

SCREENING PROCEDURE FOR TOTAL DNA EXTRACTION TO STUDY YEAST DIVERSITY BASED ON RAPD MOLECULAR MARKER

Nguyen Manh Tuyen¹, Vu Minh Chau², Tran Thi Thuy^{1*}

¹ Hanoi National University of Education, ² Xuan Phuong highschool

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	11/7/2025	The main advantage of DNA molecular markers, such as RAPD, RFLP, and STR, over morphological, physiological, and biochemical markers in diversity studies is their independence from the culture media and living conditions of organisms. However, the successful application of DNA molecular markers is often strongly dependent on the quality of the DNA obtained using the selected total DNA extraction method. In this study, total DNA samples from yeast strains isolated from natural honey and beeswax in Son La, Vietnam, were extracted according to procedures outlined by Lõoke and by da Silva-Filho. Both were compared to the total DNA extraction process (Control) using the commercial kit from Norgen Biotek™. The results indicated that the total DNA samples obtained from the procedure issued by Lõoke and by da Silva-Filho had concentrations ranging from 40 to 3300 ng/μL, which were equal to or higher than those obtained from the control procedure. Furthermore, the quality of these samples was sufficient to ensure successful PCR-RAPD using the primers M13 and (GTG) ₅ . Storing the total DNA samples extracted by the procedure proposed by Lõoke and by da Silva-Filho for 3 months at -20 °C did not adversely affect the PCR-RAPD results. Based on the findings, the Lõoke procedure was recommended for total DNA extraction from yeast for diversity studies due to its convenience, time efficiency, and reduced labor and chemical requirements.
Revised:	02/12/2025	
Published:	03/12/2025	
KEYWORDS		
DNA extraction		
Molecular marker		
RAPD		
Total DNA		
Yeast		

NGHIÊN CỨU LỰA CHỌN QUY TRÌNH TÁCH CHIẾT DNA TỔNG SỐ ĐỂ NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG NẤM MEN BẰNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ RAPD

Nguyễn Mạnh Tuyền¹, Vũ Minh Châu², Trần Thị Thúy^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, ²Trường trung học phổ thông Xuân Phương

THÔNG TIN BÀI BÁO		TÓM TẮT
Ngày nhận bài:	11/7/2025	Trong nghiên cứu đa dạng, các chỉ thị phân tử DNA như RAPD, RFLP, STR có ưu thế hơn các chỉ thị hình thái, sinh lí, sinh hóa do chúng không phụ thuộc vào điều kiện môi trường sống và dinh dưỡng của sinh vật. Tuy nhiên, thành công của việc sử dụng chỉ thị phân tử DNA thường phụ thuộc đáng kể vào chất lượng DNA thu được từ phương pháp chiết DNA tổng số sử dụng. Trong nghiên cứu này, DNA tổng số của các mẫu nấm men phân lập từ mật và sáp ong tự nhiên ở Sơn La, Việt Nam, được tách chiết theo quy trình của Lõoke và của da Silva-Filho. Kết quả được so sánh với quy trình tách chiết DNA tổng số sử dụng kit thương mại của Norgen Biotek™. Mẫu DNA tổng số thu được từ hai phương pháp trên đều đạt nồng độ (40 – 3300 ng/μL) cao hơn hoặc bằng quy trình sử dụng kit Norgen Biotek™. Các mẫu DNA này đều đạt chất lượng cần thiết để thực hiện thành công phản ứng PCR-RAPD với mỗi M13 và (GTG) ₅ . Việc lưu giữ các mẫu DNA tách chiết bằng hai phương pháp này trong 3 tháng ở -20 °C không ảnh hưởng đến kết quả của phản ứng PCR-RAPD. Quy trình của Lõoke được khuyến cáo sử dụng để tách chiết DNA tổng số cho phân ứng PCR-RAPD do tính tiện lợi, tiết kiệm thời gian, công sức và hóa chất.
Ngày hoàn thiện:	02/12/2025	
Ngày đăng:	03/12/2025	
TỪ KHÓA		
Chỉ thị phân tử		
DNA tổng số		
Nấm men		
RAPD		
Tách chiết DNA		

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.13211>

* Corresponding author. Email: thuy_tt@hnue.edu.vn

1. Giới thiệu

Tách chiết DNA tổng số từ các mẫu sinh vật là thao tác đầu tiên nhằm thu về vật liệu di truyền cho các nghiên cứu đa dạng sinh học dựa trên chỉ thị phân tử DNA. Trong những năm gần đây, các quy trình tách chiết thương mại đã được phát triển cho hầu hết các đối tượng mẫu sinh vật, từ mô động thực vật đến các mẫu sinh thiết chứa nấm, vi khuẩn, virus, v.v. Hầu hết các kit tách chiết DNA thương mại đều dựa trên quy trình phá vỡ tế bào vi sinh vật bằng phương pháp vật lý hoặc các dung môi hữu cơ kết hợp các enzyme thủy phân thành, màng tế bào. Sau đó, vật liệu di truyền DNA trong mẫu sẽ được hấp phụ trên các hạt silica đã được ép thành dạng màng lọc hoặc bọc quanh các hạt từ. Các kit tách chiết DNA thương mại thường có giá thành cao và chỉ đạt hiệu quả tối ưu đối với một vài nhóm vi sinh vật đặc thù. Để tách chiết được DNA hiệu quả với từng loại đối tượng vi sinh vật cần kết hợp, cải tiến các phương pháp tách chiết khác nhau để thu được DNA tổng số đạt chất lượng cho từng yêu cầu cụ thể. Đối với mẫu DNA tổng số dùng làm khuôn cho phản ứng PCR, chỉ số $A_{260/280}$ và $A_{260/230}$ cần lần lượt đạt trên 1,8 và 1,5. Các thông số này đảm bảo lượng protein cũng như hàm lượng các dung môi hữu cơ dùng trong quy trình tách chiết mẫu là tối thiểu, không ảnh hưởng đến phản ứng PCR tiếp sau đó [1].

Nấm men là vi sinh vật nhân thực, chúng có thành tế bào cứng và dày (~250 nm), chiếm một tỉ trọng lớn trong khối lượng khô của tế bào (~25%) [2]. Thành tế bào nấm men có 3 lớp liên kết với nhau bởi các liên kết chéo (cross-linked). Lớp ngoài chủ yếu là mannoproteins, lớp bên trong có thành phần chủ yếu là β -glucans (β -1,3-glucan và β -1,6-glucan), trong khi lớp trung gian chủ yếu chứa chitin (polymer của *N*-acetylglucosamine) và hỗn hợp của cả lớp trong và lớp ngoài [3]. Một số nấm men sinh sống trong điều kiện khắc nghiệt như mật ong, thường có thêm sản phẩm trao đổi chất là polysaccharide; chúng có thể tổng hợp, tích lũy bên trong tế bào (polysaccharide nội bào) hoặc bao quanh ngoài thành tế bào (polysaccharide ngoại bào). Do đó, thành tế bào nấm men khá vững chắc, khó có thể ly giải bằng các phương pháp thông thường.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số của nấm men theo da Silva-Filho và cộng sự [4] dùng chất tẩy rửa ở pH kiềm, kết hợp với dung môi hữu cơ cho thấy hiệu quả tốt trong tách chiết DNA tổng số của nấm men phân lập từ mật và sáp ong Sơn La [5] để làm khuôn cho phản ứng PCR với môi RAPD là M13 và (GTG)₅. Phương pháp này cũng được áp dụng để tách chiết DNA tổng số trong nghiên cứu đa dạng nấm men *Drekkera bruxellensis* từ rượu vang và sản xuất bioethanol [6]. Tuy nhiên, phương pháp này thường khá tốn kém thời gian và sử dụng lượng dung môi hữu cơ độc hại khá lớn, gây tổn kém chi phí xử lý dung dịch thải sau tách chiết DNA. Năm 2011, Lööke và cộng sự [7] đã đề xuất phương pháp dùng muối lithium acetate (LiOAc), sodium dodecyl sulfate (SDS) kết hợp với nhiệt (70°C) để phá vỡ tế bào nấm men và thu hồi DNA tổng số bằng kết tủa với ethanol. Phương pháp này tiết kiệm thời gian và không sử dụng các dung môi hữu cơ độc hại; tuy nhiên lượng DNA thu được thường thấp [8].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi áp dụng cả hai phương pháp tách chiết DNA tổng số trên với các chủng nấm men đã được định danh từ bộ chủng nấm men phân lập từ mật, sáp ong tự nhiên tại Sơn La, Việt Nam. Kết quả tách chiết DNA tổng số được so sánh với các mẫu sử dụng kit tách chiết DNA nấm men của Norgen Biotek™ nhằm tìm ra phương pháp phù hợp nhất, đạt DNA tổng số có chất lượng phù hợp, dễ dàng bảo quản và thao tác trong các thí nghiệm đánh giá đa dạng nấm men bằng PCR với môi RAPD.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Các chủng nấm men (Bảng 1) sử dụng trong nghiên cứu này là 10 chủng phân lập từ mật và sáp ong thu từ Sơn La [5] đã được định danh đến loài bằng chỉ thị phân tử ITS (kết quả không trình bày ở đây) và 01 chủng từ bảo tàng giống chuẩn ATCC của Mỹ (American Type Culture Collection).

Bảng 1. Các chủng nấm men sử dụng trong nghiên cứu này

STT	Mẫu	Tên loài
1	Ca	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
2	P1	<i>Candida orthopsilosis</i>
3	P3	<i>Pichia anomala</i>
4	P6	<i>Clavispora lusitaniae</i>
5	P15	<i>Pichia anomala</i>
6	P24	<i>Starmerella apicola</i>
7	P45	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
8	P60	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
9	P80	<i>Priceomyces melissophilus</i>
10	P91	<i>Priceomyces melissophilus</i>
11	P94	<i>Priceomyces melissophilus</i>

Các hóa chất tách chiết DNA, thực hiện phản ứng PCR và điện di đều tinh sạch ở mức phân tích, được mua từ Merck (Đức), Norgen Biotek™ (Na Uy) và Phusa Genomics (Việt Nam).

Hai môi RAPD được sử dụng là M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3') và (GTG)₅ (5' GTGGTGGTGGTGGTG 3') [9].

2.2. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của các chủng nấm men nghiên cứu được tách chiết theo ba phương pháp khác nhau. Đầu tiên, các khuẩn lạc thuần khiết được lựa chọn và hoạt hóa trong môi trường Hansen G90 lỏng (glucose 90 g/L, peptone 10 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, MgSO₄.7H₂O 2 g/L), nuôi lắc 200 vòng/phút ở điều kiện 30 °C trong 24 giờ. Tiếp theo, khoảng 50 mg sinh khối nấm men được thu hồi bằng cách li tâm 14000 × *g* dịch huyền phù, lượng sinh khối này được đem đi tách DNA theo 3 phương pháp khác nhau: (1) sử dụng bộ KIT Norgen Biotek™ 27300 (Norgen Biotek™, Na Uy), (2) phương pháp của Looke [7] và (3) phương pháp của da Silva-Filho [4].

2.3. Xác định nồng độ DNA tổng số

Mẫu DNA tổng số sau tách chiết được pha loãng bằng đệm TE đến nồng độ thích hợp và được đánh giá các chỉ số A_{260/280} và A_{260/230} bởi thiết bị đo quang phổ Nanodrop (SimpliNano™ 29061712, Mỹ).

2.4. PCR-RAPD

Hỗn hợp PCR-RAPD với các thành phần: 10 µL master mix, 1 µL môi M13 hoặc (GTG)₅, 1 µL DNA, và 8 µL nước mili-Q vô trùng để đạt tổng thể tích 20 µL. Các chu kỳ PCR được thực hiện trên thiết bị PCR9700 (Applied Bioscience) với chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ 95°C trong 60 giây; 40 chu kỳ (94°C trong 60 giây, 45°C trong 20 giây và 72°C trong 120 giây) và 72°C trong 5 phút [9].

2.5. Đánh giá kết quả PCR bằng điện di agarose

Sản phẩm PCR với các môi RAPD được kiểm tra bằng hệ thống điện di (1,4% agarose, 70V, 80mA trong 80 phút) và phân tích bởi phần mềm GelAnalyzer 23.1.1. Kích thước và số lượng band đa hình được tính toán và so sánh với kết quả sản phẩm PCR sử dụng DNA khuôn tách bởi bộ KIT Norgen Biotek™ 27300.

2.6. Đánh giá thời hạn sử dụng của mẫu DNA tổng số

DNA tổng số sau khi tách chiết được pha loãng với đệm TE (10 mM tris – HCl, 1 mM EDTA, pH 8) về nồng độ 50 ng/µL, bảo quản -20°C. Sau 3 tháng thực hiện PCR với môi M13 và (GTG)₅. Kết quả được so sánh với thí nghiệm ban đầu để kiểm tra tác động của thời gian lưu trữ DNA đến sản phẩm PCR-RAPD.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA từ các phương pháp tách chiết

Độ tinh sạch của DNA được căn cứ vào tỉ lệ A260/280 và A260/230. Chỉ có một số mẫu của phương pháp tách chiết của Lööke [7] cho kết quả A260/280 dưới 1,8, chứng tỏ mẫu có thể bị nhiễm protein của nấm men. Hầu hết các mẫu DNA tổng số tách bằng phương pháp Lööke [7] và da Silva-Filho [4] đều có nồng độ DNA cao hơn rất nhiều so với các mẫu DNA tổng số được tách bằng Kit Norgen Biotek™ 27300 (Bảng 2). Điều này cho thấy hạn chế về dung lượng gắn với DNA (32,5 – 138,0 ng/μL) của màng silica trong kit Norgen Biotek™ 27300. Các Kit thương mại thường chỉ tối ưu cho việc tách chiết DNA tổng số của một vài loại nấm men, dẫn đến việc tách chiết DNA của một số mẫu *Pichia anomala* (P3, P15) và *Priceomyces melissophilus* (P80, P91) đạt hiệu quả chưa cao.

Bảng 2. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tách chiết theo các phương pháp khác nhau.

Phương pháp tách chiết DNA									
KIT Norgen Biotek™ 27300				Lööke [7]			da Silva-Filho [4]		
Mẫu	A ₂₆₀ /280	A ₂₆₀ /230	Nồng độ	A ₂₆₀ /280	A ₂₆₀ /230	Nồng độ	A ₂₆₀ /280	A ₂₆₀ /230	Nồng độ
Ca	2,12	2,03	65,8	1,97	2,09	373	2,01	2,21	2730
P1	1,99	2,12	68,0	1,86	1,91	658	1,82	1,91	1660
P3	1,91	2,20	32,5	1,60	1,86	68,0	1,97	1,96	325
P6	1,88	2,00	60,2	1,94	2,01	602	2,04	2,03	1470
P15	1,97	1,99	54,8	1,93	2,03	548	1,96	1,99	3300
P24	2,03	2,01	74,1	1,83	1,91	221	2,04	2,02	2980
P45	1,93	2,03	96,5	1,69	1,71	96,5	2,50	2,12	170
P60	1,88	1,95	138	1,85	1,81	276	1,85	1,87	2740
P80	1,93	2,06	56,2	1,95	2,08	562	2,05	1,90	2380
P91	2,00	2,11	50,0	1,61	1,81	50,0	2,01	1,99	158,5
P94	1,91	1,99	66,5	1,37	1,42	40,5	2,16	1,97	2100

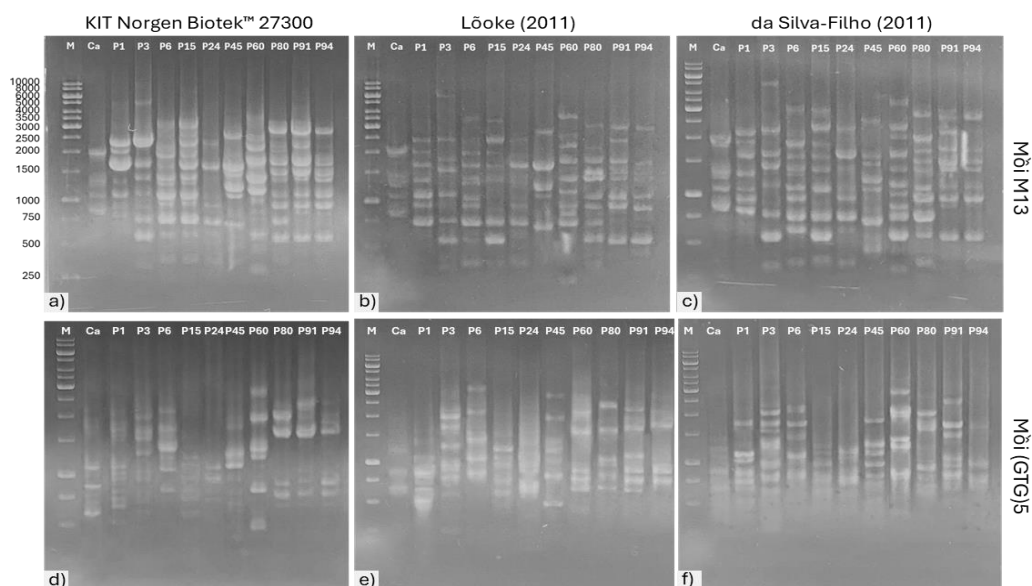
Kết quả của Bảng 2 cũng cho thấy, nồng độ DNA đạt cao nhất khi sử dụng phương pháp của da Silva-Filho [4]. Với phương pháp này, mẫu *Priceomyces melissophilus* (P91) và *Zygosaccharomyces rouxii* (P45) đạt nồng độ DNA tổng số thấp nhất (170 ng/μL) theo phương pháp này nhưng vẫn cao hơn nồng độ DNA tổng số của mẫu này khi tách bằng phương pháp của Lööke [7] và Kit thương mại Norgen Biotek™ 27300 (đều chỉ đạt 50 ng/μL). Kết quả này hoàn toàn tương đồng với kết quả nghiên cứu của Phạm Ngọc Ánh và cộng sự [5]. Phương pháp tách chiết DNA tổng số của Lööke [7] mặc dù không đạt được nồng độ DNA và độ tinh sạch cao như phương pháp của da Silva-Filho [4] nhưng vẫn đạt được nồng độ DNA của hầu hết các mẫu cao hơn so với tách bằng Kit thương mại Norgen Biotek™ 27300. Phương pháp này cũng tiết kiệm được một nửa thời gian so với phương pháp của da Silva-Filho [4] và không sử dụng các dung môi độc hại như chloroform, isoamyl alcohol.

3.2. Đánh giá khả năng làm khuôn cho RAPD-PCR của các mẫu DNA tổng số

Nhằm kiểm tra các mẫu DNA tổng số thu được có thể sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền của các chủng nấm men bằng PCR-RADP, chúng tôi tiến hành khuếch đại các đoạn DNA từ các mẫu DNA này. Trong mỗi phản ứng, DNA khuôn được sử dụng với nồng độ tương đương 5 ng/μL cùng hai môi RAPD là M13 và (GTG)₅. Kết quả điện di được thể hiện trên Hình 1.

Kết quả điện di (Hình 1) cho thấy số lượng và kích thước băng đa hình được nhân lên bằng môi M13 và (GTG)₅ từ các mẫu DNA tổng số tách bởi bộ KIT Norgen Biotek™ 27300 và hai phương pháp của da Silva-Filho [4] và Lööke [7] là tương đương nhau (Bảng 3). Mặc dù các mẫu DNA tách bằng bộ KIT Norgen Biotek™ 27300 (Hình 1a, d) cho kết quả PCR-RAPD với một số băng đa hình đậm hơn các băng đa hình khác trong cùng một mẫu, nhưng độ đồng đều chưa cao. Ngược lại, DNA tách bằng phương pháp của Lööke (Hình 1b, 1e) và da Silva-Filho (Hình 1c, 1f) cho thấy

các băng PCR-RAPD có cường độ tương đối đồng nhất hơn, giúp việc phân biệt các băng đa hình trở nên dễ dàng hơn.



Hình 1. Kết quả điện di đánh giá PCR-RAPD khuếch đại bằng môi M13 và (GTG)₅ từ các mẫu DNA tổng số tách chiết bằng 03 phương pháp khác nhau

Bảng 3. Số lượng và kích thước băng đa hình được khuếch đại bằng PCR-RAPD với môi M13 và (GTG)₅

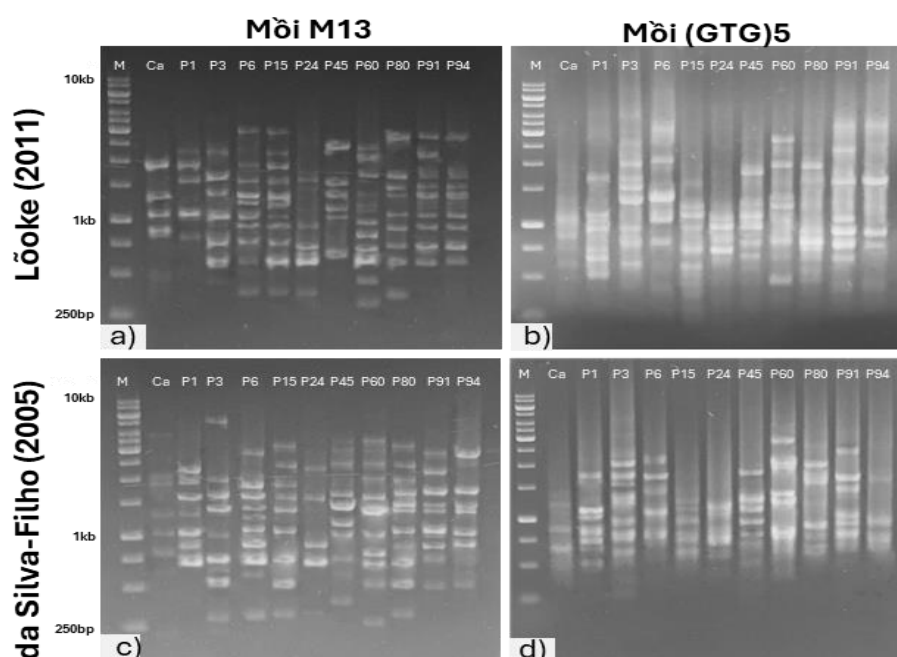
Mẫu	Số lượng (băng) và kích thước (bp) của các băng được khuếch đại	
	Môi M13	Môi (GTG) ₅
Ca	4 băng (845+920+1045+1560) bp	3 băng (815+865+935) bp
P1	7 băng (825+850+925+1035+1255+1620+1855) bp	8 băng (800+825+835+850+890+905+935+1290) bp
P3	9 băng (740+770+810+850+935+1090+1305+1915+5390) bp	7 băng (820+850+890+1020+1170+1260+1535) bp
P6	10 băng (740+770+810+875+910+1025+1070+1260+1485+2945) bp	4 băng (855+925+1060+1690) bp
P15	11 băng (740+770+810+875+910+1085+1260+1500+1840+2255+2780) bp	5 băng (815+835+895+950+990) bp
P24	3 băng (865+1245+1875) bp	3 băng (835+890+930) bp
P45	6 băng (795+920+975+1130+1210+2225) bp	6 băng (830+850+890+945+1010+1350) bp
P60	10 băng (740+775+810+830+895+955+1060+1335+1690+2040) bp	6 băng (800+855+1000+1055+1510+2460) bp
P88	10 băng (745+770+805+860+920+1075+1130+1315+1770+2470) bp	5 băng (825+845+870+1235+1550) bp
P91	8 băng (770+860+925+1075+1150+1315+1780+2415) bp	6 băng (830+850+880+920+1235+1930) bp
P94	7 băng (770+860+920+1060+1130+1305+2435) bp	3 băng (845+875+1260) bp

3.3. Đánh giá thời gian lưu mẫu DNA tổng số

Kết quả thực hiện phản ứng PCR-RAPD từ các mẫu DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Silva-Filho [4] và Lööke [7], được bảo quản ở -20°C đến 3 tháng được thể hiện ở Hình 2. Kết quả này cho thấy việc bảo quản các mẫu DNA tổng số trong 3 tháng ở -20°C không ảnh hưởng đến chất lượng của các mẫu DNA được tách chiết theo phương pháp của Lööke [7] (Hình

2a, b). Các băng đa hình được nhân lên với môi M13 và (GTG)₅ đều rõ nét và có thể phân biệt được rõ ràng.

Tương tự với các mẫu DNA tổng số tách chiết theo phương pháp của da Silva-Filho [4] (Hình 2c, d), việc bảo quản ở -20°C đến 3 tháng cũng không làm thay đổi số lượng và kích thước các băng đa hình mặc dù kết quả của PCR-RAPD xuất hiện nhiều vệt mờ (smear). Điều này chứng tỏ việc tồn dư các dung môi tách chiết làm đứt gãy DNA và các đoạn DNA nhỏ bị đứt gãy cũng đã được nhân lên nhưng các băng đa hình hoàn toàn có thể phân biệt rõ nét. Kết quả này tương đồng với báo cáo của Phạm Ngọc Ánh và cộng sự [5] trên các chủng nấm men có hoạt tính kháng khuẩn phân lập từ mật và sáp ong Sơn La. Nồng độ của các băng đa hình được nhân lên trong RAPD-PCR từ khuôn DNA tổng số được bảo quản 3 tháng có thể giảm (Hình 2). Một phần nguyên nhân do nồng độ DNA tổng số có thể giảm xuống trong quá trình bảo quản, một phần do DNA đứt gãy không được khuếch đại hoặc bị khuếch đại thành dạng băng vạch phụ có kích thước ngắn hơn các băng vạch chính.



Hình 2. Kết quả thực hiện RAP-PCR với môi M13 và (GTG)₅ từ khuôn DNA tổng số chiết bằng phương pháp Looke (2011) và da Silva-Filho (2005) sau 3 tháng bảo quản ở -20°C

4. Kết luận

Cả hai phương pháp tách chiết DNA tổng số của Looke và da Silva-Filho đều phù hợp để thu nhận DNA phục vụ phân tích RAPD-PCR đánh giá đa dạng nấm men. DNA thu được từ hai phương pháp này có nồng độ cao và chất lượng tương đương với sản phẩm từ bộ KIT Norgen Biotek™ 27300. Kết quả nghiên cứu đề xuất sử dụng phương pháp của Looke để tách chiết DNA tổng số cho phân tích RAPD-PCR đánh giá đa dạng của các mẫu nấm men trong toàn bộ sưu tập nấm men từ mật và sáp ong tự nhiên vùng núi Tây Bắc, Việt Nam. Đây là phương pháp tiết kiệm thời gian và chi phí hơn so với phương pháp của da Silva-Filho, đồng thời DNA tổng số có thể bảo quản ở -20°C đến 3 tháng vẫn đảm bảo chất lượng cho phản ứng RAPD-PCR. Với mục tiêu mà nghiên cứu đặt ra, các mẫu DNA mới chỉ được đánh giá thời gian bảo quản trong vòng ba tháng và sử dụng hai bộ môi RAPD (M13 và (GTG)₅). Các nghiên cứu kéo dài thời gian bảo quản, mở rộng với các bộ môi RAPD khác trên các mẫu DNA tổng số của các loài nấm men khác cũng cần được tiến hành để đánh giá tính khả dụng của phương pháp.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn nguồn tài trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2023-SPH17 để thực hiện các thí nghiệm trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] C. F. de Oliveira, T. G. da S. Paim, K. C. Reiter, A. Rieger, and P. A. D'azevedo, "Evaluation of four different DNA extraction methods in coagulase-negative Staphylococci clinical isolates," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 56, no. 1, pp. 29–33, 2014, doi: 10.1590/S0036-46652014000100004.
- [2] I. Russell and G. G. Stewart, *An Introduction to Brewing Science & Technology - Brewer's Yeast*. The Institute of Brewing, 1998.
- [3] C. White and J. Zainasheff, *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Brewers Publications, 2010.
- [4] E. A. da Silva-Filho, S. K. Brito dos Santos, A. do M. Resende, J. O. F. de Moraes, M. A. de Moraes, and D. Ardaillon Simões, "Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 88, no. 1, pp. 13–23, 2005, doi: 10.1007/s10482-004-7283-8.
- [5] A. N. Pham, A. K. Ha, and T. T. Tran, "Genetic diversity and some biological characteristics of antibacterial yeasts isolated from natural honey and beeswax in Son La province," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 61, no. 5, 2023, doi: 10.15625/2525-2518/17260.
- [6] J. M. da Silva, G. H. T. G. da Silva, D. C. Parente, *et al.*, "Biological diversity of carbon assimilation among isolates of the yeast *Dekkera bruxellensis* from wine and fuel-ethanol industrial processes," *FEMS Yeast Research*, vol. 19, no. 3, 2019, doi: 10.1093/femsyr/foz022.
- [7] M. Lööke, K. Kristjuhan, and A. Kristjuhan, "Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications," *BioTechniques*, vol. 50, no. 5, pp. 325–328, 2011, doi: 10.2144/000113672.
- [8] A. N. Borovkova, M. Yu. Shalamitskiy, and E. S. Naumova, "Pectinolytic yeast *Saccharomyces paradoxus* as a new gene pool for winemaking," *Microbiology*, vol. 92, no. 2, pp. 256–268, 2023, doi: 10.1134/S0026261722602822.
- [9] M. Ramírez-Castrillón, S. D. C. Mendes, M. Inostroza-Ponta, and P. Valente, "(GTG)5 MSP-PCR fingerprinting as a technique for discrimination of wine associated yeasts?," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, 2014, Art. no. e105870, doi: 10.1371/journal.pone.0105870.
- [10] B. Mahardika and M. Ilmi, "Genetic diversity of nectar yeast from Central Java based on RAPD method," *AIP Conference Proceedings*, vol. 2260, 2020, Art. no. 020029, doi: 10.1063/5.0015686.