

ISSN 1817-7204(Print)

ISSN 1817-7239(Online)

УДК [602.3:579.864]:577.21.082

<https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-2-244-256>

Поступила в редакцию 14.02.2020

Received 14.02.2020

Е. Н. Бирюк, Н. Н. Фурик, Ю. С. Тарашкевич, Т. А. Савельева

Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь

КОНСТРУИРОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОДВИДОВ *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES*

Аннотация: Бактерии р. *Leuconostoc* – важная в технологическом отношении группа молочнокислых бактерий, входящая в состав заквасочных культур для производства различных молочных продуктов. В молочной промышленности наибольшее значение имеют два вида: *Leuconostoc lactis* и *Leuconostoc mesenteroides*, они включают три подвида: *dextranicum*, *mesenteroides*, *cremoris*. Основная проблема идентификации представителей р. *Leuconostoc* состоит в том, что данные микроорганизмы часто могут быть ошибочно идентифицированы как энтерококки или лактобактерии. По сравнению с традиционными способами видовой детекции установление видовой принадлежности с помощью ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и достоверностью. В статье представлены результаты конструирования праймеров, специфичных для бактерий *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* и *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*. Специфичность разработанных праймеров подтверждена тестированием *in silico* с использованием доступных геномных последовательностей *Leuconostoc mesenteroides* и экспериментально с использованием образцов ДНК чистых культур *Leuconostoc mesenteroides*. С помощью разработанных праймеров установлена таксономическая принадлежность 5 изолятов лейконостокок, выделенных из природных образцов. Разработаны методические указания, регламентирующие процедуру определения таксономического положения бактерий р. *Leuconostoc* до подвида. Методические указания по идентификации лейконостокок будут использоваться в коллекциях промышленных микроорганизмов для точной идентификации депонируемых штаммов. **Благодарности.** Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Качество и эффективность агропромышленного производства», подпрограмма 3 «Продовольственная безопасность».

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, заквасочные культуры, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, ДНК, ПЦР, праймеры, декстрансахараза

Для цитирования: Конструирование специфичных праймеров для идентификации подвидов *Leuconostoc mesenteroides* / Е. Н. Бирюк, Н. Н. Фурик, Ю. С. Тарашкевич, Т. А. Савельева // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2020. – Т. 58, № 2. – С. 244–256. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-2-244-256>

Alena M. Biruk, Natallia N. Furik, Yuliya S. Tarashkevich, Tamara A. Savelyeva

Institute for the Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

CONSTRUCTION OF SPECIFIC PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF *LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES* SUBSPECIES

Abstract: Bacteria p. *Leuconostoc* is a technologically important group of lactic acid bacteria that is part of starter cultures for production of various dairy products. Two species are most important in the dairy industry: *Leuconostoc lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*, which includes three subspecies: *dextranicum*, *mesenteroides* and *cremoris*. The main problem of identifying representatives of the p. *Leuconostoc* that these microorganisms can often be misidentified as enterococci or lactobacilli. In comparison with traditional methods of species detection, the establishment of species identity using PCR is characterized by universality, a deeper level of species differentiation, high reproducibility and reliability. The article presents the results of designing specific primers for *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* and *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*. The specificity of developed primers was confirmed by *in silico* testing using available *Leuconostoc mesenteroides* genomic sequences, and experimentally using DNA samples of *Leuconostoc mesenteroides* clear cultures. The taxonomic affiliation of 5 isolates of leuconostocci isolated from natural samples was established using the developed primers. Methodological Instructions have been developed that regulate the procedure for determining the taxonomic position of bacteria of genus *Leuconostoc* to a subspecies. Methodological guidelines for identification of leuconostocs will be used in collections of industrial microorganisms for the accurate identification of deposited strains. **Acknowledgments.** The research was carried out as part of the state program of scientific research “Quality and Efficiency of Agroindustrial Production”, sub-program 3 “Food security”.

Keywords: lactic acid bacteria, starter cultures, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, DNA, PCR, primers, dextransucrase

For citation: Biruk A.M., Furik N.N., Tarashkevich Y.S., Savelyeva T. A. Construction of specific primers for identification of *Leuconostoc mesenteroides* subspecies. *Vestsi Natsyyanal'nyay akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2020, vol. 58, no 2, pp. 244–256 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-2-244-256>

Введение. Бактерии р. *Leuconostoc* – важная в технологическом отношении группа молочно-кислых бактерий, входящая в состав заквасочных культур для производства кисломолочного масла, творога, сыров с низкой температурой второго нагревания. Лейконостоки применяются для регулирования вкуса и ароматообразования, формирования рисунка сыра. Лейконостоки входят в состав естественной микрофлоры кефирного грибка и играют большую роль в формировании его вкуса и запаха.

Лейконостоки – грамположительные факультативно-анаэробные неспорообразующие неподвижные молочнокислые гетероферментативные бактерии. В процессе своей жизнедеятельности лейконостоки продуцируют молочную и уксусную кислоту, углекислый газ, этиловый спирт, эфиры, ароматические вещества: ацетоин и диацетил. Лейконостоки образуют целый ряд экзополисахаридов: декстран, леван, инулин, альтернан, которые представляют большой практический интерес и используются в качестве пребиотиков, а также для капсулирования лекарственных препаратов (антиоксиданты, витамины, пробиотики и т.д.), в составе косметических средств и др. [1].

Род *Leuconostoc* объединяет девять видов. В молочной промышленности наибольшее значение имеют два вида: *Leuconostoc lactis* и *Leuconostoc mesenteroides*, они включают три подвида: *dextranicum*, *mesenteroides*, *cremoris* [2, 3]. При культивировании микроорганизмов *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* и *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum* в среде, содержащей сахарозу или другие углеводы, получают декстран [4–7]. Декстраны широко используются в качестве заменителя плазмы крови, повышения вязкости растворов в молочной и пищевой промышленности, для изготовления сефадекса, используемого в биохимической промышленности.

В производстве сыров с низкими температурами второго нагревания, сыров типа Рокфор и кисломолочных сыров обычно используют *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*. От других видов и подвигов лейконостоков его отличает низкая метаболическая активность, повышенная чувствительность к внешним факторам и очень сложные питательные потребности, особенно в аминокислотах. Дополнительным отличием подвида *cremoris* является расположение большого количества клеток в виде длинных цепочек, тогда как клетки других лейконостоков расположены по одиночке и в виде коротких цепочек. *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* применяют также при производстве стойкого к хранению масла [2]. Лейконостоки относятся к газообразующей микрофлоре заквасок. Главное отличие лейконостоков от лактококков – гетероферментативность сбраживания лактозы с образованием D(–)-молочной кислоты, уксусной кислоты, этанола и CO₂; при сбраживании лактозы и цитратов лейконостоки образуют диацетил и ацетоин. У диацетильного лактококка способность образовывать диацетил и ацетоин может быть утрачена, у лейконостоков она является стабильным свойством, так как закодирована в хромосомах [8, 9]. Бактериофаги лейконостоков практически не распространены на сыродельных заводах. Кроме того, лейконостоки начинают размножаться после свертывания молока, когда условия для репродукции бактериофагов неблагоприятны. В связи с этим закваски с лейконостоками обеспечивают более стабильное формирование рисунка в сырах [10]. При совместном развитии с лактококками лейконостоки стабилизируют содержание диацетила, снижают уровень ацетона, увеличивают уровень уксусной кислоты и этанола, способствуют снижению накопления горьких пептидов в сырах. Среди лейконостоков часто встречаются культуры с выраженным антагонистическим действием на БГКП. Многие штаммы лейконостоков обладают выраженной специфической антибиотической активностью не только по отношению к бактериям группы кишечной палочки, но и к психротрофным бактериям [11–15].

Филогенетически лейконостоки входят в группу *Lactobacilli*, куда включены еще два рода: *Lactobacillus* и *Pediococcus*, однако генетически лейконостоки находятся в более тесном родстве с некоторыми гетероферментативными палочками (*Lb. confusus*, *Lb. viridescens* и др.). Основная проблема идентификации представителей р. *Leuconostoc* состоит в том, что данные

микроорганизмы часто могут быть ошибочно идентифицированы как энтерококки или лактобактерии. Альтернативой классической биохимической идентификации могут служить современные молекулярно-генетические методы. В настоящее время для идентификации микроорганизмов используется полифазный подход, который заключается в объединении всех возможных данных как фенотипического, так и генетического характера с целью получения достоверной идентификации. По сравнению с традиционными способами видовой детекции установление видовой принадлежности с помощью ПЦР отличается универсальностью, более глубоким уровнем видовой дифференциации, высокой воспроизводимостью и степенью достоверности, что обосновывает актуальность применения данных методов [16–23]. ПЦР с видоспецифичными праймерами по специфичности, чувствительности, скорости проведения анализа превосходит метод МЭЖК. Доступность баз данных, хранящих информацию о структуре генов различных организмов, дает возможность при разработке специфичных праймеров наиболее полно учитывать и использовать вариабельность анализируемых последовательностей нуклеотидов, что позволяет обеспечить высокую специфичность диагностических систем, создаваемых на их основе [24]. В научных публикациях приводятся данные об использовании мультиплексного ПЦР-анализа для идентификации лейконостоков до вида. Lee H. с соавт. [25] разработаны специфичные праймеры для 5 видов лейконостоков: *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum* и *Leuconostoc lactis*. Для идентификации подвидов *Leuconostoc mesenteroides* используют методы ДНК-типирования (Rep-PCR, RAPD, RFLP-PCR) [26–28]. Однако для идентификации близкородственных видов и подвидов с небольшой степенью вариабельности строения гена 16S рРНК, ПЦР с видоспецифичными праймерами предпочтительнее даже секвенирования. В связи с этим актуальна разработка точных и надежных методов идентификации подвидов *Leuconostoc mesenteroides* с использованием специфичной ПЦР.

Цель исследования – разработка специфичных праймеров для идентификации подвидов *Leuconostoc mesenteroides*.

Материалы и методы исследований. Исследования по конструированию специфичных праймеров для идентификации подвидов *Leuconostoc mesenteroides* проводили в отделе биотехнологий Института мясо-молочной промышленности Национальной академии наук Беларуси в 2016–2018 гг. В работе использовали 9 коллекционных штаммов лейконостоков из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов (423 MH-ODG, 412 MH-ODG, 417 MH-ODG, 430 MH-ODG, 418 MH-ODG, 426 MH-ODG, 427 MH-ODG, 410 MH-ODG, 413 MH-ODG) и изоляты лейконостоков, выделенные из природных источников и идентифицированные с использованием стрип-системы API 50CH (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Изоляты лейконостоков, выделенные из природных источников
T a b l e 1. *Leuconostoc* isolates expressed from natural sources

Номер изолята	Источник выделения	Видовая принадлежность
p1427/1-1-3-3	Растение клевера узколистного (<i>Trifolium angustifolium</i>), д. Колядичи, Пружанский р-н, Брестская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1427/3-4-2		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1445/1-3-3	Растение сердечника (<i>Cardamine</i>), хутор Родевичи, Вороновский р-н, Гродненская обл.	<i>Leuconostoc citreum</i>
p1464/2-1-3-2	Плоды яблони (<i>Malus domestica</i>), д. Колядичи, Пружанский р-н, Брестская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1465/1-5-2	Плоды яблони (<i>Malus domestica</i>), д. Колядичи, Пружанский р-н, Брестская обл.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
p1465/3-2-2-1		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Бактериальные культуры выращивали в жидкой среде МРС. Выделение ДНК из бактериальных клеток проводили с использованием коммерческого набора «АртДНК MiniSpin» (ООО «АРТБиоТех») согласно инструкции производителя. Для проведения амплификации использовали реактивы и праймеры производства ОДО «Праймтех» (Беларусь).

Матрицы для секвенирования синтезировали с помощью ПЦР с использованием универсальных праймеров к гену 16S рРНК – 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rD1

(5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), что позволяло амплифицировать фрагменты размером 1500 п.н. Амплификацию осуществляли в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 1X АМ-буфер с $MgCl_2$, 200 мкМ dNTP; по 30 пМ прямого и обратного праймеров, 1 ед. *Taq*-полимеразы и матрицу ДНК. Оптимизированный протокол амплификации для праймеров 27f и rD1 включал следующие стадии: начальная денатурация – 4 мин при 95 °С; далее 30 циклов (денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг праймеров – 30 с при 55 °С, элонгация – 1 мин при 72 °С), завершали реакцию элонгацией при 72 °С в течение 2 мин. Очистку продуктов амплификации проводили путем вырезания из геля фрагментов ДНК размером 1500 п.н. с последующей их экстракцией с использованием набора реагентов «АртДНК MiniSpinГель» (ООО «АРТБиоТех»). Секвенирование фрагментов гена *l6S pPHK* исследуемых бактерий проводили на автоматическом секвенаторе GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter) с использованием набора для секвенирования GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter). Сходство нуклеотидных последовательностей исследовали с использованием базы данных GenBank при помощи анализатора BLAST Национального центра биотехнологической информации США¹. Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения MEGA². Для построения филогенетических деревьев использовали метод «объединения соседей» (Neighbor-Joining).

Нуклеотидные последовательности бактерий р. *Leuconostoc* заимствовали из представленных в свободном доступе нуклеотидных последовательностей базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) (табл. 2). Для выравнивания отдельных кодирующих последовательностей при подборе праймеров использовали программное обеспечение MEGA. Конструирование специфичных праймеров осуществляли вручную, а также с использованием компьютерной программы Primer-BLAST³. Расчет основных параметров нуклеотидов и возможность образования вторичных структур анализировали с помощью программы OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Т а б л и ц а 2. Нуклеотидные последовательности бактерий р. *Leuconostoc* из базы данных GenBank

Table 2. Nucleotide sequences of p. *Leuconostoc* bacteria from the GenBank database

Код доступа в GenBank	Видовая принадлежность штаммов
NC008531.1, NC016805.3, AP017936.1, CP000574.1, CP012009.1, CP013016.1, CP014610.1, CP020731.1, CP021966.1, CP015442.1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
CP016598.1, NQLF01000001.1	<i>Leuconostoc lactis</i>
NC010471.1, LM993654.1, LN589840.1, CP024929.1	<i>Leuconostoc citreum</i>
NC014136.1	<i>Leuconostoc kimchii</i>
NC014319.1, NC018631.1, LN890331.1	<i>Leuconostoc gelidum</i>
NC018673.1	<i>Leuconostoc carnosum</i>

Амплификацию со специфичными праймерами (Lmes-f/Lmes-r, Ldex-f/Ldex-r, Llac-f/Llac-r) осуществляли в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 1X АМ-буфер с $MgCl_2$, 200 мкМ dNTP, 60 пМ праймера, 1 ед. *Taq*-полимеразы и матрицу ДНК. В отрицательный контроль матрицу не добавляли. Оптимальную температуру отжига сконструированных праймеров определяли экспериментально постановкой градиентной ПЦР. Оптимизированный протокол амплификации для праймеров Lmes-f и Lmes-r включал следующие стадии: начальная денатурация – 3 мин при

¹ Gene [Electronic resource] // National Center for Biotechnology Information. Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Date of access: 09.08.2018.

² MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 / K. Tamura [et al.] // Molecular Biology and Evolution. 2013. Vol. 30, N 12. P. 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // Molecular Biology and Evolution. 2018. Vol. 35, N 6. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

³ Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / J. Ye [et al.] // BMC Bioinformatics. 2012. Vol. 13, N 1. P. 134–144. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

94 °C, 30 циклов (денатурация – 30 с при 94 °C, отжиг праймеров – 30 с при 53 °C, элонгация – 1,5 мин при 72 °C). Завершали реакцию элонгацией при 72 °C в течение 5 мин. Амплификацию с праймерами Ldex-f и Ldex-r проводили по аналогичному протоколу, за исключением температуры отжига (55 °C) и длительности элонгации внутри цикла (1 мин). Амплификация с праймерами Llac-f и Llac-r отличалась только температурой отжига праймеров (59 °C). ПЦР проводили в термоциклере MJ MiniTM (Bio-Rad).

Продукты амплификации смешивали с интеркалирующим красителем UView 6x Loading Dye (Bio-Rad) и разделяли с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с использованием 1X TAE буфера. Для документирования результатов электрофореза использовали систему GelDoc XR+ (Bio-Rad). Размеры фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в геле, в качестве маркера молекулярного веса использовали M1Kb (ОДО «Праймтех»).

Результаты и их обсуждение. На первом этапе наших исследований было проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК 9 коллекционных штаммов лейконостоков и 6 изолятов лейконостоков для подтверждения их видовой принадлежности, поскольку для постановки специфичной ПЦР необходимо иметь ДНК целевого микроорганизма. Полученные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК исследуемых бактерий сравнивали с последовательностями из базы данных GenBank с помощью программы BLAST. Изучаемые штаммы лейконостоков оказались близки ко всем трем подвидам вида *Leuconostoc mesenteroides*: *mesenteroides*, *dextranicum* и *cremoris*. Максимальный уровень сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК исследуемых культур с представленными в GenBank последовательностями бактерий *Leuconostoc mesenteroides* достигал 93–99 % в зависимости от штамма, что позволило отнести девять коллекционных штаммов лейконостоков к виду *Leuconostoc mesenteroides*. Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 1. Идентифицировать исследуемые культуры до подвида не возможно ввиду того, что в состав устойчивого кластера входят разные подвиды, что неприемлемо для точной идентификации.

Результаты филогенетического анализа шести изолятов лейконостоков представлены на рис. 2, 3. В результате исследований пять изолятов (p1427/1-1-3-3, p1427/3-4-2, p1464/2-1-3-2, p1465/1-5-2, p1465/3-2-2-1) были отнесены к виду *Leuconostoc mesenteroides*, один изолят (p1445/1-3-3) – к виду *Leuconostoc citreum*. Видовая принадлежность исследуемых культур была подтверждена результатами ПЦР со специфичными праймерами Lmes-f (5'-AACTTAGTGTGCGCATGAC-3') и Lmes-r (5'-AGTCGAGTTACAGACTACAA-3'), размер ПЦР-продукта 1150 п.н., опубликованными в работе Lee H. с соавт. [25]. У всех культур, идентифицированных как *Leuconostoc mesenteroides*, обнаружен ПЦР продукт размером около 1150 п.н., в случае с изолятом p1445/1-3-3, который по результатам секвенирования отнесен к виду *Leuconostoc citreum*, данный продукт зафиксирован не был, что подтверждает специфичность праймеров Lmes-f и Lmes-r (рис. 4).

Поскольку для двух коллекционных штаммов 412 МН-ODG и 410 МН-ODG результаты секвенирования не совпали с результатами биохимической идентификации (с помощью стрип-тестов API 50CH они идентифицированы как *Leuconostoc lactis*), была проведена амплификация с праймерами специфичными к виду *Leuconostoc lactis*. На рис. 5 представлена электрофореграмма продуктов амплификации, полученных в реакции с праймерами Llac-f (5'-AGGCGGCTTACTGGACAAC3') и Llac-r (5'-CTTAGACGGCTCCTTCCAT-3'), размер ПЦР-продукта 742 п.н. [25]. Как видно из представленных данных, ни в одной из реакций не был синтезирован продукт размером 742 п.н., что подтверждает результаты идентификации, полученные методом секвенирования последовательности гена 16S рРНК.

Одним из наиболее важных этапов при разработке специфичных праймеров является выбор участков ДНК, одинаковых у бактерий одного подвида и обладающих низким уровнем сходства с близкородственными подвидами. Известно, что подвиды *mesenteroides* и *dextranicum* генетически сходны и отличаются от подвида *cremoris* способностью к синтезу декстрана под действием декстрансахаразы [4, 5]. Поэтому в качестве мишени для конструирования специфических праймеров для ПЦР-детекции подвидов *Leuconostoc mesenteroides* был выбран ген dsrT (GenBankID: AB020 020.1), кодирующий декстрансахаразу и присутствующий в геномах под-

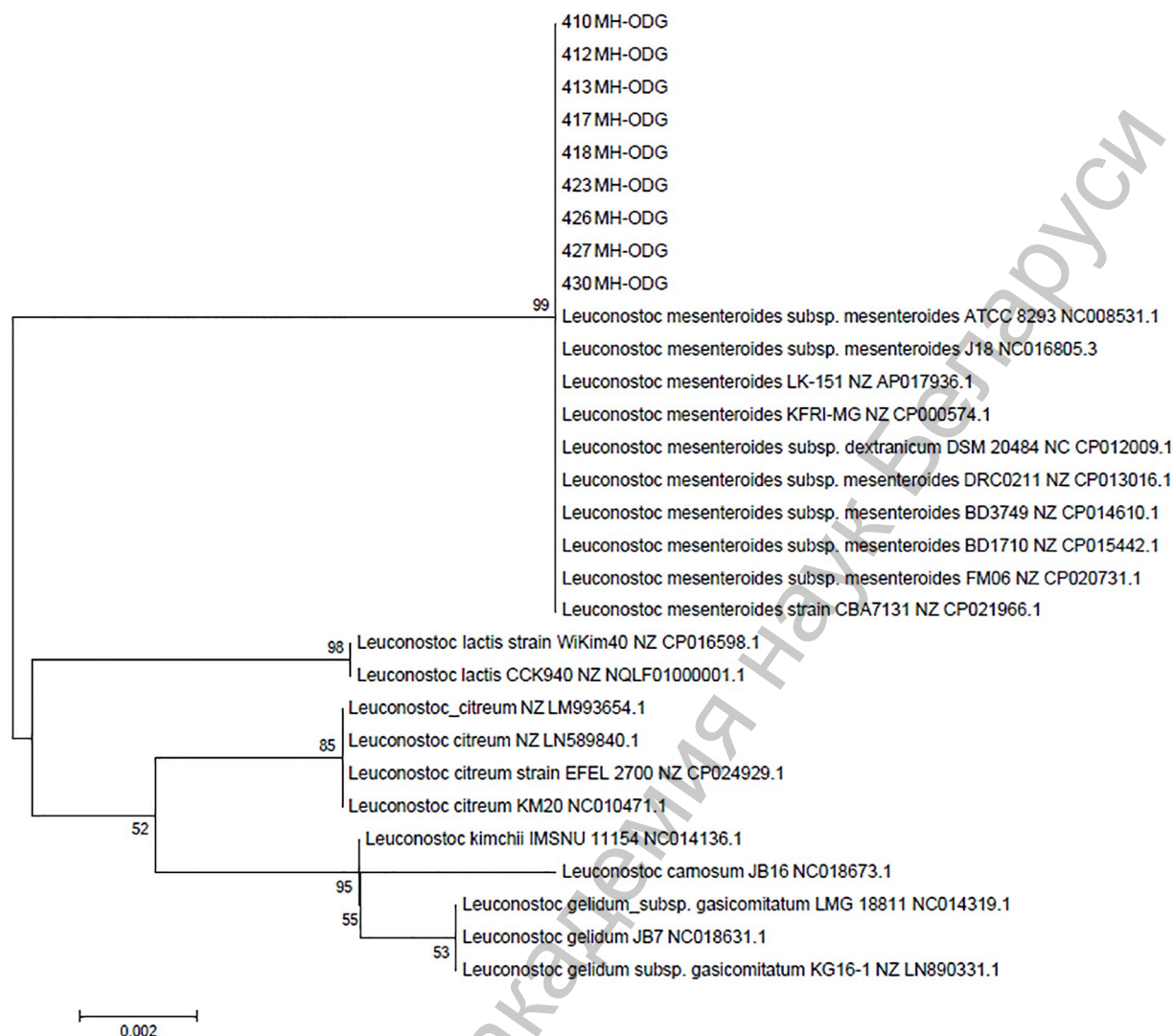


Рис. 1. Филогенетическое дерево, отражающее родственные связи коллекционных штаммов лейконостоков с референтными штаммами, представленными в GenBank

Fig. 1. Phylogenetic tree reflecting relationship of collection leuconostoc strains to reference strains presented in GenBank

видов *mesenteroides* и *dextranicum*. С использованием программы Primer-BLAST (on-line) были сконструированы последовательности прямого Ldex-f (5'-ТАСТТААТСТГСАССААСА-3') и обратного Ldex-r (5'-ТТГССАТСТАТТГАССАТСА-3') праймеров. На рис. 6 представлены области расположения прямого и обратного праймеров на последовательности гена, кодирующего декстрансахаразу. Регион фланкированный Ldex-f (5'-ТАСТТААТСТГСАССААСА-3') и Ldex-r (5'-ТТГССАТСТАТТГАССАТСА-3') составляет 810 п.н. Оба праймера содержат 40 % ГЦ-пар и имеют температуру плавления 52 °C (по данным программы Primer-BLAST). Предварительный анализ специфичности *in silico* сконструированных нами праймеров показал наличие продуктов амплификации только с ДНК бактерий *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* и *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum*.

В ходе оптимизации условий амплификации было установлено, что праймеры Ldex-f и Ldex-r работают специфически в реакционной смеси со стандартной концентрацией $MgCl_2$ (2,0 ммоль). Также была проведена оптимизация температуры отжига праймеров, так как проведение ПЦР при оптимальной температуре обеспечивает как специфичность, так и эффективность процесса синтеза ампликонов. Для оптимизации использовали температурный градиент 52–59 °C, остальные параметры ПЦР оставили без изменений. На рис. 7, а видно, что существенной разницы в синтезе продуктов ПЦР при разных температурах отжига, праймеров нет,

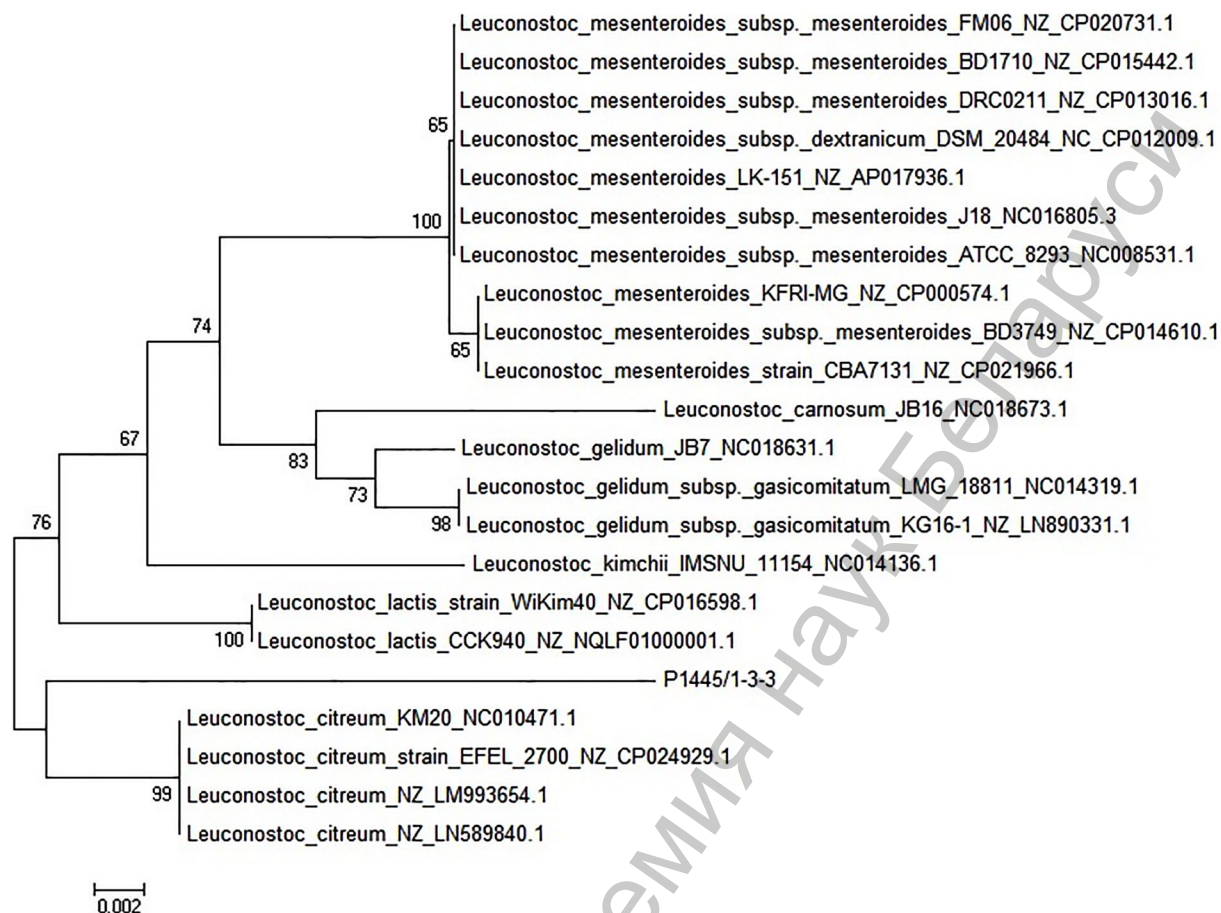


Рис. 2. Филогенетическое дерево, отражающее родственные связи изолятов лейконостоков p1427/1-1-3-3, p1427/3-4-2, p1464/2-1-3-2, p1465/1-5-2, p1465/3-2-2-1 с референтными штаммами, представленными в GenBank

Fig. 2. Phylogenetic tree reflecting relationship of leuconostoc isolates p1427/1-1-3-3, p1427/3-4-2, p1464/2-1-3-2, p1465/1-5-2 and p1465/3-2-2-1 with reference strains presented in GenBank

поэтому в дальнейшем амплификацию с праймерами Ldex-f и Ldex-r проводили при температуре отжига, близкой к расчетной (55 °C). Для определения чувствительности реакции в ПЦР-смесь добавляли разное количество геномной ДНК: от 25 до 100 нг (концентрацию ДНК определяли электрофоретическим методом). Исходя из данных, представленных на рис. 7, b, за 30 циклов ПЦР стабильно детектируется 75–100 нг ДНК.

С помощью сконструированных нами специфичных праймеров Ldex-f и Ldex-r была установлена таксономическая принадлежность 9 штаммов и 5 изолятов, отнесенных по результатам секвенирования последовательности гена 16S рРНК к виду *Leuconostoc mesenteroides*. Целевые продукты ПЦР размером 810 п.н. обнаружены в пяти образцах с ДНК, выделенной из изолятов p1427/1-1-3-3, p1427/3-4-2, p1464/2-1-3-2, p1465/1-5-2, p1465/3-2-2-1, что свидетельствует о принадлежности данных изолятов к подвидам *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* и *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum* (рис. 8). Отсутствие ПЦР-продукта размером 810 п.н. в образцах с ДНК, выделенной из штаммов лейконостоков, которые по результатам секвенирования идентифицированы как *Leuconostoc mesenteroides*, позволяет отнести данные штаммы к подвиду *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*.

По итогам исследований была разработана схема идентификации подвидов *Leuconostoc mesenteroides*. На первом этапе для идентификации бактерий до вида проводят ПЦР с видоспецифичными праймерами Lmes-f (5'-AACTTAGTGTGCGCATGAC-3') и Lmes-r (5'-AGTCGAGTTACAGACTACAA-3'), температура отжига – 53 °C. Наличие ПЦР-продукта размером около 1150 п.н. свидетельствует о принадлежности исследуемого образца к виду *Leuconostoc mesenteroides*. Для идентификации подвидов *Leuconostoc mesenteroides* используют пару праймеров Ldex-f (5'-TACTTAATCGCACACCAACA-3')

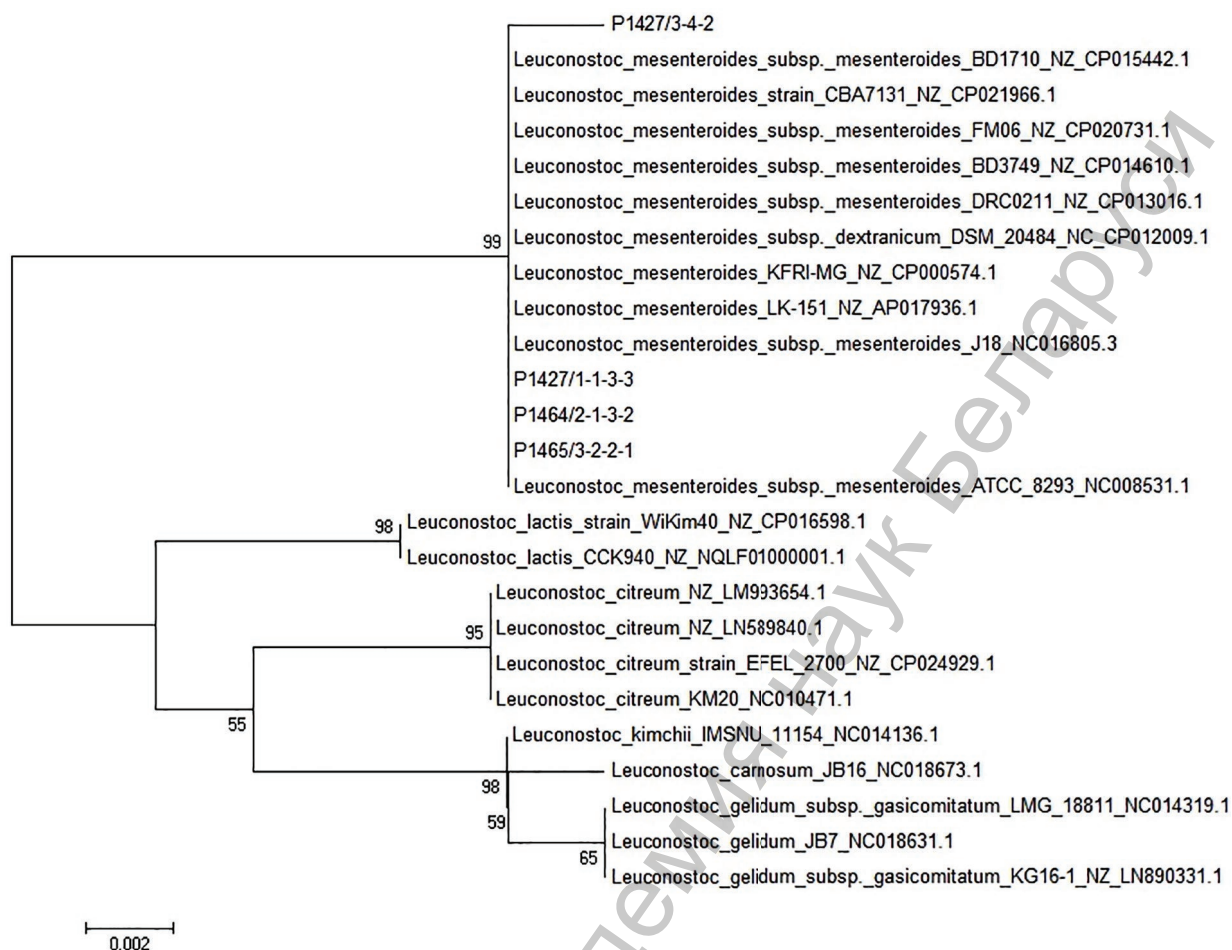


Рис. 3. Филогенетическое дерево, отражающее родственные связи изолята лейконостоков p1445/1-3-3 с референтными штаммами, представленными в GenBank

Rice. 3. Phylogenetic tree reflecting relationship of leuconostoc isolate p1445/1-3-3 with reference strains presented in GenBank

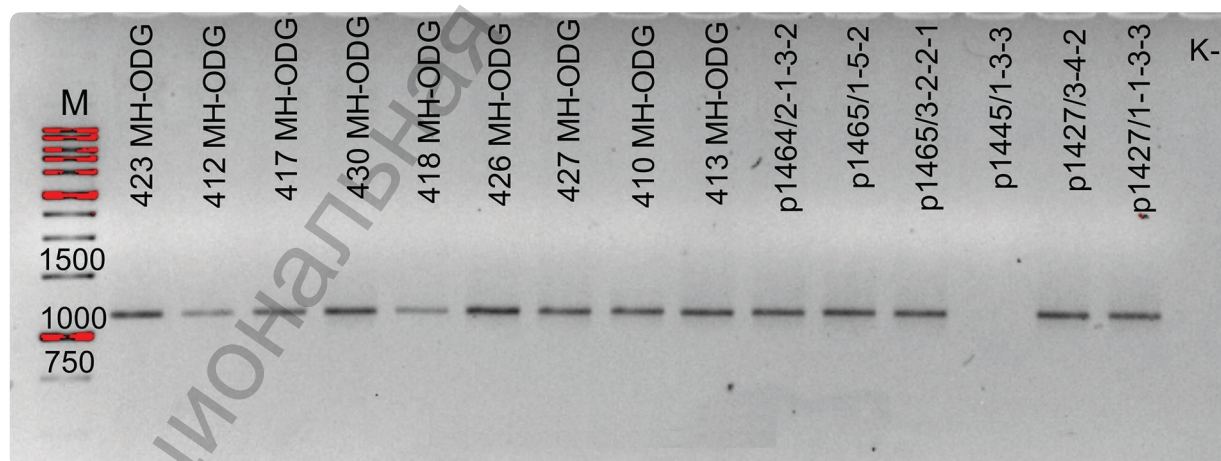


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Lmes-f и Lmes-r

Fig. 4. Electrophoregram of amplification products with Lmes-f and Lmes-r primers

и Ldex-r (5'-TTGCCATGTATTGACCATCA-3'), температура отжига – 55 °C. Наличие ПЦР-продукта размером около 810 п.н. позволяет отнести исследуемые культуры к подвидам *mesenteroides* и *dextranicum*. Если в результате амплификации ПЦР-продукт отсутствует, исследуемые культуры относят к подвиду *cremoris*.

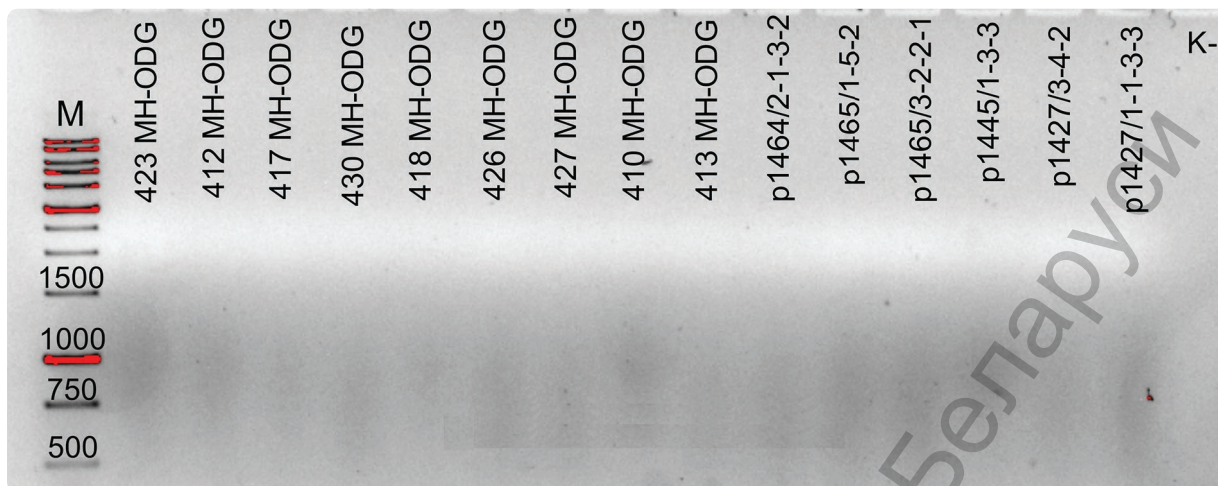


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Llac-f и Llac-r
Fig. 5. Electrophoretogram of amplification products with Llac-f and Llac-r primers

DNA Sequences	Translated Protein Sequences	2396	Ldex-f	2415
Species/Abbrv		Gr		
1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> AB020020.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 CP000414.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> FM06 CP020731.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
4. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM102733 CP028251.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
5. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> BD3749 CP014610.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
6. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LK-151 AP017936.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
7. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18 CP003101.3		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
8. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> BD1710 CP015442.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
9. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> DRC0211 CP013016.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		
10. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM103453 CP035271.1		TTATCGATTACTTAATCGCACACCAACAAATCAAACAGGCACGCCTTTGT		

DNA Sequences	Translated Protein Sequences	3186	Ldex-r	3205
Species/Abbrv		Gr		
1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> AB020020.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293 CP000414.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
3. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> FM06 CP020731.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
4. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM102733 CP028251.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
5. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> BD3749 CP014610.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
6. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LK-151 AP017936.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
7. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> J18 CP003101.3		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
8. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> BD1710 CP015442.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
9. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> DRC0211 CP013016.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		
10. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM103453 CP035271.1		TGTACTATGGGATATGTATACAGATGATGGTCAATACATGGCAACAAAGT		

Рис. 6. Расположение пары праймеров Ldex-f и Ldex-r на участке гена dsrT, кодирующего декстрансахаразу
Fig. 6. Location of pair of Ldex-f and Ldex-r primers on the dsrT gene section encoding dextransucrase

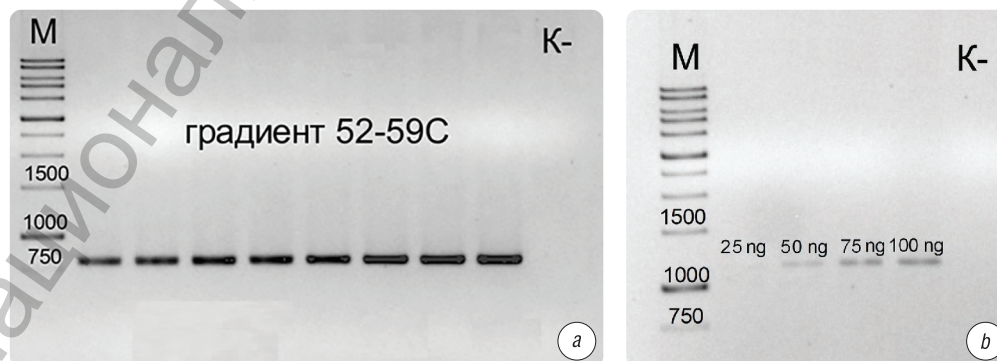


Рис. 7. Электрофореграммы: а – продуктов градиентной ПЦР с праймерами Ldex-f и Ldex-r; б – продуктов амплификации с разным количеством ДНК

Fig. 7. Electrophoregrams: а – electrophoregram of gradient PCR products with Ldex-f and Ldex-r primers; б – electrophoregram of amplification products with different DNA amount

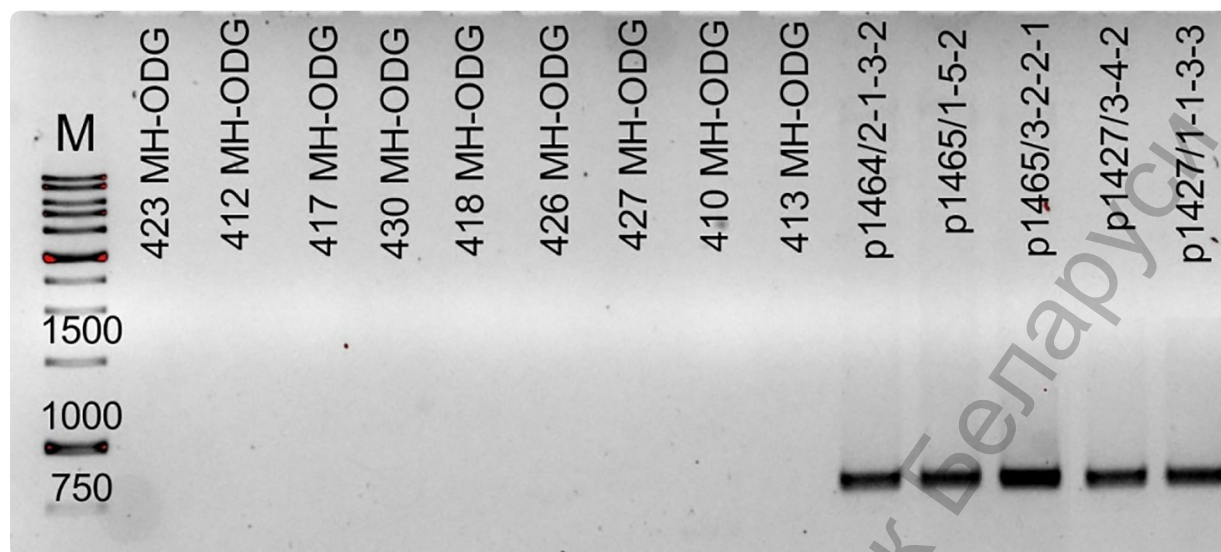


Рис. 8. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами Ldex-f и Ldex-r
Fig.8. Electrophoretogram of amplification products with Ldex-f and Ldex-r primers

Заклучение. Важнейшей задачей при выделении производственно-ценных штаммов заквасочных культур является их точная таксономическая идентификация. В настоящее время наряду с традиционными методами идентификации широко используются методы, основанные на исследовании нуклеотидных последовательностей различных генов микроорганизмов. Часто для идентификации используют гены, кодирующие 16S и 23S рибосомальные РНК, поскольку они присутствуют во всех бактериальных клетках и являются видоспецифичными для большинства микроорганизмов. Однако для идентификации близкородственных подвидов *Leuconostoc mesenteroides*, с небольшой степенью вариабельности строения гена 16S рРНК, ПЦР со специфичными праймерами предпочтительнее секвенирования.

Таким образом, в результате проведенных исследований сконструированы специфичные нуклеотидные праймеры, обеспечивающие точную таксономическую идентификацию промышленно значимых подвидов лейконостоков: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Специфичность разработанных праймеров подтверждена тестированием *in silico* с использованием доступных геномных последовательностей *Leuconostoc mesenteroides* и экспериментально с использованием образцов ДНК чистых культур *Leuconostoc mesenteroides*. С помощью разработанных праймеров установлена таксономическая принадлежность 5 изолятов лейконостоков, выделенных из природных образцов; разработана схема идентификации подвидов *Leuconostoc mesenteroides*.

На основании полученных результатов разработаны методические указания, регламентирующие процедуру определения таксономического положения бактерий р. *Leuconostoc* до подвида. Методические указания по идентификации лейконостоков будут использоваться в коллекциях промышленных микроорганизмов для точной идентификации депонируемых штаммов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Качество и эффективность агропромышленного производства», 2016–2020 гг., подпрограмма 3 «Продовольственная безопасность».

Список использованных источников

1. Хусаинов, И. А. Современные представления о биосинтезе бактериальных экзополисахаридов / И. А. Хусаинов // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2014. – Т. 17, № 5. – С. 167–172.
2. Степаненко, П. П. Микробиология молока и молочных продуктов / П. П. Степаненко – Сергиев Посад : Все для Вас – Подмоскoвье, 1999. – 415 с.
3. Bergey's manual of systematic bacteriology. – 2nd ed. – New York : Springer, 2012. – Vol. 5 : The Actinobacteria / ed.: W. Whitman [et al.]. – 2083 p. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>.
4. Rosi, N. L. Nanostructures in bionanotechnology / N. L. Rosi, C. A. Mirkin // Chem. Rev. – 2005. – Vol. 105, N 4. – P. 1547–1562. <https://doi.org/10.1021/cr030067f>

5. The atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) method on the dextranase activity and structure / X. Wang [et al.] // Intern. J. of Biol. Macromolecules. – 2014. – Vol. 70 – P. 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2014.07.006>
6. Otts, D.R. Dextranucrase secretion in *Leuconostoc mesenteroides* depends on the presence of a transmembrane proton gradient / D.R. Otts, D.F. Day // J. of Bacteriology. – 1988. – Vol. 170, N 11. – P. 5006–5011. <https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5006-5011.1988>
7. Erten, H. Fermentation of glucose and fructose by *Leuconostoc mesenteroides* / H. Erten // Tur. J. of Agriculture a. Forestry. – 2000. – Vol. 24, №4. – P. 527–532.
8. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А.В. Гудков ; под ред. С.А. Гудкова. – М. : ДеЛи принт, 2003. – 799 с.
9. Carbon dioxide production by *Leuconostoc mesenteroides* grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skimmed milk / M. Kihal [et al.] // World J. of Dairy a. Food Sciences. – 2007. – Vol. 2, N 2. – P. 62–68.
10. Шергин, Н.А. Улучшение качества сыров группы голландского путем совершенствования отбора лейко-ностоков в закваски : дис. ... канд. тех. наук : 05.18.04 / Н.А. Шергин. – Углич, 1985. – 246 л.
11. Dundar, H. Purification and characterization of a bacteriocin from an oenological strain of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* / H. Dundar, B. Salih, F. Bozoğlu // Preparative Biochemistry a. Biotechnology. – 2016. – Vol. 46, N 4. – P. 354–359. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1031395>
12. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides* / Y. Hechard [et al.] // J. of General Microbiology. – 1992. – Vol. 138, N 12. – P. 2725–2731. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-12-2725>
13. Aziz, R.A. Antibacterial effect of bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* against diarrheal causative bacteria / R.A. Aziz, J.A. S. Salman, O.A. H. Hachim // Europ. J. of Biomed. a. Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 3, N 11. – P. 114–118.
14. Сорокина, Н.П. Производство ферментированных молочных продуктов и сыров: состав и свойства заквасочной микрофлоры / Н.П. Сорокина, И.В. Кучеренко // Молоч. пром-сть. – 2013. – №6. – С. 38–40.
15. Сорокина, Н.П. Бактериальные закваски для производства сыров / Н.П. Сорокина, Е.В. Кураева, И.В. Кучеренко // Сыроделие и маслоделие. – 2016. – №4. – С. 26–31.
16. Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспресс-методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы / И.В. Соловьева [и др.] // МедиАль. – 2014. – №2 (12). – С. 29–44.
17. Точилина, А.Г. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus* : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 ; 03.00.07 / А.Г. Точилина. – Н. Новгород, 2009. – 148 л.
18. Chentouf, H.F. Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk / H.F. Chentouf, B. Zineb // Afr. J. of Microbiology Research. – 2013. – Vol. 7, N 23. – P. 2961–2969. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.5753>
19. Dimic, G. Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables / G. Dimic // Acta Periodica Technologica. – 2006. – N 37. – P. 3–11. <https://doi.org/10.2298/apt0637003d>
20. De Man, J.C. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* / J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe // J. of Appl. Bacteriology. – 1960. – Vol. 23, N 1. – P. 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
21. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides* / M. S. Negi [et al.] // Genome. – 2002. – Vol. 45, N 6. – P. 1181–1188. <https://doi.org/10.1139/g02-094>
22. Marmiroli, N. Advanced PCR techniques in identifying food components / N. Marmiroli, C. Peano, E. Maestri // Food authenticity and traceability / ed. M. Lees. – Boca Raton ; Cambridge, 2003. – P. 3–33. <https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.3>
23. A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation / U. Schillinger [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 2008. – Vol. 286, N 2. – P. 222–226. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01286.x>
24. Евдокимова, О.В. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦР / О.В. Евдокимова, В.Е. Мямин, Л.Н. Валентович // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2016. – Т. 21. – С. 53–63.
25. Lee, H.-J. Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species / H.-J. Lee, S.-Y. Park, J. Kim // FEMS Microbiology Letters. – 2000. – Vol. 193, N 2. – P. 243–247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09431.x>
26. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis / G. Moschetti [et al.] // Appl. a. Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66, N 1. – P. 422–424. <https://doi.org/10.1128/aem.66.1.422-424.2000>
27. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis / J. Jang [et al.] // J. of Microbiol. Methods. – 2003. – Vol. 55, N 1. – P. 295–302. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00162-3](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00162-3)
28. Bendimerad, N. Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation / N. Bendimerad, M. Kihal, F. Berthier // Dairy Science a. Technology. – 2012. – Vol. 92, N 3. – P. 249–264. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0063-8>

References

1. Khusainov I.A. Current ideas about the biosynthesis of bacterial exopolysaccharides. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of the Kazan Technological University], 2014, vol. 17, no. 5, pp. 167–172 (in Russian).
2. Stepanenko P.P. *Microbiology of milk and dairy products*. Sergiev Posad, Vse dlya Vas - Podmoskov'e Publ., 1999. 415 p (in Russian).

3. Whitman W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K.-I. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 5. The Actinobacteria*. 2nd ed. New York, Springer, 2012. 2083 p. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>
4. Rosi N. L., Mirkin C. A. Nanostructures in bionanotechnology. *Chemical Reviews*, 2005, vol. 105, no. 4, pp. 1547-1562. <https://doi.org/10.1021/cr030067f>
5. Wang X., Lu M., Wang S., Fang Y., Wang D., Ren W., Zhao G. The atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) method on the dextranase activity and structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, vol. 70, pp. 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.006>
6. Otts D. R., Day D. F. Dextranase secretion in *Leuconostoc mesenteroides* depends on the presence of a transmembrane proton gradient. *Journal of Bacteriology*, 1988, vol. 170, no. 11, pp. 5006-5011. <https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5006-5011.1988>
7. Erten H. Fermentation of glucose and fructose by *Leuconostoc mesenteroides*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2000, vol. 24, no. 4, pp. 527-532.
8. Gudkov A. V. *Cheese making: technological, biological and physico-chemical aspects*. Moscow, DeLi print Publ., 2003. 799 p. (in Russian).
9. Kihal M., Prevost H., Henni D. E., Benmechene Z., Diviès C. Carbon dioxide production by *Leuconostoc mesenteroides* grown in single and mixed culture with *Lactococcus lactis* in skimmed milk. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 2007, vol. 2, no. 2, pp. 62-68.
10. Shergin N. A. Improving the quality of Dutch-type cheeses by improving the selection of *Leuconostoc* in starter cultures. Ph.D. Thesis. Uglich, 1985. 246 p. (in Russian).
11. Dunder H., Salih B., Bozdoğan F. Purification and characterization of a bacteriocin from an oenological strain of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2016, vol. 46, no. 4, pp. 354-359. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1031395>
12. Hechard Y., Derijard B., Letellier F., Cenatiempo Y. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology*, 1992, vol. 138, no. 12, pp. 2725-2731. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-12-2725>
13. Aziz R. A., Salman J. A. S., Hachim O. A. H. Antibacterial effect of bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* against diarrheal causative bacteria. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2016, vol. 3, no. 11, pp. 114-118.
14. Sorokina N. P., Kucherenko I. V. Production of fermented milk products and cheeses: composition and properties of starters microflora. *Molochnaya promyshlennost' = Dairy Industry*, 2013, no. 6, pp. 38-40 (in Russian).
15. Sorokina N. P., Kuraeva E. V., Kucherenko I. V. Bacterial starters for cheese production. *Syrodellie i maslodellie = Cheesemaking and Oilmaking*, 2016, no. 4, pp. 26-31 (in Russian).
16. Solov'eva I. V., Tochilina A. G., Belova I. V., Novikova N. A., Ivanova T. P. The lactobacillus biological properties. Prospects of express-methods nucleic acid amplification for the foods, food supplements and drugs on its basis quality control. *Medial' = Medial*, 2014, no. 2 (12), pp. 29-44 (in Russian).
17. Tochilina A. G. Biochemical and molecular genetic identification of bacteria of *Lactobacillus* genus. Ph.D. Thesis. Nizhny Novgorod, 2009. 148 p. (in Russian).
18. Chentouf H. F., Zineb B. Isolation and identification of *Leuconostoc mesenteroides* producing bacteriocin isolated from Algerian raw camel milk. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, vol. 7, no. 23, pp. 2961-2969. <https://doi.org/10.5897/ajmr2013.5753>
19. Dimic G. Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables. *Acta Periodica Technologica*, 2006, no. 37, pp. 3-11. <https://doi.org/10.2298/apt0637003d>
20. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, vol. 23, no. 1, pp. 130-135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
21. Negi M. S., Rajagopal J., Chauhan N., Cronn R., Lakshmikumaran M. Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides*. *Genome*, 2002, vol. 45, no. 6, pp. 1181-1188. <https://doi.org/10.1139/g02-094>
22. Marmiroli N., Peano C., Maestri E. Advanced PCR techniques in identifying food components. *Food authenticity and traceability*. Boca Raton, Cambridge, 2003, pp. 3-33. <https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.3>
23. Schillinger U., Böhringer B., Wallbaum C., Caroline L., Gonfa A., Huch M., Holzapfel W. H., Franz C. M. A. P. A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, vol. 286, no. 2, pp. 222-226. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01286.x>
24. Evdokimova O. V., Myamin V. E., Valentovich L. N. Identification of *Bacillus pumilus* bacteria by using species-specific PCR assay. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and Applied Genetics: a collection of scientific papers]. Minsk, 2016, vol. 21, pp. 53-63 (in Russian).
25. Lee H.-J., Park S.-Y., Kim J. Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, vol. 193, no. 2, pp. 243-247. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09431.x>
26. Moschetti G., Blaiotta G., Villani F., Coppola S. Specific detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* with DNA primers identified by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, no. 1, pp. 422-424. <https://doi.org/10.1128/aem.66.1.422-424.2000>
27. Jang J., Kim B., Lee J., Han H. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, vol. 55, no. 1, pp. 295-302. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00162-3](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00162-3)
28. Bendimerad N., Kihal M., Berthier F. Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Science and Technology*, 2012, vol. 92, no. 3, pp. 249-264. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0063-8>

Информация об авторах

Бирюк Елена Николаевна – кандидат с.-х. наук, зав. лабораторией молекулярно-генетических и биохимических исследований отдела биотехнологий, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: biohimbel@rambler.ru

Фурик Наталья Николаевна – кандидат технических наук, заместитель директора по научной работе, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: furik_nn@tut.by

Тарашкевич Юлия Станиславовна – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических и биохимических исследований отдела биотехнологий, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (пр-т Партизанский, 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: julia10095@mail.ru

Савельева Тамара Александровна – кандидат ветеринарных наук, доцент, ученый секретарь, Институт мясо-молочной промышленности, Национальная академия наук Беларуси (Партизанский пр., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: t.savelyeva@tut.by

Information about authors

Alena M. Biruk - Ph.D. (Agricultural). The Institute for the Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus (Partizanskiy av. 172, 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: biohimbel@rambler.ru

Natallia N. Furik - Ph.D. (Engineering). The Institute for the Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus (Partizanskiy av. 172, 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: furik_nn@tut.by

Yuliya S. Tarashkevich - Postgraduate Student. The Institute for the Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus (Partizanskiy av. 172, 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: julia10095@mail.ru

Tamara A. Savelyeva - Ph.D. (Veterinary). The Institute for the Meat and Dairy Industry, the National Academy of Sciences of Belarus (Partizanskiy av. 172, 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: t.savelyeva@tut.by