

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.852:577.152.3

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *LAC4*
У МОЛОЧНЫХ И ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *Kluyveromyces*

© 2021 г. Л. В. Лютова^{а, б}, Г. И. Наумов^а, А. В. Шнырева^б, Е. С. Наумова^{а, *}

^аГосударственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Москва, 117545 Россия

^бБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Поступила в редакцию 17.06.2020 г.

После доработки 28.07.2020 г.

Принята к публикации 04.08.2020 г.

Характерной особенностью молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* является способность ферментировать лактозу, тогда как подавляющее большинство остальных видов дрожжей не способны даже ассимилировать этот дисахарид. Молекулярный полиморфизм генов *LAC4*, кодирующих β-галактозидазу, контролирующую ферментацию лактозы, практически не изучен, а опубликованные данные касаются только одного штамма *K. lactis* var. *lactis* – NRRL Y-1140, выделенного из сливок в США. С помощью молекулярного кариотипирования, Саузерн-гибридизации и секвенирования мы изучили гены β-галактозидазы у сбраживающих лактозу штаммов *K. lactis*, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. Установлено, что у молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* способность ферментировать лактозу контролируется по крайней мере тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (II) и *LAC3* (IV). Большинство изученных нами штаммов обладали локусом *LAC2*. Впервые проведен сравнительный анализ β-галактозидаз дрожжей рода *Kluyveromyces* и этих ферментов из других дрожжей. Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками *LAC4* дрожжей рода *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. marxianus*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii*), *Scheffersomyces stipitis*, *Sugiyamaella lignohabitans* и *Debaryomyces hansenii*. Обнаружена корреляция между последовательностями β-галактозидаз и экологическим происхождением штаммов *Kluyveromyces*: молочные продукты и природные источники. Группа молочных штаммов гетерогенна и включает дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* (99.80–100% сходства), что указывает на общее происхождение их генов *LAC4*. Филогенетический анализ β-галактозидаз 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.

Ключевые слова: дрожжи-аскомицеты *Kluyveromyces*, *K. lactis* var. *lactis*, полимерные локусы *LAC*, β-галактозидаза, нуклеотидный и аминокислотный полиморфизм, эволюция

DOI: 10.31857/S0026898421010109

ВВЕДЕНИЕ

Наряду с культурными растениями и домашними животными человечество на протяжении многих тысячелетий использует микроорганизмы, прежде всего дрожжи-сахаромицеты, в хлебопечении, виноделии, пивоварении, производстве спирта. К “одомашненным” микроорганизмам можно отнести и молочные дрожжи *Kluyveromyces*, которые часто выделяются из различных молочных продуктов (сыр, молоко, кисломолочные продукты) и придают им приятный аромат и вкус.

Гидролиз дисахарида лактозы до галактозы и глюкозы осуществляется при участии фермента β-галактозидазы [К.Ф 3.2.1.23]. У дрожжей

Kluyveromyces лактоза гидролизруется внутриклеточной β-галактозидазой, поэтому для транспорта сахара в клетку необходимы соответствующие пермеазы. Следует отметить, что известно более 700 видов дрожжей-аскомицетов, из которых лактозу способны утилизировать только около 1%. Помимо дрожжей *Kluyveromyces*, этим свойством обладают только некоторые виды *Candida*, *Debaryomyces* и *Scheffersomyces*.

В настоящее время род *Kluyveromyces* включает семь видов: наземные *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dozhzhanskii* и *K. wickerhamii*, а также морские *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. siamensis* [1, 2]. В свою очередь, вид *K. lactis* имеет сложный состав и включает две разновидности: молочные дрожжи *K. lactis* var.

lactis и не сбраживающие лактозу природные изоляты *K. lactis* var. *drosophilorum*. Виды рода *Kluyveromyces* существенно различаются по способности утилизировать лактозу. Дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и молочные штаммы *K. marxianus* способны ферментировать лактозу, тогда как *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 [3–5]. Дрожжи *K. dobzhanskii* и *K. lactis* var. *drosophilorum* не утилизируют лактозу и не имеют даже молчащих генов *LAC* [6]. Система генов ферментации лактозы хорошо изучена на одном штамме дрожжей *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140, который является родоначальником генетических линий [7–11]. У этого штамма идентифицированы тесно сцепленные гены *LAC4* и *LAC12*, кодирующие, соответственно, β -галактозидазу и пермеазу лактозы, а также регуляторные гены. Ранее при скрещивании штаммов NRRL Y-1118 и NRRL Y-1140 (оба выделены из сливок в США) обнаружили полимерные лактозные локусы *LAC1* и *LAC2* [12]. У гибридов этих штаммов в мейозе наблюдалось дигенное полимерное расщепление по способности ферментировать лактозу. Сцепление генов *LAC4* и *LAC12* в локусах *LAC1* и *LAC2* позднее установили путем тетрадного анализа гибридов штаммов NRRL Y-1118 (*LAC1*) и NRRL Y-1140 (*LAC2*) с природными штаммами *K. lactis* var. *drosophilorum*, у которых нет этих генов [4]. Эти локусы имеют различную хромосомную локализацию: *LAC1* (хромосома II) и *LAC2* (хромосома III) [4, 13]. Третий полимерный локус *LAC3*, расположенный в хромосоме IV, обнаружен нами у штаммов *K. lactis* var. *lactis*, выделенных из молочных продуктов в Советском Союзе [14]. Полиморфизм генов β -галактозидазы дрожжей *K. lactis* ранее не изучали. В базе данных GenBank представлены нуклеотидные последовательности гена *LAC4* только трех штаммов *K. lactis* var. *lactis*: NRRL Y-1140 (выделен из сливок в США), F61 (молоко) и GG799 (пищевая промышленность, США). Все эти штаммы содержат локус *LAC2*.

В настоящей работе молекулярно-генетическое изучение генов β -галактозидазы *LAC4* дрожжей *Kluyveromyces* проведено на материале штаммов различного происхождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Используемые в работе штаммы *Kluyveromyces* приведены в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°C на полной среде YPD, г/л: бактоагар – 20, глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 10 и пептон – 20.

ПЦР. Дрожжевую ДНК выделяли при помощи набора Genomic DNA Purification Kit (“Fermentas”, Литва). Дизайн олигонуклеотидных прайме-

ров для амплификации и секвенирования генов *LAC4* осуществляли онлайн на сайте <https://www.yeastgenome.org>. Для амплификации генов *LAC4* использовали праймеры MR11 (5'-AT-GTCTTGCCTTATTCCTG-3') и MR14 (5'-GATCTC-GCTTTTGAATAA-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 ед. акт Taq-полимеразы (“Helicon”, Россия), 20–200 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация 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. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле при 60–65 В в 0.5 × TBE-буфере (45 mM Трис-НСl pH 8.0, 10 mM EDTA, 45 mM борная кислота) в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных масс использовали препарат “1 kb DNA Ladder” (“Thermo Fisher”, США).

Определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ. Амплифицированные фрагменты генов *LAC4* элюировали из геля при помощи набора Cleanup Mini (“Eurogen”, Москва) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Нуклеотидные последовательности генов *LAC4* определяли по двум цепям при помощи двух пар праймеров: MR11/MR14 и MR12 (5'-CGAAGCTTGTTATGGCAG-3')/MR13 (5'-CGC-GTACTTAGACAGAGC-3') с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе “Applied Biosystems 3730” (США). Последовательности анализировали, используя программу SeqMan package (“DNA Star Inc.”, США).

Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями генов *LAC4* 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 (Neighbour-Joining) в программе MEGA 7 [15].

Пульс-электрофорез хромосомных ДНК (молекулярное карiotипирование) и Саузерн-гибридизация. Условия приготовления препаратов хромосомной ДНК описаны ранее [16]. Электрофоретическое разделение хромосомных ДНК проводили на аппарате CHEF-DR III фирмы “Bio-Rad” (США) в 0.8%-ном агарозном геле с использованием трехступенчатого режима: 1) 175 В, 8 ч, время переключения полей 40–120 с; 2) 130 В, 24 ч, время переключе-

Таблица 1. Происхождение штаммов дрожжей *Kluyveromyces*

Штамма и его номер	Источник и место выделения	Локус <i>LAC</i>
<i>Kluyveromyces lactis var. lactis</i>		
CBS 683 (T)	Мягкий сыр, Великобритания	<i>LAC2</i>
NRRL Y-1140	Сливки, США	То же
SM 3.8	Сыр Камамбер, Франция	»
SM 5.8	То же	»
SM 6.7	»	»
SM 16.9	»	»
SM 48.7	»	»
CBS 762	Сливки, США	»
CBS 845	Молоко, Великобритания	»
CBS 1065	Молоко	»
CBS 1797	Мокрота, Норвегия	»
CBS 2360	Молоко	»
CBS 2619	Сливки, США	»
CBS 5618	Мокрота, Норвегия	»
CBS 8043	Кишечник ребенка, Новая Зеландия	»
ВКПМ Y-3737	Почва, Измайловский парк, Москва, Россия	»
H1	Почва, Измайловский парк, Москва, Россия	»
H2	Почва, Измайловский парк, Москва, Россия	»
H3	Почва, Измайловский парк, Москва, Россия	»
GG799	Пищевая промышленность, США	»
F61	Молоко	»
NRRL Y-1118	Сливки, США	<i>LAC1</i>
CBS 1067	Молоко, Нидерланды	То же
ВКМ Y-762	Сливки, США	»
ВКМ Y-869	Кислое молоко, Кольский полуостров, Россия	»
ВКМ Y-870	Чал, Туркмения	»
ВКМ Y-896	Мягкий сыр, Италия	»
ВКМ Y-1527	Мокрота, Испания	»
ВКМ Y-1186	Молоко, Киев, Украина	<i>LAC3</i>
ВКМ Y-1333	Кислое молоко, Ставропольский край, Россия	То же
ВКМ Y-1339	Сметана, Санкт-Петербург, Россия	»
ВКМ Y-1343	Молоко, Гомельская обл., Беларусь	»
ВКМ Y-1868	Чал, Туркмения	<i>LAC1/LAC3</i>
УСМ Y-328	Кефир, Киев, Украина	<i>LAC1/LAC2</i>
ВКПМ Y-492	Молочная сыворотка, Украина	<i>LAC1/LAC2</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		
CBS 397	Йогурт, Нидерланды	<i>LAC</i>
B0399	Творог, Италия	То же
UFV-3	Молоко, Бразилия	»
L03	Молочный продукт	»
100656-19	Кровь человека, Нидерланды	»
NBRC 1777	Почва, Япония	»

Таблица 1. Окончание

Штамма и его номер	Источник и место выделения	Локус <i>LAC</i>
CBS 6556	Ферментированное кукурузное тесто, Мексика	»
DMKU3-1042	Почва, Тайланд	»
FIM1	Спина коровы, Нидерланды	»
DMB1	Гидролизат сахарного тростника	»
UFS-Y2791	Сок <i>Agave americana</i> , Южная Африка	»
	<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	»
	<i>Kluveromyces aestuarii</i>	
CBS 4438 (T)	Морская грязь, Флорида, США	»
	<i>Kluveromyces nonfermentans</i>	
CBS 8778 (T)	Ил, залив Сагами, Япония	»
	<i>Kluveromyces siamensis</i>	
CBS 10860 (T)	Вода мангрового леса, Тайланд	»
	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	
CBS 6054	Неизвестно	»
	<i>Sugiyamaella lignohabitans</i>	
CBS 10342 (T)	Гнилое бревно, Иллинойс, США	»
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	
CBS 767 (T)	Неизвестно	»

Примечание. Сокращенные названия коллекций: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пушкино, 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; УСМ – 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. Соответствие штаммов различных коллекций: CBS 683=ВКМ Y-868, NRRL Y-1140 = CBS 2359, NRRL Y-1118 = CBS 6315, CBS 6556 = KCTC 17555, FIM1 = CBS 4857, CBS 2745 = UCDFST 54-210, CBS 4438 = NRRL YB-4510, CBS 8778 = NRRL Y-27343. T – типовая культура.

чения полей 120–360 с; 3) 100 В, 8 ч, время переключения полей 360–1200 с. В качестве буфера использовали 0.5 × ТВЕ, охлажденный до 14°C. В качестве кариотипических стандартов использовали коммерческие препараты ДНК штаммов *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 (=ATCC 20358) и *Wickerhamomyces canadensis* (syn. *Hasenula wingei*) YB-4662-VIA (=ATCC 28162) (“Bio-Rad”, США). После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Хромосомную ДНК переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя аппарат Vacuum blotter (“BioRad”). ДНК фиксировали на мембране путем отжига при 80°C в течение 2 ч. 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”, Швейцария). Гибридизацию и детекцию гибридизационных сигналов проводили по протоколу фирмы-изготовителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация

С помощью пульс-электрофореза и Саузерн-гибридизации хромосомной ДНК с зондом *LAC4* мы провели молекулярный скрининг генов β-галактозидазы у 33 сбраживающих лактозу штаммов дрожжей *K. lactis* var. *lactis* различного экологического и географического происхождения (табл. 1). Штаммы выделены в различных регионах бывшего СССР, Европы, США и Новой Зеландии из молочных продуктов, почвы и клинических

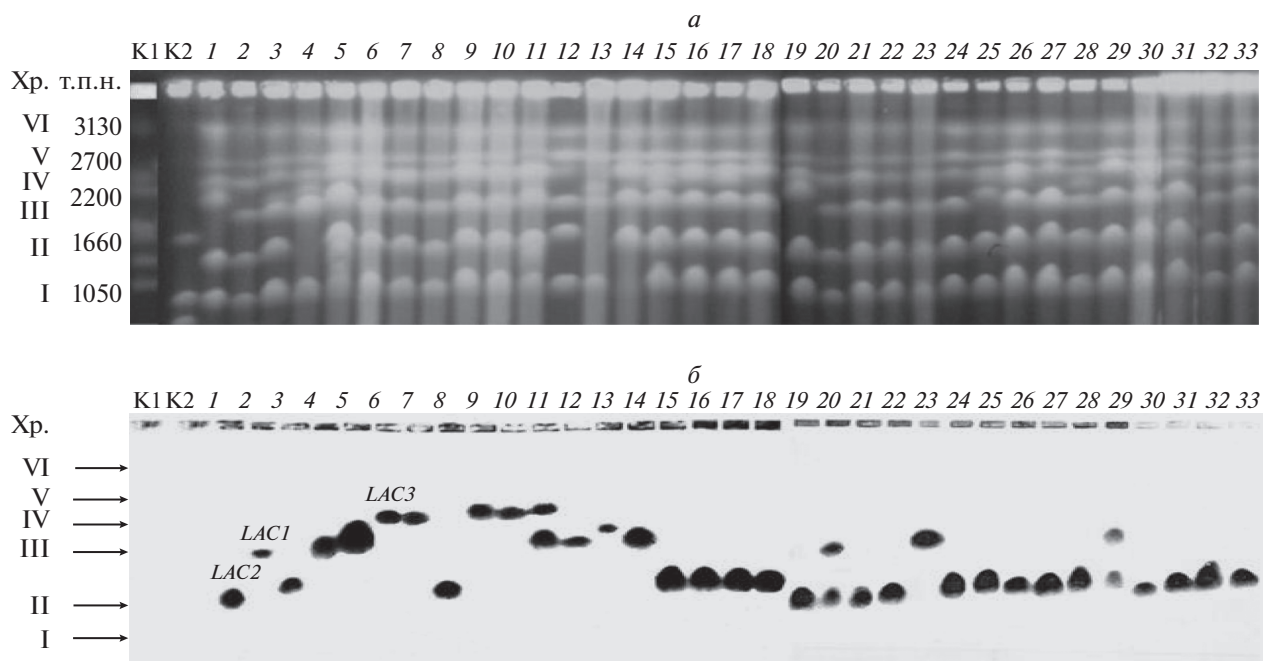


Рис. 1. Пульс-электрофорез хромосомных ДНК дрожжей *K. lactis* var. *lactis* (а) и Саузерн-гибридизация с зондом *LAC4* (б). Дорожки: *K1* – *W. canadensis* (хромосомный стандарт); *K2* – *S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); *K. lactis* var. *lactis*: 1 – NRRL Y-1140; 2 – NRRL Y-1118; 3 – CBS 683; 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.

источников (мокрота, кишечник). На рис. 1а приведены кариотипические профили 33 изученных штаммов. Размеры отдельных хромосом определяли по кариотипам стандартных штаммов *W. canadensis* YB-4662-VIA и *S. cerevisiae* YNN 295 (рис. 1а, дорожки 1 и 2). Изученные штаммы характеризуются сходными молекулярными кариотипами с шестью хромосомными полосами размером от 1050 до 2800 т.п.н. (рис. 1а). Отмечен некоторый полиморфизм размеров хромосом II и III. Гибридизация с зондом *LAC4* выявила локус *LAC1* у семи штаммов, *LAC2* – у 19 и *LAC3* у четырех (рис. 1б). У штаммов UCM Y-328 и ВКПМ Y-492, выделенных из молочных продуктов на Украине, обнаружены полимерные локусы *LAC1* и *LAC2* (рис. 1б, дорожки 20 и 29). Выделенный из чала в Туркмении штамм ВКМ Y-1868 имеет полимерные гены *LAC1* и *LAC3* (рис. 1б, дорожка 11). Нами не отмечена корреляция между происхождением штаммов и присутствием определенных локусов *LAC* (табл. 1). Например, клинические изоляты CBS 5618 и CBS 8043, выделенные, соответственно, из мокроты в Норвегии и кишечника ребенка в Новой Зеландии, содержат локус *LAC2* (табл. 1). Также европейский штамм ВКМ Y-1527 (мокрота, Испания) содержит локус *LAC1*. Независимо от источника выделения (молочные продукты, почва и клинические изоляты) большин-

ство изученных штаммов обладали локусом *LAC2* (табл. 1).

Нуклеотидный полиморфизм генов *LAC4* дрожжей *Kluveromyces*

Мы провели секвенирование генов *LAC4* различной хромосомной локализации у 11 штаммов *K. lactis* var. *lactis*: локус *LAC1* (NRRL Y-1118, ВКМ Y-869, ВКМ Y-870 и ВКМ Y-1527), *LAC2* (CBS 683, ВКПМ Y-3737 и SM 48.7) и *LAC3* (ВКМ Y-1186, ВКМ Y-1333, ВКМ Y-1339 и ВКМ Y-1343) (табл. 1). В анализ вошли штаммы, выделенные из молочных продуктов, почвы и в клиниках. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с последовательностями генов *LAC4* локуса *LAC2* штаммов NRRL Y-1140, F61 и GG799, депонированными в базу данных GenBank. Последовательности генов *LAC4* у штаммов, обладающих локусом *LAC1*, были идентичными или отличались 1–2 нуклеотидами. У штаммов с локусом *LAC2* обнаружено от 0 до 3 замен в нуклеотидных последовательностях генов *LAC4*. Все четыре изученных нами штамма с локусом *LAC3* имели идентичные последовательности генов β -галактозидазы. Гены *LAC4* локусов *LAC1*, *LAC2* и *LAC3* различались 1–5 нуклеотидами, наибольшее количество замен выявлено в гене β -галактозидазы локуса

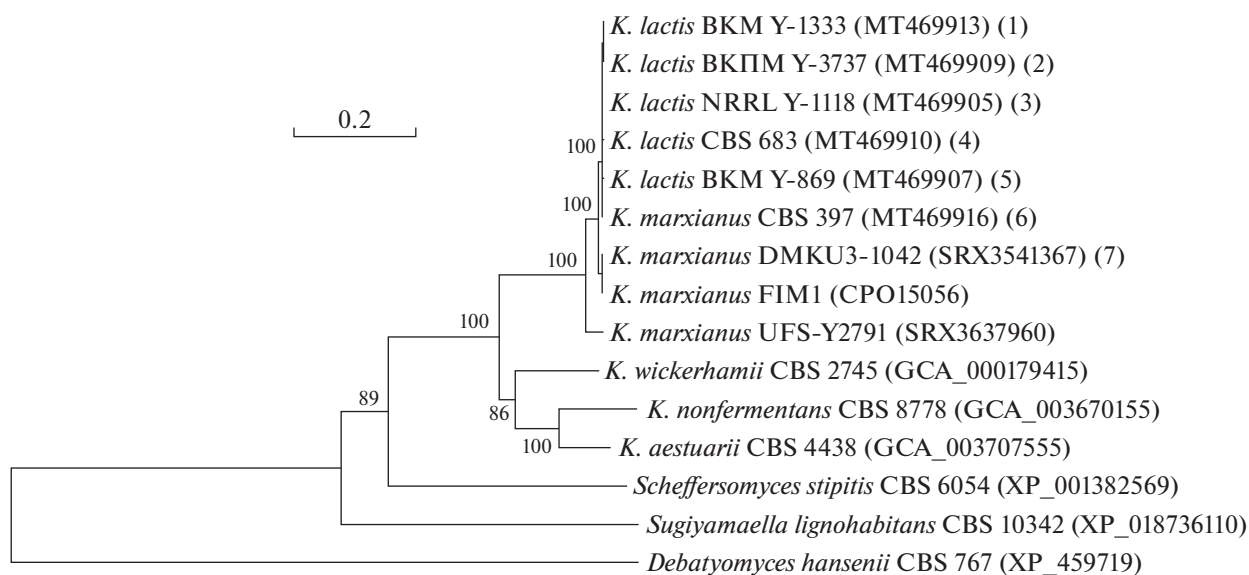


Рис. 2. Филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей β -галактозидаз дрожжей рода *Kluyveromyces*. В качестве внешней группы использовали β -галактозидазы дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, *Sugiyamaella lignohabitans* CBS 10342, *Debaryomyces hansenii* CBS 767. Приведены значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 20 заменам на 100 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов с идентичными аминокислотными последовательностями: (1) – ВКМ Y-1186 (MT469912), ВКМ Y-1339 (MT469915), ВКМ Y-1343 (MT469914); (2) – SM 48.7 (MT469911); (3) – NRRL Y-1140 (XP_452194.1), ВКМ Y-1527-7A (MT469908), F61 (KF420203.1); (4) – GG799; (5) – ВКМ Y-870 (MT469906); (6) – B0399 (CM004407.1), 100656-19 (CABJXCX010000079.1), UFFV-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.

LAC3. Анализ спектра нуклеотидных замен показал, что наиболее часто встречаются транзиции типа С \rightarrow Т, большинство из которых представлены расположенными в третьем положении кодона молчащими заменами, не вызывающими изменений в аминокислотной последовательности кодируемого белка. Мы также секвенировали ген *LAC4* 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 и всего 1–3 нуклеотидные замены.

В базе данных GenBank представлены нуклеотидные последовательности геномов типовых культур *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. wickerhamii*, а также 10 штаммов *K. marxianus*, выделенных из молочных продуктов и различных природных источников (табл. 1). Нуклеотидные последовательности генов β -галактозидазы штаммов *K. marxianus* молочного происхождения (B0399, UFFV-3 и L03) и клинического изолята 100656-19, выделенного из крови человека, были идентичными и не отличались от последовательности штамма CBS 397. С другой стороны, сходство нуклеотидных последовательностей генов *LAC4* природных штаммов *K. marxianus* составило 92.88–98.34%. Последовательности генов *LAC4* молочных и природных штаммов *K. marxianus*

различались более 60 заменами. В целом, нуклеотидные последовательности генов β -галактозидаз дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* сходны на 89.94–99.97%, 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%.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей β -галактозидаз дрожжей *Kluyveromyces*

По полученным нуклеотидным последовательностям генов *LAC4* были определены первичные структуры соответствующих белков, состоящих из 1025 аминокислотных остатков. В сравнительный анализ были также включены β -галактозидазы дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, *Sugiyamaella lignohabitans* CBS 10342 и *Debaryomyces hansenii* CBS 767. На основании анализа изученных аминокислотных последовательностей построено филогенетическое дерево (рис. 2). β -Галактозидазы дрожжей рода *Kluyveromyces* сформировали 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*, идентичными на 94.00–100%. Этот подкластер включает

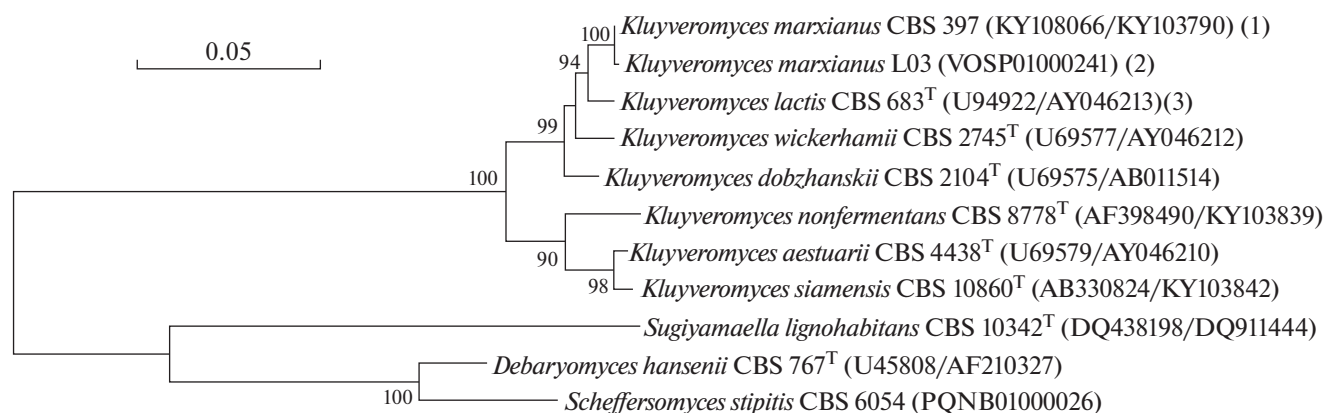


Рис. 3. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 гена 26S рРНК и участка ITS1-5.8S-ITS2 дрожжей *Kluyveromyces*. В качестве внешней группы использовали последовательности дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, *Sugiyamaella lignohabitans* CBS 10342 (T), *Debaryomyces hansenii* CBS 767 (T). Приведены значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 50 нуклеотидным заменам на 1000 позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные последовательности: (1) – CBS 712T (U94924/AY046214), V0399 (CM004409), 100656-19 (SABJXC010000020), NBRC 1777 (AB771427/AB771426), CBS 6556 (KY108061/KY103826), DMKU3-1042 (AP012217), FIM1 (KY108083/KY103823), DMB1 (GCA_000747785); (2) – UFV-3 (CP009307); (3) – NRRL Y-1140 (KY108038/ KY103771), GG799 (KY103771/CP021242); После номера штамма приведены регистрационные номера последовательностей в GenBank. T – типовая культура.

две группы штаммов: молочные дрожжи *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, выделенного из *Agave americana* в Южной Африке. Второй подкластер включает белки LAC4 дрожжей *K. wickerhamii*, *K. aestuarii* и *K. nonfermentans*. Наибольшее сходство имеют β -галактозидазы *K. aestuarii* и *K. nonfermentans* (79.98%), идентичные белку LAC4 *K. wickerhamii* на 72.77 и 69.60% соответственно. Сходство β -галактозидаз двух подкластеров составило 63.67–70.37%. Отдельное положение на дереве занимают лактазы других родов дрожжей: *Scheffersomyces*, *Sugiyamaella* и *Debaryomyces*, сходство которых с β -галактозидазами дрожжей *Kluyveromyces* не превышало 45%.

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

Современная классификация дрожжей-аскомицетов основана на филогенетическом анализе ряда молекулярных маркеров, прежде всего домена D1/D2 гена 26S рРНК и 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2. На основании депонированных в GenBank нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 и ITS-участка дрожжей *Kluyveromyces* построено филогенетическое дерево (рис. 3). Дрожжи *Kluyveromyces* со 100%-ной статистической значимостью сформировали отдельный кластер, который, в свою оче-

редь, разделен на два подкластера. Первый включает сухопутные виды *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii*, а второй – морские виды *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* и *K. siamensis*. Дрожжи *K. lactis* и *K. marxianus* имеют практически идентичные домены D1/D2, но значительно различаются последовательностями ITS1-участка: 23 нуклеотидные замены. Штаммы *K. lactis* var. *lactis*, молочные (CBS 683 и NRRL Y-1140) и не молочные (GG799), имели идентичные последовательности D1/D2 и ITS. Штаммы *K. marxianus* разделились на две группы, ITS1 которых различались двумя нуклеотидными заменами. Первая группа включает молочные штаммы (CBS 397 и V0399), клинический изолят 100656-19 и штаммы не молочного происхождения (NBRC 1777, CBS 6556, DMKU3-1042, FIM1 и DMB1). Два молочных штамма LO3 и UFV-3 составили вторую группу. Деление на группы не связано с географическим происхождением штаммов и способностью ферментировать лактозу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На материале штаммов *K. lactis* var. *lactis* различного происхождения впервые проведен молекулярный скрининг генов *LAC4*, контролирующих ферментацию лактозы. У этих дрожжей способность ферментировать лактозу контролируется по крайней мере тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV).

В целом, топологии деревьев, построенных на основании аминокислотных последовательно-

стей β -галактозидаз и нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 и ITS-участка рДНК хорошо согласуются: со 100%-ной статистической значимостью выделяются кластеры, объединяющие виды рода *Kluyveromyces*, а молочные дрожжи *K. lactis* и *K. marxianus* являются наиболее близкородственными (рис. 2 и 3). В то же время имеются некоторые различия, связанные, по-видимому, с отсутствием видов *K. dobzhanskii* и *K. siamensis* на дереве, построенном по аминокислотным последовательностям β -галактозидаз. Так, на дереве рибосомных последовательностей наземные и морские виды *Kluyveromyces* разделены на два четких подкластера, тогда как на втором дереве β -галактозидаза наземных дрожжей *K. wickerhamii* примыкает к β -галактозидазам морских видов *K. aestuarii* и *K. nonfermentans*.

Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками LAC4 дрожжей рода *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. marxianus*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii*), *Scheffersomyces stipitis*, *Sugiyamaella lignohabitans* и *Debaryomyces hansenii*. β -Галактозидазы *Kluyveromyces* идентичны на 63.67–100%. Наибольшим сходством обладают β -галактозидазы штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*: 94.00–100%. С другой стороны, белки LAC4 дрожжей *K. marxianus* разделились на две группы, соответствующие происхождению штаммов: молочные продукты и природные источники. Следует отметить близкое генетическое родство молочных и госпитальных штаммов *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus*. Ранее мы показали, что клинические изоляты *K. lactis* var. *lactis* по многим молекулярным маркерам не отличаются от штаммов, выделенных из молочных продуктов [16]. Принимая во внимание способность клинических штаммов сбраживать лактозу, они, очевидно, происходят от молочных дрожжей. Ряд характеристик, свойственных патогенным дрожжам, уже присущи госпитальным штаммам *K. marxianus*: образование псевдомицелия, устойчивость к повышенной температуре и высокая пектолитическая активность [17]. Обнаружены также клинические изоляты *S. cerevisiae*, по многим молекулярным маркерам сходные с пекарскими штаммами [18–21].

С помощью комплементационного анализа при гибридизации с lac-тестерами *K. lactis* var. *lactis* ранее установлено, что молочные, клинические и природные штаммы *K. marxianus* обладают активными генами LAC4, но имеют различные типы пермеаз лактозы [3]. На специальной среде с ингибитором дыхания антимицином А показано, что молочные и клинические штаммы содержат не зависящую от дыхания сильную пермеазу лактозы, тогда как природные изоляты характеризуются зависящей от дыхания слабой пермеазной активностью. Феномен ассимиляции сахаров дрожжами в аэробных условиях и неспособность

их сбраживать в анаэробных условиях получил название эффекта Клюйвера [22, 23]. С помощью антимицина А установлена зависимость многих ферментов *K. lactis* от дыхания, в том числе и пермеазы глюкозы [24]. Низкой активностью пермеазы лактозы обладают также дрожжи *K. wickerhamii*, способные только ассимилировать лактозу [25]. В то же время эти дрожжи имеют активный ген LAC4. Генетические данные очень хорошо согласуются с результатами недавно проведенного сравнительного анализа пермеазных генов LAC12 у штаммов *K. marxianus* различного происхождения [5, 26]. На основании геномного анализа штаммов *Kluyveromyces*, депонированных в GenBank, 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 LAC4 гидролизировал лактозу, а CEL2 – целлобиозу. В процессе эволюции дрожжи *K. marxianus* и *K. nonfermentans* утратили собственно транспортер целлобиозы CEL1, который сохранился у остальных видов рода *Kluyveromyces*. У дрожжей *K. marxianus* вместе с потерей CEL1 произошла дупликация гена LAC12, в результате которой образовались четыре копии, локализованные в субгеломерных районах различных хромосом: 8 и 2 и оба плеча хромосомы 3. Однако только расположенный в левом плече хромосомы 3 предковый ген LAC12 кодирует функциональную пермеазу лактозы, а остальные копии участвуют в транспорте другого дисахаридов – целлобиозы [5]. У неспособных ферментировать лактозу природных штаммов *K. marxianus* белок LAC12 отличается 13 заменами от соответствующего белка молочных и госпитальных штаммов [26]. Независимо от источника выделения, все изученные штаммы *K. marxianus* обладали функциональным геном LAC4 (хромосома 3L), тогда как остальные копии (хромосомы 8, 2 и правое плечо хромосомы 3) были утрачены или вырождены в псевдогены [26].

Дрожжи *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* совместно обитают в молочных продуктах и, обладая общей системой типов спаривания, могут образовывать межвидовые гибриды [27]. По-видимому, domestикация молочных дрожжей *K. lactis* var. *lactis* произошла на основе приобретения генного кластера LAC4–LAC12 от молочных штаммов *K. marxianus* [6]. В свою очередь, дрожжи *K. marxianus* могли приобрести “лактозные” гены в результате горизонтального переноса соответствующих генов от бактерий [28]. Наше предположение подтверждено Varela и соавт. [5]. Проведенное ранее секвенирование и аннотация генома типовой культуры *K. lactis* var. *drosophilorum* CBS 2105, выделенной из *Drosophila* sp. (США), не обнаружило последовательностей генов LAC4 и LAC12, что полностью согласуется с проведенным нами Сау-

зерн-блотингом [6]. Известно, что 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 [11, 26, 29]. С помощью точечно-матричного анализа (dot matrix plots) проведено сравнение субтеломерных областей указанных хромосом у *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140, *K. lactis* var. *drosophilorum* CBS 2105 и трех штаммов *K. marxianus*: L03 (молочный продукт), NBRC 1777 (почва) и UFS Y-2791 (сок *Agave americana*) [5]. Если сходство нуклеотидных последовательностей хромосом II R и 3L на большей части длины составляет всего 63.4–64.5%, то, 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*. По-видимому, в результате межвидовой гибридизации произошел перенос лактозного кластера из молочного штамма *K. marxianus* в правое плечо хромосомы II дрожжей *K. lactis*. Следует отметить, что большинство изученных нами штаммов *K. lactis* var. *lactis* содержали локус *LAC2* (рис. 1б). Причем этим локусом обладали как молочные, госпитальные, так и четыре природных штамма (ВКПМ Y-3737, Н1, Н2 и Н3), выделенные нами в свое время из почвы в Измайловском парке Москвы [30]. Локусы *LAC1* и *LAC3* могли произойти от локуса *LAC2* в процессе внутривидовой гибридизации за счет рекомбинации гомологичных субтеломерных последовательностей различных хромосом. Хорошо известно, что повторяющиеся субтеломерные последовательности являются горячими точками внутри- и межхромосомных рекомбинационных событий. На дрожжах *Saccharomyces* показан природный межвидовой перенос многих субтеломерных генов, включая гены ферментации различных сахаров [31, 32]. Интрогрессия кластера генов β -галактозидазы (*LAC4*) и пермеазы лактозы (*LAC12*) в геном дрожжей *K. lactis* var. *lactis*, по-видимому, совпала по времени с одомашниванием “молочных” видов животных [5, 33].

Анализ нуклеотидных последовательностей генов пермеазы лактозы у разных штаммов *K. lactis* var. *lactis* позволит прояснить происхождение их полимерных локусов *LAC* и получить ценную информацию в области генетики адаптивных ферментационных признаков. В настоящее время мы проводим гибридологический анализ штаммов, обладающих разными локусами *LAC*, и секвенирование пермеазных генов *LAC12*.

Работа поддержана российско-тайваньским грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-54-52002 МНТ_a).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurtzman C.P. (2003) 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 Res.* **4**, 233–245.
2. Lachance M.-A., Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (2011) *Kluyveromyces* van der Walt (1971). In: *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Eds Kurtzman C.P., Fell J.W. Amsterdam: Elsevier, 471–482.
3. Наумов Г.И. (2006) Генетика полиморфизма утилизации лактозы у дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. *ДАН.* **409**(3), 422–424.
4. Наумов Г.И. (2008) Обнаружение суперсемейств лактозных генов *LAC* у дрожжей *Kluyveromyces*. *ДАН.* **420**(6), 832–834.
5. Varela J.A., Puricelli M., Ortiz-Merino R.A., Giacomobono R., Braun-Galleani S., Wolfe K.H., Morrissey J.P. (2019) Origin of lactose fermentation in *Kluyveromyces lactis* by interspecies transfer of a neofunctionalized gene cluster during domestication. *Curr. Biol.* **29**, 4284–4290.
6. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Баррио Е., Керол А. (2006) Генетическое и молекулярное изучение неспособности дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilorum* сбразивать лактозу. *Микробиология.* **75**, 299–304.
7. Riley M.I., Sreekrishna K., Bhairi S., Dickson R.C. (1987) Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 145–151.
8. Dickson R.C., Riley M.I. (1989) The lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*. in: *Yeast Genetic Engineering*. Eds Barr P.J., Brake A.J., Valenzuela P. Boston: Butterworth Publ., 19–40.
9. Gödecke A., Zachariae W., Arvanitidis A., Breunig K.D. (1991) 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. *Nucl. Acids Res.* **19**, 5351–5358.
10. 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. (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enz. Microb. Techn.* **26**, 771–780.
11. Fairhead C., Dujon B. (2006). Structure of *Kluyveromyces lactis* subtelomeres: duplications and gene content. *FEMS Yeast Res.* **6**, 428–441.
12. Herman A., Halvorson H. (1963) Identification of the structural gene for beta-glucosidase in *Saccharomyces lactis*. *J. Bacteriol.* **85**(4), 895–900.
13. Wesolowski-Louvel M., Fukuhara H. (1995) A map of the *Kluyveromyces lactis* genome. *Yeast.* **11**, 211–218.

14. Наумов Г.И., Наумова Е.С. (2014) Полимерные гены ферментации лактозы у дрожжей *Kluyveromyces lactis*: новый локус *LAC3*. *ДАН*. **455**(3), 363–365.
15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**(7), 1870–1874.
16. Наумова Е.С., Сухотина Н.Н., Наумов Г.И. (2005) Молекулярные маркеры, дифференцирующие молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* от их ближайших диких родственников – европейской популяции “krassilnikovii”. *Микробиология*. **74**(3), 387–393.
17. Çuhadar T., Kalkanç A. (2017) Emerging pathogen: *Candida kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*). *Mikrobiyol. Bul.* **51**(4), 387–395.
<https://doi.org/10.5578/mb.61813>
18. Hennequin C., Thierry A., Richard G.F., Lecointre G., Nguyen H.-V., Gaillardin C., Dujon B. (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* **3**, 551–559.
19. de Llanos R., Querol A., Planes A.M., Fernandez-Espinosa M.T. (2004) Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**(4), 427–435.
20. Imre A., Rác H.V., Antunovic Z., Rádai Z., Kovács R., Lopandic K., Pócsi I., Pfliegler W. P. (2019) A new, rapid multiplex PCR method identifies frequent probiotic origin among clinical *Saccharomyces* isolates. *Microbiol. Res.* **227**, 126298.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126298>
21. Pfliegler W.P., Boros E., Pázmándi K., Jakab Á., Zsuga I., Kovács R., Urbán E., Antunovic Z., Bácsi A., Sipiczki M., Majoros L., Pócsi I. (2017) Commercial strain-derived clinical *Saccharomyces cerevisiae* can evolve new phenotypes without higher pathogenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**(11).
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201601099>
22. Fukuhara H. (2003) The Kluyver effect revisited. *FEMS Yeast Res.* **3**, 327–331.
23. Fukuhara H. (2006) *Kluyveromyces lactis* – a retrospective. *FEMS Yeast Res.* **6**, 323–324.
24. Wesolowski-Louvel M., Goffrini P., Ferrero I., Fukuhara H. (1992) Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. *Mol. Gen. Genet.* **333**, 89–96.
25. Наумов Г.И. (2005) Почему дрожжи *Kluyveromyces wickerhamii* ассимилируют, но не сбрасывают лактозу? *ДАН*. **403**, 847–849.
26. Varela J.A., Montini N., Scully D., Van der Ploeg R., Oreb M., Boles E., Hirota J., Akada R., Hoshida H., Morrissey J.P. (2017) Polymorphisms in the *LAC12* gene explain lactose utilisation variability in *Kluyveromyces marxianus* strains. *FEMS Yeast Res.* **17**(3).
<https://doi.org/10.1093/femsyr/fox021>
27. Наумов Г.И. (2005) Доместикация молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis*: перенос кластера генов β-галактозидазы (*LAC4*) и лактозной пермеазы (*LAC12*)? *ДАН*. **401**(2), 279–281.
28. Poch O., L'Hôte H., Dallery V., Debeaux F., Fleer R., Sodoyer R. (1992) Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene*. **118**, 55–63.
29. Bussereau F., Casaregola S., Lafay J.-F., Bolotin-Fukuhara M. (2006) The *Kluyveromyces lactis* repertoire of transcriptional regulators. *FEMS Yeast Res.* **6**, 325–335.
30. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. (2014) Обнаружение молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* в природе. *Микробиология*. **83**, 677–681.
31. Naumova E.S., Naumov G.I., Mikhailova Yu.V., Martynenko N.N., Masneuf-Pomarède I. (2011) Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes. *Res. Microbiol.* **162**(2), 204–213.
32. Peter J., De Chiara M., Friedrich A., Yue J.-X., Pfliegler D., Bergström A., Sigwalt A., Barre B., Freel K., Llored A., Cruaud C., Labadie K., Aury J.-M., Istace B., Lebrigand K., Barbry P., Engelen S., Lemainque A., Wincker P., Liti G., Schacherer J. (2018) Genome evolution across 1.011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*. **556** (7701), 339–344
33. Larson G., Fuller D.Q. (2014) The evolution of animal domestication. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **45**, 115–136.

MOLECULAR POLYMORPHISM OF β-GALACTOSIDASE *LAC4* GENES IN DAIRY AND NATURAL STRAINS OF *Kluyveromyces* YEASTS

L. V. Lyutova^{1,2}, G. I. Naumov¹, A. V. Shnyreva², and E. S. Naumova¹ *

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545 Russia

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com

Dairy yeast *Kluyveromyces lactis* are capable of fermenting lactose. Notably, vast majority of other yeast species cannot even import lactose to cells. Molecular polymorphism of β-galactosidase genes *LAC4* controlling lactose fermentation is practically not studied, and the literature data concerns only one strain of *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140, isolated from cream in the USA. Here we present the karyotyping, Southern hybridization, and sequencing based study of β-galactosidase genes in lactose-fermenting *K. lactis* strains isolated from dairy products and natural sources in different regions of the world. In dairy yeast *K. lactis* var. *lactis*, the ability to ferment lactose is controlled by at least three polymeric *LAC* loci, *LAC1* (chromosome III), *LAC2*

(chr. II), and *LAC3* (chr. IV), located on different chromosomes. Most of strains possess the *LAC2* locus. Phylogenetic analysis show significant differences between the *LAC4* proteins of the genus *Kluyveromyces* (*K. lactis*, *K. marxianus*, *K. aestuarii*, *K. nonfermentans* and *K. wickerhamii*), *Scheffersomyces stipitis*, *Sugiyamaella lignohabitans* and *Debaryomyces hansenii*, and a correlation between the β -galactosidase sequences and the sources of *Kluyveromyces* strains. The group of milk strains is heterogeneous and includes *K. lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* (99.80–100% identity), suggesting the common origin of their *LAC4* genes. Phylogenetic analysis of β -galactosidases indicates a close genetic relationship between dairy and hospital strains of *K. lactis* var. *lactis* and *K. marxianus*. As these clinical isolates are able to ferment lactose, we conclude that they appear to be originated from dairy yeasts.

Keywords: ascomycetous yeast *Kluyveromyces*, dairy yeasts *K. lactis* var. *lactis*, polymeric *LAC* loci, β -galactosidase, nucleotide and amino acid polymorphisms, evolution