнологии как основа для создания продуцентов разнообразных промышленно ценных веществ, в том числе ферментов, органических кислот, полисахаридов, спиртов и витаминов. Рекомбинантные штаммы дрожжей наиболее часто применяются в качестве клеток-хозяев при промышленной продукции гетерологичных белков. Использование дрожжевых систем позволяет получать высокий выход целевого продукта. Дрожжи, в отличие от бактериальных хозяев, более устойчивы к низким значениям pH, высоким концентрациям сахара и этанола и повышенному осмотическому давлению, что делает их пригодными для промышленной ферментации [1]. Кроме того, клетки дрожжей обладают способностью к посттрансляционным модификациям белков и их выделению в среду, что резко снижает себестоимость производства [2].

Наиболее часто в промышленности используют такие виды дрожжей, как *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*) [3], *Saccharomyces cerevisiae* [4], *Kluyveromyces lactis* [5], *Schizosaccharomyces pombe* [6] и *Yarrowia lipolytica* [7]. При широком промышленном использовании этих ви-

дов дрожжей актуальными являются вопросы простых и надежных методов их идентификации и контроля контаминации дрожжевых культур.

Дрожжи классифицируются на основе их морфологических, физиологических и биохимических свойств [8, 9]. Традиционные способы идентификации дрожжей требуют большого опыта в проведении до 90 морфологических и физиологических тестов; эти анализы трудоемки, отнимают много времени и могут привести к неверному результату [10].

Развитие методологии молекулярной генетики открывает широкие возможности для совершенствования методов идентификации различных видов дрожжей на основании различий в первичной структуре ДНК. Так, ранее были опубликованы работы по видовой классификации дрожжей на основе анализа полиморфных участков ITS2 их хромосом [11].

Исследование ITS-области ДНК явилось базой для разработки метода идентификации *Yarrowia lipolytica* и *Candida zeylanoides* [12]; метод включал амплификацию ITS-области, последующую рестрикцию полученных фрагментов и их анализ путем разделения в агарозном геле.

*Список сокращений:* пн – пар нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Для идентификации *Yarrowia lipolytica* был разработан метод, основанный на исследовании области ITS1-5.8S, rDNA-ITS2 и 18S rDNA и секвенировании домена D1/D2 и региона 26S rDNA [13]. Описан метод идентификации *Saccharomyces cerevisiae*, заключающийся в подборе праймеров, специфичных для ITS1-области ДНК данного вида дрожжей [14]. Идентификация *Saccharomyces cerevisiae* может также проводиться с использованием метода амплификации локусов SC8132X, YOR267C и SCPTS7 с последующим разделением их в агарозном геле [15], а также на основе различий в рестрикции областей REP и ERIC [16], однако этот путь долог и трудоемок.

Фирма Norgen разработала набор для быстрой идентификации *Saccharomyces cerevisiae*. Однако этот метод применим только в отношении данного вида, требует отрицательного и положительного контроля и, как пишет производитель, не является абсолютно надежным [17].

Таким образом, разработка простого и надежного метода таксономической идентификации промышленно ценных дрожжей, не требующего применения таких сложных процедур, как секвенирование и клонирование, является актуальной задачей.

Целью данного исследования была разработка экспресс-метода таксономической идентификации пяти промышленно ценных групп дрожжей, в состав которых входят *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluyveromyces lactis*, которые используются в промышленных процессах получения различных органических кислот и ферментов.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы дрожжей

Штаммы, использованные в работе, приведены в табл. 1.

### Использованные штаммы дрожжей

#### Yeast used in the work

Вид	Номер штамма в коллекциях
<i>Pichia pastoris</i>	ВКПМ Y-2837; NRRL Y-1581; ВКПМ Y-3921
<i>Yarrowia lipolytica</i>	ВКПМ Y-1557; ATCC 8662; ВКПМ Y-2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ВКПМ Y-3298; ATCC 16979 (типовой штамм); КПМ Y-799
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ВКПМ Y-3251; ATCC 18824; DSMZ 70443 (типовой штамм); ВКПМ Y-1123
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ВКПМ Y-1174; ATCC 8585; DSMZ 70799; ВКПМ Y-2128
<i>Debaryomyces hansenii</i> (отрицательный контроль)	ВКПМ Y-1007; ВКМ Y-112

### Условия культивирования

Дрожжи выращивали на среде YPD (15 г триптона, 10 г дрожжевого экстракта, 20 г агара, 20 г глюкозы на 1 л) (производитель компонентов среды – «Диа-М», Россия) при температуре 30 °С и аэрации (250 об/мин) в течении 48 ч. Совместное культивирование дрожжевых штаммов проводили в жидкой среде YPD в течении 24 ч с аэрацией при температуре 30 °С.

### Выделение хромосомной ДНК

Хромосомную ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов «ДНК-экспресс» («Синтол», Россия).

### Проведение полимеразной цепной реакции

ПЦР проводили по стандартной методике [18] с использованием праймеров, приведенных в табл. 2.

Электрофоретическое разделение амплификатов осуществляли методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле при напряжении 5 В/см<sup>3</sup> в течение 30 мин («ДНК технология», Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выявление генов-мишеней для молекулярной идентификации индустриально ценных видов дрожжей

В работе использовали чистые культуры штаммов коллекции ВКПМ (см. табл. 1).

Главным критерием при выборе мишени выступала ее первичная структура. Нуклеотидный состав маркерного гена должен обеспечивать достоверное различие всех пяти видов дрожжей, участвующих в исследовании. В качестве мишени были выбраны гены, кодирующие рибосомную РНК (рДНК).

Таблица 1

## Праймеры для ПЦР, условия и результаты реакции

## Primers for PCR, reaction conditions and results

Микроорганизм	Последовательность праймеров	Температура отжига, °С	Размер амплификата, пн
<i>Pichia pastoris</i>	pich-1 CTATCCCCAGCACGACGG pich-2 TTA AAAAGCTCGTAGTTGAACG	57	790
<i>Yarrowia lipolytica</i>	lip-1 GTAGTTGAAATTGGGCGGGCT lip-2 CATACTCCCCCAGAACCTGAT	60	420
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	pom-1 ATCAGCCATTTTGGCTGATCATT pom-2 CGCCGTTGCCAGCAGAAA	57	377
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	cer-1 GATTTTTTCGTGTA CTGGA cer-2 CGATAGTCCCTCTAAGAAGT	50	735
<i>Kluyveromyces lactis</i>	KI-1 CGGTAATTCAGCTCCAG KI-2 CCGATAGTCCCTCTAAGAAGA	50	819

Молекулы рДНК обнаружены у всех клеточных форм жизни, что указывает на их древнейшее происхождение. В отличие от более подверженных мутационной изменчивости генов, кодирующих различные белки, гены рДНК, относящиеся к категории информационных, высоко консервативны, что обусловлено огромной важностью рРНК как компонента системы биосинтеза белка в клетке. Горизонтальный перенос генов рДНК, по всей видимости, не сказывается на их дивергенции: предполагается, что эти гены практически не участвуют в горизонтальном переносе уже не менее 2 млрд. лет [19].

Таким образом, особенностью рДНК является нахождение вне сферы действия отбора; поэтому данные молекулы эволюционируют в результате спонтанных мутаций, происходящих с постоянной скоростью, и накопление таких мутаций зависит только от времени. Соответственно, рДНК могут отражать эволюционные расстояния между организмами, мерой которых служит количество нуклеотидных замен, делеций и инверсий в молекулах анализируемых рДНК.

Известен метод идентификации микроорганизмов на основе сравнения нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих этот тип РНК; данные последовательности используют в качестве универсального филогенетического маркера, позволяющего определять эволюционные расстояния [19]. Анализ сходства генов, кодирующих рРНК, пригоден для значительной части таксономических категорий, начиная с высших уровней (классы, семейства) и заканчивая низшими (роды и виды).

В рибосомах эукариот присутствуют рРНК трех типов, различающихся по молекулярной массе и коэффициенту седиментации. Информационная емкость крупных молекул больше, но их сложнее анализировать. Поэтому наиболее приемлемым оказался анализ молекул средней величины – 16S у прокариот и 18S у эукариот.

Нуклеотидная последовательность рРНК содержит как консервативные, так и вариабельные регионы, так называемые «горячие точки», содержащие большее число мутаций. Нуклеотидные последовательности этих изменчивых областей неодинаковы у представителей разных таксономических групп, что позволяет различать таксоны разных уровней и проводить статистически достоверные измерения филогенетических расстояний. Критерием отнесения микроорганизма к тому или иному виду считается гомология не менее 97% в структуре нуклеотидных последовательностей между данным микроорганизмом и представителем вида.

Таким образом, для успешной дифференциации исследуемых в данной работе видов дрожжей нуклеотидные последовательности их рибосомных генов должны быть гомологичны между собой менее чем на 97%.

В связи с этим было проведено выравнивание доступных в GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) как полных, так и частичных нуклеотидных последовательностей генов рРНК для всех пяти видов дрожжей. Данные о гомологии нуклеотидных последовательностей рДНК анализируемых видов представлены в табл. 3.

**Степень гомологии (%) нуклеотидных последовательностей генов рРНК референсных видов и исследуемых штаммов дрожжей**

**Homology (%) of nucleotide sequences of rRNA genes of yeast reference species and studied strains**

Референсный вид \ Исследуемый вид	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i>	<i>S. pombe</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>P. pastoris</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100,0	96,8	90,6	89,4	53,7
<i>Kluyveromyces lactis</i>	96,8	100,0	90,4	88,6	52,9
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	90,6	90,4	100,0	86,9	52,3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	89,4	88,6	86,9	100,0	52,8
<i>Pichia pastoris</i>	53,7	52,9	52,3	52,8	100,0

На основании полученных данных было построено филогенетическое дерево (рис. 1).

Из представленных данных табл. 3 и рис. 1 видно, что гомология нуклеотидных последовательностей генов рРНК исследуемых видов дрожжей составляет от 52,3% до 96,8%.

Такая степень гомологии позволяет использовать гены рРНК как потенциальную мишень для разделения исследуемых видов дрожжей последующего соответствующих праймеров.

**Подбор праймеров для идентификации дрожжевых штаммов**

С помощью программы ClustalW Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk>) было проведено множественное выравнивание и оценена гомология нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих рРНК исследуемых видов дрожжей. Анализ результатов выравнивания позволил выявить уникальные для каждого вида участки этих генов.

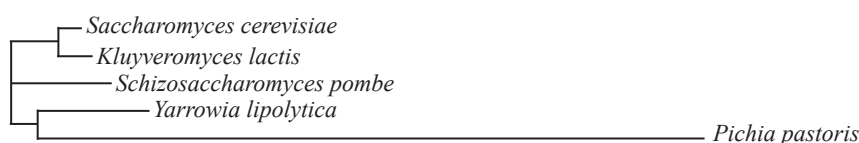
На основе уникальных последовательностей с использованием программы Oligos v. 9.0 были подобраны пары праймеров, которые могли быть использованы как специфичные для каждого исследуемого вида дрожжей (см. табл. 2).

Для каждой пары праймеров были подобраны такие условия проведения ПЦР, которые обеспечивали стабильность образования ампликонов ожидаемого размера, а также минимизировали возможность образования неспецифических фрагментов (см. табл. 2). Однако подобранные пары праймеров могут считаться видоспецифическими только для видов *S. pombe* и *Y. lipolytica*.

Праймеры, подобранные для *P. pastoris* (*Komagataella pastoris*) нельзя назвать видоспецифическими, так как их использование не позволяет выявить отличия этого вида от фенотипически и генетически близких к нему видов *Komagataella phaffii*, *K. populi*, *K. ulmi*, *K. pseudopastoris* и *K. kurtzmanii*. Гомология нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 18S РНК этих видов, составляет 99–100%. Поэтому данные праймеры мы можем считать специфичными лишь для группы видов *Pichia pastoris* (р. *Komagataella*).

Праймеры, использованные в работе с *Kluyveromyces lactis*, также специфичны в отношении родственного вида *K. marxianus*.

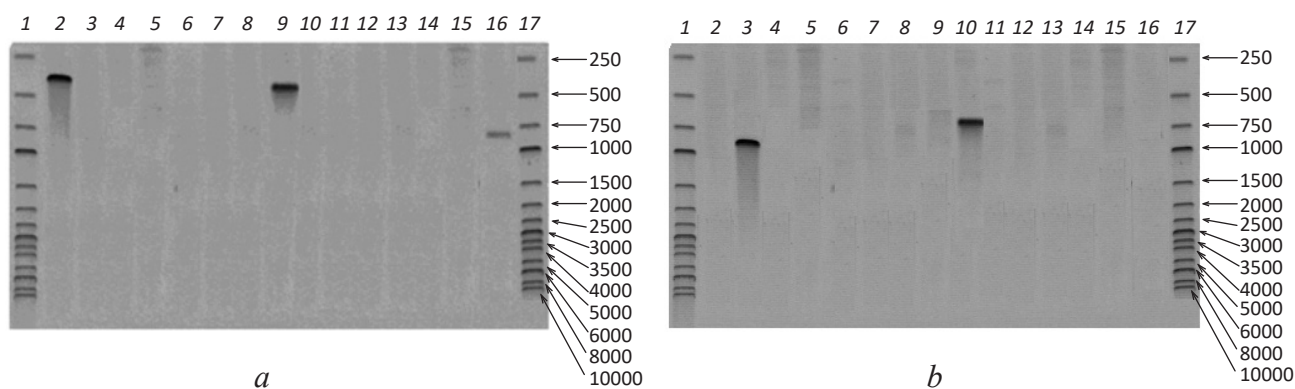
Группоспецифическими также можно назвать праймеры *Saccharomyces cerevisiae*, которые также не позволяют дифференцировать этот



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево исследуемых видов дрожжей, составленное на основе сравнения нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих рибосомную РНК

**Fig. 1.** Phylogenetic tree of studied yeast species built on the basis of comparison of rRNA-encoding genes nucleotide sequences





**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с использованием штаммов из коллекции ВКПМ. *a*): штамм Y-799 – дорожки 2–6; штамм Y-2 – дорожки 7–11; штамм Y-3921 – дорожки 12–16; *b*) штамм Y-2128 – дорожки 2–6; штамм Y-1123 – дорожки 7–11; штамм Y-1007 – дорожки 12–16; дорожки 1, 17 – маркеры молекулярной массы (1 kb DNA GeneRuler). Праймеры, дорожки: 2, 7, 12 – pom-1 и pom-2; 3, 8, 13 – Kl-1 и Kl-2; 4, 9, 14 – lip-1 и lip-2; 5, 10, 15 – cer-1 и cer-2; 6, 11, 16 – pich-1 и pich-2

**Fig. 2.** Electrophoresis of DNA amplification products using strains from VKPM Collection (*a*), lanes 2–6, strain Y-799; lanes 7–11, strain Y-2; lanes 12–16, strain Y-3921; (*b*), lanes 2–6, strain Y-2128; lanes 7–11, strain Y-1123; lanes 12–16, strain Y-1007; lanes 1, 17, MM markers of 1kb DNA GeneRuler. Primers, lanes: 2, 7, 12, pom-1 and pom-2; 3, 8, 13, Kl-1 and Kl-2; 4, 9, 14, lip-1 and lip-2; 5, 10, 15, cer-1 and cer-2; 6, 11, 16, pich-1 and pich-2

вид по нуклеотидной последовательности генов 18S РНК от идентичных ему видов *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii* и *S. mikatae*.

### Примеры использования разработанной методики для определения таксономической принадлежности штаммов дрожжей из коллекции ВКПМ

По разработанной методике была проведена идентификация штаммов ВКПМ Y-3921, Y-2, Y-799, Y-1123, Y-2128, и Y-1007. Хромосомная ДНК, выделенная из чистых культур анализируемых штаммов, была использована в качестве матрицы при проведении ПЦР с применением видоспецифических праймеров (рис. 2).

Данные на рис. 2, свидетельствуют о том, что:

– для штамма Y-799 положительный результат – наличие амплификата размером 377 пн – наблюдается при использовании праймеров pom-1 и pom-2, специфичных для *Schizosaccharomyces pombe*, в то время как амплификация с использованием остальных праймеров, специфичных для других четырех видов дрожжей, дает отрицательный результат. Таким образом, штамм Y-799 можно отнести к виду *S. pombe*;

– для штамма Y-2 наличие амплификата размером 420 пн наблюдается при использовании праймеров lip-1 и lip-2, специфичных для *Yarrowia lipolytica*; амплификация с использованием остальных праймеров, специфичных для других четырех видов дрожжей, дает отрицательный ре-

зультат. Таким образом, штамм Y-2 можно отнести к виду *Y. lipolytica*;

– для штамма Y-3921 присутствие амплификата размером 790 пн наблюдается при использовании праймеров pich-1 и pich-2, специфичных для группы *Pichia pastoris*, в то время как амплификация с использованием остальных праймеров, специфичных для других четырех видов дрожжей, дает отрицательный результат. Таким образом, штамм Y-3921 можно отнести к группе видов *P. pastoris*;

– для штамма Y-2128 положительный результат – амплификат размером 819 пн – наблюдается при использовании праймеров Kl-1 и Kl-2, специфичных для *Kluyveromyces lactis*; амплификация с использованием остальных праймеров, специфичных для других четырех видов дрожжей, дает отрицательный результат. Таким образом, штамм Y-2128 относится к *K. lactis* или *K. marxianus*;

– для штамма Y-1123 амплификат размером 735 пн наблюдается при использовании праймеров cer-1 и cer-2, специфичных для *Saccharomyces cerevisiae*, при отрицательном результате, полученном с применением остальных праймеров, специфичных для других четырех видов дрожжей. Таким образом, штамм Y-1123 можно отнести к группе видов *S. cerevisiae*;

– для штамма Y-1007 использование всех пяти пар праймеров дает отрицательный результат. Таким образом, штамм Y-1007 не принадлежит ни к одной из исследуемых таксономических групп дрожжей.

Итак, разработанные в ходе данного исследования ПЦР-системы могут быть использованы для быстрой идентификации чистых культур ряда индустриально значимых видов дрожжей.

### Примеры использования разработанной методики для определения таксономической принадлежности штаммов дрожжей в составе смешанных культур

Для проверки возможности детекции индустриально значимых видов дрожжей в составе микробных смесей нами был осуществлен следующий модельный эксперимент.

Коллекционные штаммы ВКПМ Y-799, Y-2 и Y-3921 культивировали совместно, после чего из смешанной культуры была выделена суммарная ДНК, которую использовали в качестве матрицы в ПЦР-реакции с праймерами, специфичными для дрожжей групп *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, а также видов *Yarrowia lipolytica* и *Schizosaccharomyces pombe*. Результаты данной ПЦР представлены на рис. 3.

Из рис. 3 видно, что амплификаты наблюдались в трех случаях: фрагмент 377 пн при использовании праймеров pom-1 и pom-2, фраг-

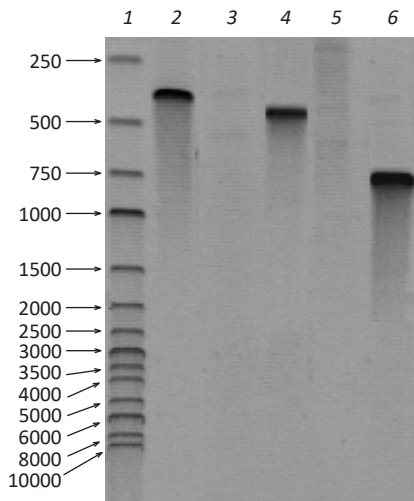
мент 420 пн с праймерами lip-1 и lip-2 и фрагмент 790 пн с праймерами rich-1 и rich-2. Применение остальных двух пар праймеров не приводило к образованию амплификатов.

Таким образом, при помощи ПЦР с участием группо- и видоспецифических праймеров и суммарной ДНК смешанной культуры дрожжей удалось определить, что в состав культуры входят *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Pichia pastoris*.

Результаты данного модельного эксперимента позволяют утверждать, что разработанную в рамках данной работы методику идентификации дрожжей можно использовать для детекции видов указанной группы в комплексных дрожжевых препаратах без обязательного микробиологического разделения штаммов.

Разработанный метод также может быть полезен для подтверждения видовой принадлежности дрожжевой культуры при конструировании штаммов-продуцентов и при промышленных ферментациях, позволяя избежать контаминации на различных этапах процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта -RFMEFI60717X0179) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов».



**Рис. 3.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК, выделенной из смешанной культуры штаммов Y-799, Y-12 и Y-3921. Праймеры, дорожки: pom-1 и pom-2 – 2; Kl-1 и Kl-2 – 3; lip-1 и lip-2 – 4; cer-1 и cer-2 – 5; rich-1 и rich-2 – 6. Дорожка 1 – маркеры молекулярной массы 1kb DNA GeneRuler

**Fig. 3.** Electrophoresis of amplification products using DNA isolated from mixed culture of strains Y-799, Y-12 and Y-3921. Lanes, primers: 2, pom-1 and pom-2; 3, Kl-1 and Kl-2; 4, lip-1 and lip-2; 5, cer-1 and cer-2; 6, rich-1 and rich-2. Lane 1, MM markers of 1kb DNA GeneRuler

### ЛИТЕРАТУРА

- Schmidt F. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2004, 65(4), 363–372. doi 10.1007/s00253-004-1656-9
- Hahn-Hägerdal B., Karhumaa K., Fonseca C., et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 74(5), 937–953. doi 10.1007/s00253-006-0827-2
- Mudassar A., Melanie H., Harald P., et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98, 5301–5317. doi 10.1007/s00253-014-5732-5
- Strausberg R.L., Strausberg S.L. Overview of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 2001, 5, 5–6. doi 10.1002/0471140864.ps0506s02
- Van Ooyen, A.J., Dekker P., Huang M., et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.*, 2006, 6, 381–392. doi 10.1111/j.1567-1364.2006.00049.x

6. Takegawa K., Tohda H., Sasaki M., et al. Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2009, 53(4), 227–235. doi 10.1042/BA20090048
7. Madzak C., Gaillardin C., Beckerich J.M., Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J. Biotechnol.*, 2004, 109(1-2), 63–81. doi 10.1016/j.jbiotec.2003.10.027
8. Kurtzman C.P., Fell J.W. The Yeasts, A Taxonomic Study, 4-th edition. New York, 1998, 1055.
9. Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., Barnett L. Yeasts: Characteristics and identification, Cambridge University Press, 2000, 1150.
10. Deak T., Beuchat L.R. Handbook of food spoilage yeasts. Baton, FL: CRC Press, 1996, 210.
11. Chen Y.C., Eisner M.M., Kattar S.L., et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA Genes. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 38(6), 2302–2310.
12. Deak T., Chen J., Beuchat L.R.. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Appl. Environmental Microbiology*, 2000, 66(10), 4340–4344.
13. Akpınar O., Ucar F.B. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* strains isolated from different environments and lipase profiling. *Turkish J. Biology*, 2013, 37, 249–258. doi 10.3906/biy-1201–1223.
14. Arlorio M., Coisson J.D., Martelli A. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. *Eur. Food Res. Technol.*, 1999, 209, 185–191.
15. Vaudano E., Garcia-Moruno E. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology*, 2008, 25, 56–64. doi 10.1016/j.fm.2007.08.001
16. Hierro N., Gonzalez A., Mas A., et al. New PCR-based methods for yeast identification. *J. Applied Microbiology*, 2004, 97, 792–801. doi 10.1111/j.1365-2672.2004.02369.x
17. *Saccharomyces cerevisiae* PCR Detection Kit. Product # 33300, Norgen Biotek Corp, 2010.
18. Innis M., Gelfand D., Sninsky J. PCR Protocols. A Guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, Inc., 1990, 14–15.
19. Goodfellow M., O'Donnel A.G. Handbook of new bacterial systematics. Acad. Press Ltd, 1993, 3–54.

## Express Method for Identification of Industrially Valuable Yeast

L.N. BORSHCHEVSKAYA\*, T.L. GORDEEVA, A.N. KALININA, and S.P. SINEOKY

*The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Centre «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia*

*e-mail: larisa.larbor3@yandex.ru\**

Received October 27, 2017

Accepted December 01, 2017

**Abstract**—A method for a rapid taxonomy identification of five industrially valuable yeast groups, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*, has been suggested. The specific primers that were selected on the basis of nucleotide sequences of genes encoding rRNA were used in PCR. The method was effective in the identification of either pure yeast cultures or mixture of deposited yeast strain cultures. Therefore, a potential validity of this method for the identification of studied yeast in microbial preparations, at the stages of producing strains construction and during industrial fermentations was demonstrated.

**Key words:** yeast, identification, specific primers.

**Acknowledgements**—The work was performed using the financial support of the Ministry of Education and Science of RF (Project Unique Identifier RFMEFI60717X0179) and with the help of the Unique Research Set, National Bioresource Center *All-Russian Collection of Industrial Microorganisms* (Moscow, Russia).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-6-42-48