

Исследование морфофизиологических свойств дрожжей, перспективных для производства этанола

Светлана Г. Давыденко ¹	davydenko@baltika.com	 0000-0001-8005-4743
Татьяна В. Меледина ²	meledinata@ya.ru	 0000-0001-748502802
Анастасия Андреева ²	aandreeva@itmo.ru	 0000-0001-6179-2265

1 ООО «Пивоваренная компания «Балтика», 194292, Санкт-Петербург, 6-й Верхний пер., 3

2 Университет ИТМО, 191 002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

Аннотация. Этиловый спирт является востребованным сырьем в различных отраслях народного хозяйства, в частности в пищевой промышленности, медицине, косметологии. В последнее время, в связи с необходимостью снизить нагрузку на экологию, этанол используют в качестве топлива, частично заменяя бензин и дизельное топливо в двигателях внутреннего сгорания. Кроме того, для многих стран, которые имеют дефицит углеродных ископаемых, замена части бензина на этанол является решением проблемы снижения себестоимости топлива. В настоящее время 95% этанола, производимого из растительного сырья, заменяет 32% бензина. В результате проведенной работы было установлено, что для оценки влияния этанола на физиологическую активность дрожжей следует использовать различные методы контроля. Так, отсутствие мертвых клеток в культуре, как показали полученные данные, не могут в полной мере объяснить метаболическую активность дрожжей в среде с этанолом. По всей видимости интенсивность этанольного стресса связана со сложными, генетически обусловленными процессами, например, активацией развернутого белкового ответа и изменением активности ферментов ЭПР. Сравнение интенсивности размножения двух штаммов спиртовых дрожжей указывают на необходимость изучения их флокуляционной активности. Кроме того, при инокуляции среды следует учитывать различия в размере клеток разных культур, которые могут существенно отличаться. Например, дрожжи штамма C16 больше по размеру клеток штамма C48 на 33%. При сравнительной оценке штаммов следует использовать только количественное определение концентрации клеток в посевном материале, а не массовую долю биомассы в нем.

Ключевые слова: дрожжи, этанол, морфология, стабильность, клетка.

Investigation of morphophysiological properties of yeast promising for ethanol production

Svetlana G. Davydenko ¹	davydenko@baltika.com	 0000-0001-8005-4743
Tatiana V. Meledina ²	meledinata@ya.ru	 0000-0001-748502802
Anastasia Andreeva ²	aandreeva@itmo.ru	 0000-0001-6179-2265

1 Baltika Brewing Company, 194292, St. Petersburg, 6th Upper Lane, 3

2 ITMO University, 9 Lomonosova str., Saint Petersburg, 191 002

Abstract. Ethyl alcohol is a sought-after raw material in various sectors of the national economy, in particular in the food industry, medicine, and cosmetology. Recently, due to the need to reduce the burden on the environment, ethanol is used as a fuel, partially replacing gasoline and diesel fuel in internal combustion engines. In addition, for many countries that have a carbon deficit, replacing part of gasoline with ethanol is a solution to the problem of reducing fuel costs. Currently, 95% of ethanol produced from vegetable raw materials replaces 32% of gasoline. As a result of the work, it was found that to assess the effect of ethanol on the physiological activity of yeast, various control methods should be used. Thus, the absence of dead cells in the culture, as shown by the data obtained, cannot fully explain the metabolic activity of yeast in a medium with ethanol. Apparently, the intensity of ethanol stress is associated with complex, genetically determined processes, for example, activation of an extensive protein response and changes in the activity of ER enzymes. Comparison of the reproduction intensity of two strains of alcoholic yeast indicates the need to study their flocculation activity. In addition, when inoculating the medium, one must take into account the differences in cell size between different cultures, which can vary significantly. For example, yeast strain C16 is 33% larger than cells of strain C48. When comparatively assessing strains, only the quantitative determination of the concentration of cells in the inoculum should be used, and not the mass fraction of biomass in it.

Keywords: yeast, ethanol, morphology, stability, cell.

Введение

Для производства этанола используется быстро возобновляемое растительное сырье или отходы пищевых предприятий [3–5]. Разрабатываются технологии получения этанола из лигнин содержащих отходов после переработки

древесины [6, 7], а также бытовых углеводсодержащих отходов [8]. Появляются работы, в которых предлагают получать этанол из различных экзотических для Российской Федерации растений [9]. Не зависимо от источника сырья в технологии производства биоэтанола обязательной стадией является ферментация

Для цитирования

Давыденко С.Г., Меледина Т.В., Андреева А. Исследование морфофизиологических свойств дрожжей, перспективных для производства этанола // Вестник ВГУИТ. 2024. Т. 86. № 1. С. 63–69. doi:10.20914/2310-1202-2024-1-63-69

For citation

Davydenko S.G., Meledina T.V., Andreeva A. Investigation of morphophysiological properties of yeast promising for ethanol production. Vestnik VGUIT [Proceedings of VSUET]. 2024. vol. 86. no. 1. pp. 63–69. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2024-1-63-69

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License

гидролизатов, содержащих редуцируемые сахара [10]. Количество сбраживаемых дрожжами углеводов в них колеблется от 0,7 г/л [6] до 138 г/л [10]. Именно поэтому меласса, содержащая до 50 % сахарозы, по-прежнему является перспективным сырьем. Важно, что именно благодаря высокому содержанию сахарозы можно эффективно перерабатывать высококонцентрированные среды [2, 11]. Так, выделенные Саидом Кешкаром с поверхности ягод винограда дрожжи *Hanseniaspora opuntiae* способны расти в среде, содержащей 50 % глюкозы. Установлено, что данный вид дрожжей является спиртоустойчивым и может продуцировать до 21 % этанола [12, 13]. По всей видимости и среди дрожжей сахаромикетов могут быть штаммы, которые значительно повысят выход этанола. Эти дрожжи должны характеризоваться осмо- и спирто – устойчивостью [1, 14–17].

Цель работы – исследовать морфобиологические свойства и спирто-устойчивость дрожжей сахаромикетов, применяемых в различных биотехнологических процессах.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись: штаммы спиртовых дрожжей C16, C25, C48 *Saccharomyces cerevisiae* из коллекции университета ИТМО; пекарские дрожжи штамм RCAM 02150 из коллекции ВКПМ (Москва).

Идентификация штаммов дрожжей методом ПЦР. Проведение ПЦР в реальном времени с последующим анализом кривых плавления высокого разрешения (HRM анализ) проводили на амплификаторе CFX96 BioRad. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 10,0 мкл Master Mix, 2х концентрации с красителем Sybr Green, MgCl₂ концентрацией 2,5 мМ производства ООО «Бигль». Использовали праймеры ITS1 и ITS4 в концентрации 0,3 мМ

ООО «Бигль» и 1,5 мкл выделенной ДНК исследуемых штаммов [18, 19].

Условия ПЦР включали предварительную денатурацию при 95 °С – 420 с. и 45 циклов амплификации (60 °С – 15 с., 72 °С – 15 с., 95 °С – 15 с.). Режим HRM -20 чтений на 1 °С.

На рисунке 1 изображена кривая температуры плавления контрольного образца, в котором отсутствуют дрожжи, соответственно отсутствуют и пики плавления ДНК (черная линия).

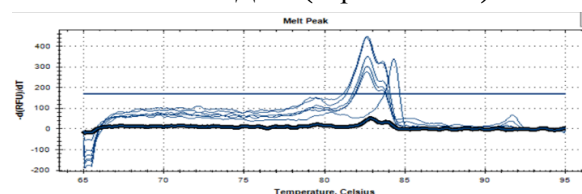


Рисунок 1. Кривая температур плавления (негативный контроль)

Figure 1. Melting temperature curve (negative control)

Результаты

Первоначальной задачей стояла оценка физиологической активности дрожжей. Для определения физиологической активности дрожжей был использован экспресс-метод С.Г. Давыденко, который дает возможность количественной оценки спиртоустойчивости и отбора перспективных штаммов для производства [20; 21]. Согласно методике, питательная среда для культивирования дрожжей содержала раствор глюкозы и восьмикратную среду YEP (8 x YEP), в состав которой входили 16% пептон и 8% дрожжевой экстракт. Количество глюкозы во всех вариантах опыта составляло 0,5 мл, среды 8 x YEP 0,25 мл, дрожжевой суспензии 10 x 10⁷ клеток / мл – 0,5 мл. Количество воды и этанола вносили в зависимости от цели исследования (таблица 1). Общий объем суспензии в шприцах составлял 2 мл.

Для инокуляции использовали суспензию чистой культуры дрожжей исследуемых штаммов. План эксперимента по изучению влияния этанола на физиологию дрожжей приведен в таблице 1.

Таблица 1.

План эксперимента по изучению влияния этанола в концентрации 10% на физиологию дрожжей

Table 1.

The plan of the experiment to study the effect of ethanol at a concentration of 10% on the physiology of yeast

Образец Sample	Глюкоза, 40% Glucose, 40%	8 x YEP	Дрожжевая суспензия 10 x 10 ⁷ клеток/мл Yeast suspension of 10 x 10 ⁷ cells/ml	H ₂ O	Этанол Ethanol
Контроль Control	0,5	0,25	0,5	0,75	0
10% этанола 10% ethanol	0,5	0,25	0,5	0,55	0,2

Полученные растворы перемешивали, набирали в шприц вместимостью 10 мл, герметично запаивали его нижний конец. Культивирование длилось 17 ч при температуре 30 °С.

Во время брожения дрожжи производили углекислый газ, который при выделении поднимал поршень шприца. Объем выделившегося газа оценивали по высоте подъема поршня.

Метаболическую активность штаммов сравнивали по количеству выделившегося диоксида углерода.

Определение концентрации мертвых клеток. Для определения концентрации мертвых клеток содержимое шприцов выливали в пробирки и центрифугировали в течение 3 минут. После центрифугирования из пробирок удаляли супернатант, в дрожжевой осадок добавляли воду до начального объема пробы. Далее окрашивание клеток метиленовым синим проводили согласно [20].

Идентификация спиртовых дрожжей с помощью метода ПЦР. В качестве эталона был взят штамм пекарских дрожжей RCAM 02150, который принадлежит к виду *Saccharomyces cerevisiae*. На рисунке 2 показана кривая температуры плавления ПЦР фрагмента между участками ITS1 и ITS4 рибосомальной ДНК для дрожжей этого штамма. Выявлены 2 пика с температурами плавления 83,6 °C и 82,7 °C.

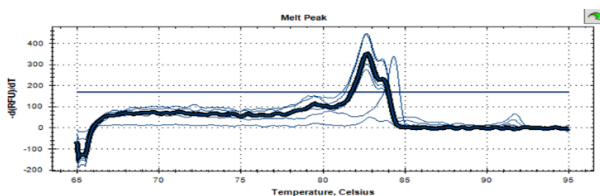


Рисунок 2. Кривая температуры плавления RCAM 02150
Figure 2. Melting temperature curve RCAM 02150

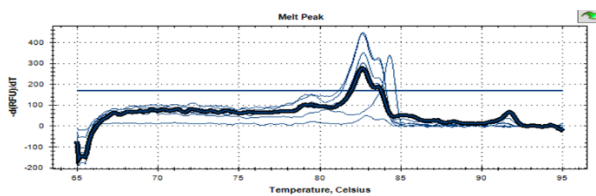


Рисунок 3. Кривая температуры плавления штамма C 16
Figure 3. Melting point curve of strain C 16

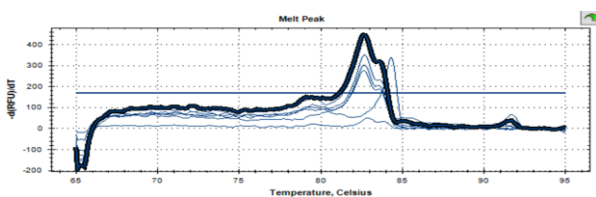


Рисунок 4 – Кривая температуры плавления штамма C25
Figure 4 – Melting point curve of strain C25

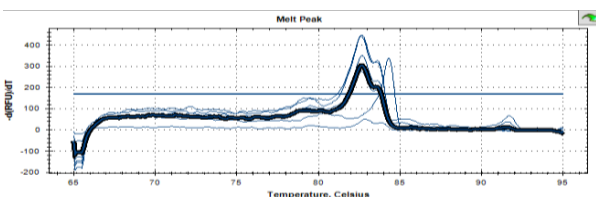


Рисунок 4. Кривая температуры плавления дрожжей C48
Figure 4. Melting point curve of strain C48

Как видно на рисунках 3–5, кривые плавления для дрожжей штаммов C16, C 25 и C48 имели такой же профиль, как и пекарские дрожжи.

Можно сделать вывод о близком таксономическом родстве всех проанализированных штаммов.

На рисунке 6 приведены результаты эксперимента, в котором концентрация этанола в опытных образцах составляла 10%. Видно, что снижение выделения углекислого газа особенно выражено у спиртовых штаммов C48 и C16.

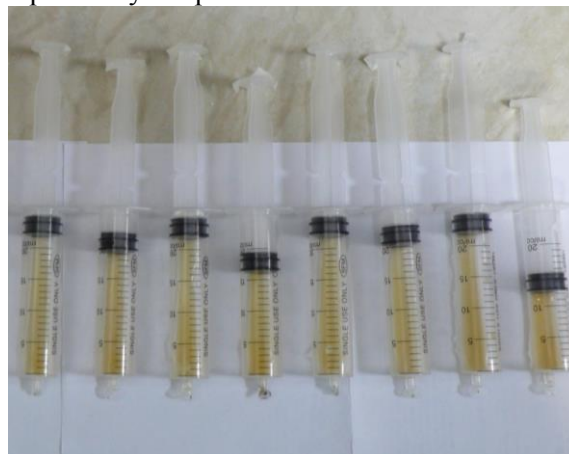


Рисунок 5. Внешний вид шприцов после 17 ч культивирования при 300 °C (1 – штамм RCAM 02150 контроль, 2 – RCAM 02150 опыт, 3 – C48 контроль, 4 – C48 опыт, 5 – C25 – контроль, 6 – C25 опыт, 7 – C16 контроль, 8 – C 16 опыт)

Figure 5. Appearance of syringes after 17 hours of cultivation at 300 °C (1 – strain Rcam 02150 control, 2 – Rcam 02150 experience, 3 – C48 control, 4 – C48 control, 5-C25 control, 6 – C25 control, 7 – C16 control, 8 – C16 experience)

Токсичное действие этанола на физиологическое состояние дрожжей определяли по содержанию мертвых клеток путем окрашивания метиленовым синим и по количеству выделившегося диоксида углерода.

На рисунке 7 видно, что все образцы дрожжей имеют высокую жизнеспособность, так как количество мертвых клеток в конце процесса культивирования не превышает 3%. Обращает на себя внимание различия в размерах клеток изучаемых штаммов дрожжей (рисунки 8–11). Максимальный размер имеют клетки пекарских дрожжей (9 мкм), минимальный – дрожжи C48. Анализ морфологической картины показывает, что все образцы спиртовых дрожжей имеют округлую форму, в то время как для пекарских дрожжей характерна округло-овальная форма.

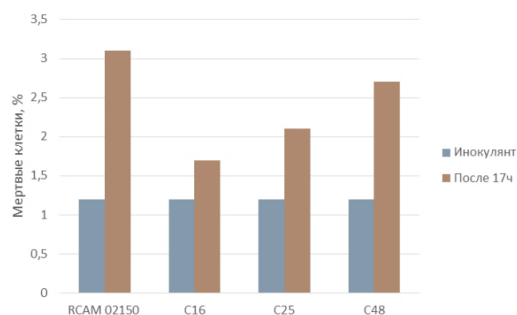


Рисунок 6. Содержание мертвых клеток после 17 ч культивирования при 30 °C

Figure 6. The content of dead cells after 17 hours of cultivation at 30 °C

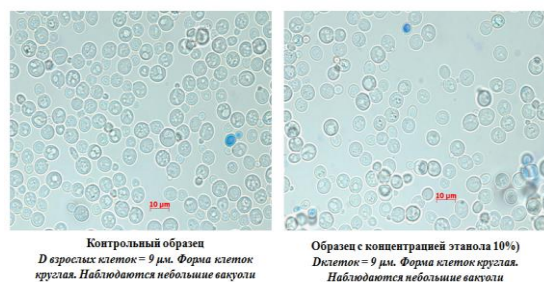


Рисунок 7. Морфология дрожжей штамма RCAM 02150

Figure 7. Morphology of yeast strain RCAM 02150

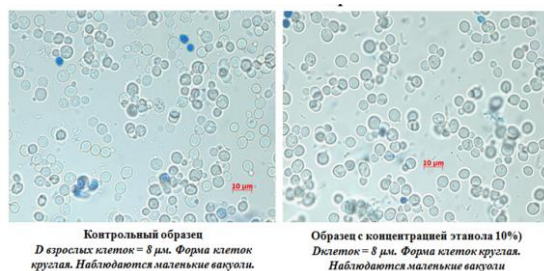


Рисунок 8. Морфология дрожжей штамм C16

Figure 8. Morphology of yeast strain C16

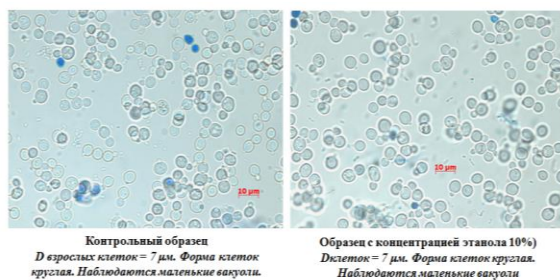


Рисунок 9. Морфология дрожжей штамма C25

Figure 9. Morphology of yeast strain C25

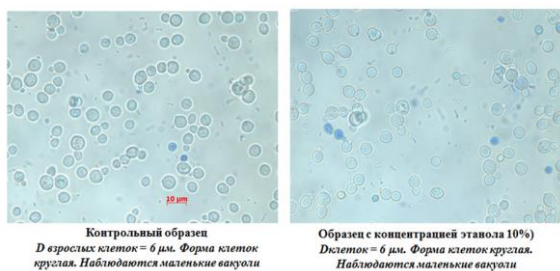


Рисунок 10. Морфология дрожжей штамма C48

Figure 10. Morphology of yeast strain C48

При сравнении метаболической активности штаммов спиртовых дрожжей, которая определялась по количеству выделившегося диоксида углерода в процессе сбраживания среды, находящейся в шприцах, установлен интересный факт (рисунок 12). При практически одинаковом содержании живых клеток во всех образцах количество образовавшегося CO_2 клетками штамма C16 составляла 53,2% от контроля, т. е. контрольного варианта, не содержащего этанол, в то время как для других штаммов эта величина соответствовала 87,8% (штамм RCAM 02150), 92,1% (штамм C25) и 82,8% (штамм C48). Максимальную бродительную активность имели штаммы C25 и пекарские дрожжи (92.1% и 87.8% соответственно).

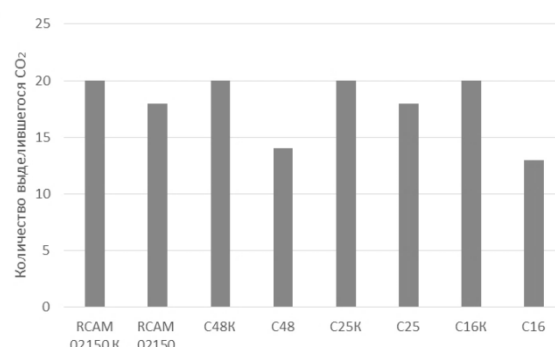


Рисунок 11. Высота подъема поршня за счет выделения CO_2 при культивировании штаммов дрожжей на средах разного состава (без этанола и с 10% этанола) (1 – штамм RCAM 02150 контроль, 2 – RCAM 02150 опыт, 3 – C48 контроль, 4 – C48 опыт, 5 – C25 – контроль, 6 – C25 опыт, 7 – C16 контроль, 8 – C16 опыт)

Figure 11. The height of the piston lift due to the release of CO_2 during the cultivation of yeast strains on media of various compositions (without ethanol and with 10% ethanol) (1 – strain rcam 02150 control, 2 – strain rcam 02150 experience, 3 – strain c48 control, 4 – strain C48 control, 5-strain C25 control, 6 – strain C25 control, 7 – strain c16 control, 8 – strain c16 experience)

Для объяснения этого факта была осуществлена серия экспериментов с двумя, значительно отличававшихся по бродительной активности, штаммами дрожжей C16 и C25. Процесс брожения проходил в среде с 20% этанола. Длительность процесса культивирования составила 72 часа. Оценку концентрации дрожжей в культуральной среде проводили по оптической плотности D600. В таблице 2 приведены результаты исследования.

На основании данных, приведенных в таблице 2, была рассчитана скорость прироста биомассы ($\Delta\text{OD}_{600} \times \text{ч}^{-1}$) для обоих штаммов, которая приведена на рисунке 13.

Таблица 2.
Оптическая плотность культуральной среды D₆₀₀
при ферментации спиртовых дрожжей

Table 2.
Optical density of the culture medium D₆₀₀ during
fermentation of alcoholic yeast

Время культивирования, ч. Duration of cultivation, hours	Штамм Strain	Концентрация этанолола, %-об. Ethanol concentration, % vol.	
		20.0	0.0
0	C16	1,513	1,509
	C25	1,572	2,407
24	C16	1,602	3,005
	C25	1,578	2,991
48	C16	1,577	3,007
	C25	1,551	2,995
72	C16	1,499	3,098
	C25	1,568	2,956

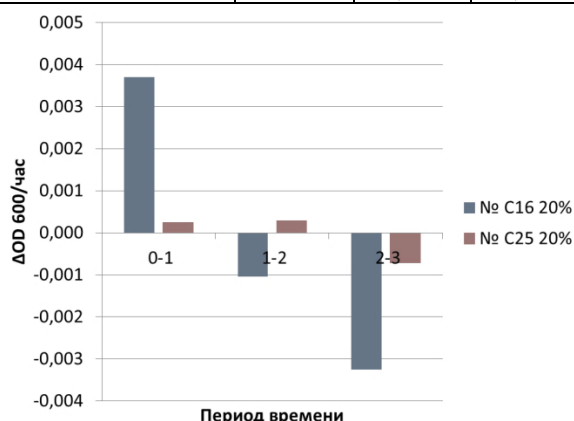


Рисунок 12. Скорость прироста биомассы (ΔOD₆₀₀/ч) при ферментации питательной среды, содержащей 20% этилового спирт

Figure 12. Biomass growth rate (ΔOD₆₀₀/h) during fermentation of a nutrient medium containing 20% ethyl alcohol

Заключение

В результате проведенной работы было установлено, что для оценки влияния этанола на физиологическую активность дрожжей следует использовать различные методы контроля. Так, отсутствие мертвых клеток в культуре, как показали полученные данные, не могут в полной мере объяснить метаболическую активность дрожжей в среде с этанолом. По всей видимости интенсивность этанольного стресса связана со сложными, генетически обусловленными процессами [23, 24,], например, активацией развернутого белкового ответа и изменением активности ферментов ЭПР [24]. Сравнение интенсивности размножения двух штаммов спиртовых дрожжей указывают на необходимость изучения их флокуляционной активности. Кроме того, при инокуляции среды следует учитывать различия в размере клеток разных культур, которые могут существенно отличаться. Например, дрожжи штамма C16 больше по размеру клеток штамма C48 на 33%. При сравнительной оценке штаммов следует использовать только количественное определение концентрации клеток в посевном материале, а не массовую долю биомассы в нем.

Литература

- Walker G.M., Walker R.S.K. Enhancing yeast alcoholic fermentations // *Advances in applied microbiology*. 2018. P. 87–129.
- Panahi H.K.S., Dehghani M., Aghbashlo M., Karimi K. et al. Conversion of residues from agro-food industry into bioethanol in Iran: An under-valued biofuel additive to phase out MTBE in gasoline // *Renewable energy*. 2020. V. 145. P. 699-710.
- Demirbas A., Karslioglu S. Biodiesel production facilities from vegetable oils and animal fats // *Energy Sources, Part A*. 2007. V. 29. №. 2. P. 133-141. doi: 10.1080/009083190951320
- Láinez M., Ruiz H.A., Arellano-Plaza M., Martínez-Hernández S. Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of Agave salmiana leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus* // *Renewable energy*. 2019. V. 138. P. 1127-1133.
- Figueres C., Whiteman G., Le Quéré C., Peters G.P. Carbon emissions rise again // *Nature*. 2018. V. 564. P. 27-31.
- Tang Y., An M., Liu K., Nagai S. et al. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7 // *Process Biochemistry*. 2006. V. 41. №. 4. P. 909-914.
- Raina N., Slathia P.S., Sharma P. Experimental optimization of thermochemical pretreatment of sal (*Shorea robusta*) sawdust by Central Composite Design study for bioethanol production by co-fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* (MTCC-36) and *Pichia stipitis* (NCIM-3498) // *Biomass and Bioenergy*. 2020. V. 143. P. 105819.
- Wang Q., Ma H., Xu W., Gong L. et al. Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology // *Biochemical Engineering Journal*. 2008. V. 39. №. 3. P. 604-610.
- Láinez M., Ruiz H.A., Arellano-Plaza M., Martínez-Hernández S. Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of Agave salmiana leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus* // *Renewable energy*. 2019. V. 138. P. 1127-1133.
- Raina N., Slathia P.S., Sharma P. Response surface methodology (RSM) for optimization of thermochemical pretreatment method and enzymatic hydrolysis of deodar sawdust (DS) for bioethanol production using separate hydrolysis and co-fermentation (SHCF) // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2020. P. 1-21. doi: 10.1007/s13399-020-00970-0
- Roukas T., Kotzekidou P. Rotary biofilm reactor: A new tool for long-term bioethanol production from non-sterilized beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* in repeated-batch fermentation // *Journal of cleaner production*. 2020. V. 257. P. 120519.
- Keshtkar S., Mezenova O.Y., Hosseini S., Romiani E. The Study of the influence of various factors on the ethanol production by the *Hanseniaspora opuntiae* // *Вестник международной академии холода*. 2019. №. 2. С. 49-54.

- 13 Mezenova O.Y. et al. The study of ethanol production by new strain of yeasts "hanseniaspora opuntiae MK 460485", investigation of its ethanol production in presence of different carbon and nitrogen sources, and optimal conditions // *Journal of Critical Reviews*. 2020. № 4. P. 498–505.
- 14 Bleoanca I., Bahrim G. Overview on brewing yeast stress factors // *Romanian Biotechnological Letters*. 2013. V. 18. №. 5. P. 8559-8572.
- 15 Kopecká J., Němec M., Matoulková D., Čejka P. et al. Effect of growth conditions on flocculation and cell surface hydrophobicity of brewing yeast // *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2015. V. 73. №. 2. P. 143-150. doi: 10.1094/ASBCJ-2015-0324-01
- 16 Lentini A., Rogers P., Higgins V., Dawes I. et al. The impact of ethanol stress on yeast physiology // *Brewing Yeast Fermentation Performance*. 2003. P. 23-38. doi:10.1002/9780470696040
- 17 Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of applied microbiology*. 2010. V. 109. №. 1. P. 13-24. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x
- 18 Manter D.K., Vivanco J.M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis // *Journal of microbiological methods*. 2007. V. 71. №. 1. P. 7-14.
- 19 Davydenko S.G. The creation and application of a new rapid method of assessing the quality of the seed yeast // *Beer and beverages*. 2012. V. 5. P. 20-23.
- 20 Davydenko S.G., Meledina T.V., Ivanova V.A. New foresight methodology for toxicity assessment // *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*. 2020. V. 21. №. 3. P. 333-342.
- 21 Давыденко С.Г., Васильева Л.М., Баташов Б.Э., Дедегкаев А.Т. Применение методов окраски дрожжей для оценки их физиологического состояния // *Пиво и Напитки*. 2011. Т. 5. С. 8–11.
- 22 Navarro-Tapia E., Pérez-Torrado R., Querol A. Ethanol effects involve non-canonical unfolded protein response activation in yeast cells // *Frontiers in microbiology*. 2017. V. 8. P. 245764. doi: 10.3389/fmicb.2017.00383
- 23 Alexandre H., Ansanay-Galeote V., Dequin S., Blondin B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* // *FEBS letters*. –2001. V. 498. №. 1. P. 98-103. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02503-0
- 24 Yoshida M., Kato S., Fukuda S., Izawa S. Acquired resistance to severe ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* protein quality control // *Applied and Environmental Microbiology*. 2021. V. 87. №. 6. P. e02353-20. doi: 10.1128/AEM.02353-20

References

- 1 Walker G.M., Walker R.S.K. Enhancing yeast alcoholic fermentations. *Advances in applied microbiology*. 2018. pp. 87–129.
- 2 Panahi H.K.S., Dehghani M., Aghbashlo M., Karimi K. et al. Conversion of residues from agro-food industry into bioethanol in Iran: An under-valued biofuel additive to phase out MTBE in gasoline. *Renewable energy*. 2020. vol. 145. pp. 699-710.
- 3 Demirbas A., Karslioglu S. Biodiesel production facilities from vegetable oils and animal fats. *Energy Sources, Part A*. 2007. vol. 29. no. 2. pp. 133-141. doi: 10.1080/009083190951320
- 4 Láinez M., Ruiz H.A., Arellano-Plaza M., Martínez-Hernández S. Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave salmiana* leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. *Renewable energy*. 2019. vol. 138. pp. 1127-1133.
- 5 Figueres C., Whiteman G., Le Quéré C., Peters G.P. Carbon emissions rise again. *Nature*. 2018. vol. 564. pp. 27-31.
- 6 Tang Y., An M., Liu K., Nagai S. et al. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Process Biochemistry*. 2006. vol. 41. no. 4. pp. 909-914.
- 7 Raina N., Slathia P.S., Sharma P. Experimental optimization of thermochemical pretreatment of sal (*Shorea robusta*) sawdust by Central Composite Design study for bioethanol production by co-fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* (MTCC-36) and *Pichia stipitis* (NCIM-3498). *Biomass and Bioenergy*. 2020. vol. 143. pp. 105819.
- 8 Wang Q., Ma H., Xu W., Gong L. et al. Ethanol production from kitchen garbage using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 2008. vol. 39. no. 3. pp. 604-610.
- 9 Láinez M., Ruiz H.A., Arellano-Plaza M., Martínez-Hernández S. Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave salmiana* leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. *Renewable energy*. 2019. vol. 138. pp. 1127-1133.
- 10 Raina N., Slathia P.S., Sharma P. Response surface methodology (RSM) for optimization of thermochemical pretreatment method and enzymatic hydrolysis of deodar sawdust (DS) for bioethanol production using separate hydrolysis and co-fermentation (SHCF). *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2020. pp. 1-21. doi: 10.1007/s13399-020-00970-0
- 11 Roukas T., Kotzekidou P. Rotary biofilm reactor: A new tool for long-term bioethanol production from non-sterilized beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* in repeated-batch fermentation. *Journal of cleaner production*. 2020. vol. 257. pp. 120519.
- 12 Keshtkar S., Mezenova O.Y., Hosseini S., Romiani E. The Study of the influence of various factors on the ethanol production by the *Hanseniaspora opuntiae*. *Bulletin of the International Academy of Refrigeration*. 2019. no. 2. pp. 49-54.
- 13 Mezenova O.Y. et al. The study of ethanol production by new strain of yeasts "hanseniaspora opuntiae MK 460485", investigation of its ethanol production in presence of different carbon and nitrogen sources, and optimal conditions. *Journal of Critical Reviews*. 2020. no. 4. pp. 498–505.
- 14 Bleoanca I., Bahrim G. Overview on brewing yeast stress factors. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013. vol. 18. no. 5. pp. 8559-8572.
- 15 Kopecká J., Němec M., Matoulková D., Čejka P. et al. Effect of growth conditions on flocculation and cell surface hydrophobicity of brewing yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2015. vol. 73. no. 2. pp. 143-150. doi: 10.1094/ASBCJ-2015-0324-01
- 16 Lentini A., Rogers P., Higgins V., Dawes I. et al. The impact of ethanol stress on yeast physiology. *Brewing Yeast Fermentation Performance*. 2003. pp. 23-38. doi:10.1002/9780470696040
- 17 Stanley D., Bandara A., Fraser S., Chambers P.J. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of applied microbiology*. 2010. vol. 109. no. 1. pp. 13-24. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x
- 18 Manter D.K., Vivanco J.M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of microbiological methods*. 2007. vol. 71. no. 1. pp. 7-14.

- 19 Davydenko S.G. The creation and application of a new rapid method of assessing the quality of the seed yeast. Beer and beverages. 2012. vol. 5. pp. 20-23.
- 20 Davydenko S.G., Meledina T.V., Ivanova V.A. New foresight methodology for toxicity assessment. Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 2020. vol. 21. no. 3. pp. 333-342.
- 21 Davydenko S.G., Vasilyeva L.M., Batashov B.E., Dedegkaev A.T. Application of yeast staining methods to assess their physiological state. Beer and Drinks. 2011. vol. 5. pp. 8–11. (in Russian).
- 22 Navarro-Tapia E., Pérez-Torrado R., Querol A. Ethanol effects involve non-canonical unfolded protein response activation in yeast cells. Frontiers in microbiology. 2017. vol. 8. pp. 245764. doi: 10.3389/fmicb.2017.00383
- 23 Alexandre H., Ansanay-Galeote V., Dequin S., Blondin B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS letters. –2001. vol. 498. no. 1. pp. 98-103. doi: 10.1016/S0014–5793(01)02503–0
- 24 Yoshida M., Kato S., Fukuda S., Izawa S. Acquired resistance to severe ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* protein quality control. Applied and Environmental Microbiology. 2021. vol. 87. no. 6. pp. e02353-20. doi: 10.1128/AEM.02353–2

Сведения об авторах

Светлана Г. Давыденко к.б.н., руководитель направления развития биотехнологических процессов, ООО «Пивоваренная компания «Балтика», 6-й Верхний пер., 3, г. Санкт-Петербург, 194292, Россия, davydenko@baltika.com
 <https://orcid.org/0000-0001-8005-4743>
Татьяна В. Меледина д.т.н., профессор, факультет биотехнологии, Университет ИТМО, ул. Ломоносова 9, г. Санкт-Петербург, 191002, Россия, meledinata@ya.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-748502802>
Анастасия Андреева доцент практики, заведующий лабораторией, факультет биотехнологий, Университет ИТМО, ул. Ломоносова 9, г. Санкт-Петербург, 191002, Россия, aandreeva@itmo.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-6179-2265>

Вклад авторов

Светлана Г. Давыденко предложила методику проведения эксперимента и организовала производственные испытания
Татьяна В. Меледина обзор литературных источников по исследуемой проблеме, провела эксперимент, выполнила расчёты
Анастасия Андреева написала рукопись, корректировала её до подачи в редакцию и несет ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about authors

Svetlana G. Davydenko Cand. Sci. (Biol.), head of the direction of development of biotechnological processes, LLC Baltika Brewing Company, 194292, St. Petersburg, 6th Upper Lane, 3 Russia, davydenko@baltika.com
 <https://orcid.org/0000-0001-8005-4743>
Tatiana V. Meledina Dr. Sci. (Engin.), professor, biotechnology faculty, ITMO University, 9 Lomonosova str., Saint Petersburg, 191002, Russia, meledinata@ya.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-748502802>
Anastasia Andreeva associate professor, head of the laboratory, biotechnology faculty, ITMO University, 9 Lomonosova str., Saint Petersburg, 191002, Russia, aandreeva@itmo.ru
 <https://orcid.org/0000-0001-6179-2265>

Contribution

Svetlana G. Davydenko review of the literature on an investigated problem, conducted an experiment, performed computations
Tatiana V. Meledina review of the literature on an investigated problem, conducted an experiment, performed computations
Anastasia Andreeva wrote the manuscript, correct it before filing in editing and is responsible for plagiarism

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 24/01/2024	После редакции 12/02/2024	Принята в печать 01/03/2024
Received 24/01/2024	Accepted in revised 12/02/2024	Accepted 01/03/2024