

Морфометрическое исследование клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как метод оценки их физиологического состояния

Канд. биол. наук **Т.А. Кузнецова**, kuznetsova.ta1@spbstu.ru

Канд. биол. наук **О.Б. Иванченко**, obivanchenko@yandex.ru

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

Высшая школа биотехнологии и пищевых производств

194021, Россия, Санкт-Петербург, Новороссийская ул., 48

Проводили оценку морфологического состояния клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании их в различных стрессовых условиях с целью совершенствовать набор методов, позволяющих оценить физиологическое состояние клеток дрожжей в технологическом процессе. Объекты исследования – штаммы пивоваренных дрожжей низового брожения *p. Saccharomyces* W-34/70 и S-189 (Saflager, Бельгия). Изучали состояние дрожжевой популяции в условиях токсического влияния этанола по интенсивности выделения CO₂, а также проводили микроскопическое исследование по выявлению клеток в различном физиологическом состоянии (по возрасту, ультраструктуре, мертвых, ослабленных и живых). Активность дрожжевой популяции определяли по объему выделенного CO₂ экспресс-методом с помощью шприцов. Морфометрическое исследование клеток дрожжей проводили при микроскопировании прижизненных препаратов, измерения проводили инструментами программы анализа микрофотографий Levenguk. Определение количества клеток в дрожжевой суспензии проводили подсчетом в камере Горяева, для выявления мертвых и ослабленных клеток препараты окрашивали метиленовым синим. Установлено, что повышение концентрации этанола в дрожжевой суспензии приводит к уменьшению образования CO₂, что объясняется увеличением доли мертвых клеток в популяции дрожжевых клеток. Уже при концентрации 5% этанола доля мертвых клеток в исследуемых образцах достигает 13%, а при 20% для штамма W-34/70 доходит до 89%, для S-189 – 91%. Увеличение токсического влияния спирта приводит к уменьшению размеров живых клеток (S проекции, мкм²) на 30% (штамм S-189), на 28% (штамм W-34/70), что объясняется плазмолизом. Исследуемые факторы приводят и к изменению формы клеток, они становятся округлыми, что позволяет определить коэффициент формы клеток. Морфофизиологические параметры клеток дрожжевой популяции, являющиеся диагностическими признаками, такие как форма, размер, ультраструктура клеток являются информативными для прогнозирования состояния дрожжевой популяции в технологическом процессе.

Ключевые слова: микробиологические производства; морфофизиологическое исследование; этанольный стресс; дрожжи; *Saccharomyces cerevisiae*; интенсивность брожения.

DOI: 10.17586/2310-1164-2020-10-1-39-46

Morphometric study of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells as a method for evaluating their physiological state

Ph. D. **Tatiana A. Kuznetsova**, kuznetsova.ta1@spbstu.ru

Ph. D. **Olga B. Ivanchenko**, obivanchenko@yandex.ru

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

Graduate School of Biotechnology and Food production

48, Novorossiyskaya str., St. Petersburg, 194021, Russia

The morphological state of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells was assessed when they were cultured under various stressful conditions in order to improve a set of methods that allowed us to evaluate the physiological state of yeast cells in the technological process. The objects of study are strains of bottom-fermented brewing yeast *p. Saccharomyces* W-34/70 and S-189 (Saflager, Belgium). We studied the state of the yeast population under the toxic effects of ethanol by the intensity of CO₂ emission, and also conducted a microscopic study to identify cells various physiological states (age, ultrastructure, dead, weakened, and living). The activity of the yeast population was determined by the volume of CO₂ released by the express method using syringes. A morphometric study of yeast cells was carried out by microscopy of intravital preparations; measurements were carried out using Levenguk microphotography analysis software tools. The number of cells in the yeast suspension was determined by counting in a Goryaev chamber; preparations were stained with blue methylene to detect dead and weakened cells. It was found that an increase in the concentration of ethanol in the yeast suspension leads to a decrease in the formation

of CO₂, which is explained by an increase in the proportion of dead cells in the population of yeast cells. At a concentration of 5% ethanol the proportion of dead cells in the test samples reaches 13%, and at 20% it reaches 89% for strain W-34/70, and 91% for S-189. An increase in the toxic effect of alcohol leads to a decrease in the size of living cells (S projection, μm^2) by 30% (strain S-189), by 28% (strain W-34/70), which is explained by plasmolysis. The studied factors also lead to a change in the shape of the cells, it becomes round, which allows us to determine the shape factor of the cells. Morphophysiological parameters of the cells of the yeast population, which are diagnostic features, such as shape, size, and ultrastructure of the cells are informative for predicting the state of the yeast population in the process.

Keywords: microbiological production; morphophysiological study; ethanol stress; yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; fermentation rate.

Введение

В настоящее время состояние дрожжей определяется терминами жизнеспособность и/или жизненность (витальность). Жизнеспособность чаще измеряется числом «живых и мертвых» клеток, а жизненность – это мера энергичности или физиологического состояния клеток (жизненная сила, жизнестойкость). Многие предприятия сегодня используют сухие дрожжи [1], поскольку это рационально: их удобно дозировать, хранить и транспортировать. Жидкие дрожжи имеют небольшой срок хранения (теряют в месяц около 20% живых клеток), требуют специальных условий транспортировки. Сухие же дрожжи во время хранения, к которому предъявляется меньше требований, теряют всего 2% жизнеспособных клеток, поэтому их срок годности может быть до 2 лет. Вместе с тем, использование сухих дрожжей порождает ряд проблем, связанных с их активностью, поэтому ряд работ посвящен именно их активации [2–4]. Жизнеспособность клеток определяется методами культивирования или способами окрашивания (при использовании светопольной и флуоресцентной микроскопии) [5]. Жизнеспособность при выращивании на агаризованной среде оценивается по количеству колониеобразующих единиц, после их культивирования в течение 72 ч. [6]. Методом выращивания на предметных стеклах можно определить способность к размножению отдельной клетки [7].

В настоящее время для определения живых и мертвых клеток используют самые разные красители – это и метиленовый синий, метиленовый фиолетовый [6]. Ввиду того, что у оптических красителей, используемых при микроскопии, существует много ограничений, были предложены флуоресцентные красители [8]. Самым распространенным красителем для светопольной микроскопии является метиленовый синий («метиленовая синь»). При окрашивании клеток этим красителем мертвые клетки приобретают синий цвет. Хотя данный метод не всегда дает 100% ответ о жизнеспособности клеток, он в настоящее время наиболее широко используется на всех производствах и в лабораториях.

Под жизненностью или витальностью дрожжевых клеток понимают их активность или способность восстанавливаться после физиологического стресса. На сегодняшний день разработано много методов определения жизнеспособности клеток: определение скорости размножения, измерение содержания компонентов клетки (белка, РНК, ДНК) [9], выделение CO₂ [10], потребление кислорода и активность ферментов, оценка метаболической активности и др. Одним из наиболее доступных методов является определение жизнеспособности дрожжей по степени изменения pH суспензии [11].

Вместе с тем, несмотря на широкий методический арсенал, в производственных условиях крайне трудно следить за состоянием клеток и производить оценку физиологического состояния дрожжей.

Цель исследования – проанализировать морфометрические характеристики клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании их в различных стрессовых условиях, а именно, определить размеры, форму и ультраструктуру дрожжевых клеток, позволяющие оценить их состояние в разных производственных ситуациях.

Задачи исследования:

- скрининг морфологических характеристик клеток дрожжевой популяции с учетом возрастных особенностей и условий культивирования;
- оценка влияния этилового спирта разной концентрации на интенсивность размножения клеток дрожжей, количество мертвых и ослабленных клеток в популяции и физиологическую активность по интенсивности выделения CO₂.
- анализ состояния клеток дрожжей по морфометрическим параметрам при влиянии этилового спирта разной концентрации.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования явились пивоваренные штаммы дрожжей низового брожения *p. Saccharomyces W-34/70* и *S-189 (Saflager, Бельгия)*. В опыте использовали сухие дрожжи, которые вносили в сусло из расчета 0,1 г на 100 мл не охмеленного сусла. Эффективность процесса брожения определяли по интенсивности образования CO_2 модифицированным экспресс-методом [10]. Все исследуемые образцы подвергались воздействию спирта разной концентрации (5; 10; 15; 20%). Для проведения исследования смешивали компоненты (дрожжи, сусло и спирт) и в шприцы объемом 10 см³ набирали 2 см³ приготовленной смеси. В контрольный образец вместо спиртового раствора вносили такое же количество воды. Шприцы герметично запаивались и помещались в термостат при температуре 32°C на 24 ч. После этого с помощью шкалы шприца определяли объем выделившегося углекислого газа ($V \text{ CO}_2$, мл). При брожении образующийся углекислый газ выталкивал поршень из шприца. Сравнивая интенсивность образования углекислого газа в опытном и контрольном вариантах, по величине продвижения поршня, мы судили о бродильной активности клеток. Опыты проводили в трехкратной повторности.

Изучение морфологического состояния дрожжевых клеток проводили при микрокопировании препаратов при увеличении 160 и 640 раз (количество измеряемых клеток превышало 50). Определение количества мертвых и живых клеток проводили путем подсчета в камере Горяева при окрашивании метиленовым синим.

Результаты и их обсуждение

Для моделирования формы дрожжевой клетки использовали анализ видео, снятый цифровой камерой для микроскопа IS-500 (ув. в 1000 раз). Готовили препарат «висячая капля» с избытком воды и при удалении ее избытка фильтровальной бумагой, клетки по инерции двигались, вращаясь, имели форму эллипсоида (рисунок 1б). При исключении воздействия на клетки, они приобретали устойчивое положение, длинной осью располагались параллельно предметному стеклу. Сечение клетки выглядит в виде эллипса (рисунок 1а).



Рисунок 1 – Схематичное изображение формы эллипсоидной клетки:
 а – сечение клетки в виде эллипса; б – эллипсоид
 Figure 1. Ellipsoid cell: а – cell cross section of elliptical form; б – ellipsoid

Длинная полуось – a , короткая полуось b равна полуоси. Размер клеток чаще всего характеризуют длинной и короткой осью, однако более объективно определять площадь эллипса по формуле

$$S = \pi ab,$$

где S – площадь эллипса, мкм²;

π – 3,1415;

a – длина большой полуоси, мкм;

b – длина малой полуоси, мкм.

Для характеристики формы определяли коэффициент удлиненности (K_e) – отношение длинной оси к короткой [12].

Сравнение морфологических параметров дрожжевых клеток в разных физиологических состояниях. В дрожжевой суспензии, как правило, все клетки разновозрастные: почкующиеся, молодые, зрелые (основные), мертвые, поэтому суспензию характеризуют как «неоднородную» (рисунок 2).

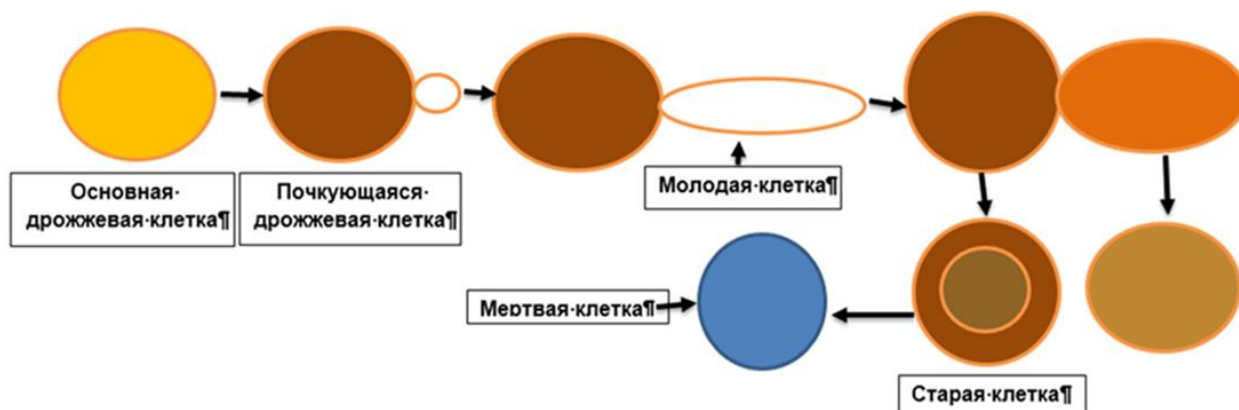


Рисунок 2 – Ранжирование клеток по физиологическому состоянию [13]
 Figure 2. Cell ranging according their physiological state [13]

Возрастные морфологические признаки можно выявить при микроскопировании дрожжевой популяции. Молодые и старые клетки имеют разную физиологическую активность, что немаловажно учитывать при брожении (таблица 1) [6].

Таблица 1. Морфологические показатели физиологического состояния дрожжевой клетки
 Table 1. Morphological indicators of yeast cell physiological state

Физиологическое состояние дрожжей	Морфологические признаки				
	вакуоли	форма клетки	гликоген (окрашивание I ₂)	особенности клеточной стенки	окрашивание метиленовым синим
«молодые» клетки	мелкие, много	вытянутая	малое количество (слабое)	тонкая, эластичная	нет
«зрелые» клетки (основные)	мелкие, много	круглая	накопление (интенсивное)	утолщается, появляются рубцы	нет
«старые» клетки	большая, одна	круглая	выявляется плохо	мощная, рубцов много	нет
«мертвые» клетки	чаще всего одна большая	круглая	малое количество (слабое)	толстая, рубцов много	да

Физиологически более активными являются клетки без вакуолей или с много пузырчатыми вакуолями. По мере роста вакуолей уменьшается поверхность мембран цитоплазматической сети [14]. Цитоплазматическая сеть принимает активное участие в питании и размножении дрожжей, поэтому ее сокращение приводит к старению клетки, снижению интенсивности протекающих в ней обменных процессов. Физиологически малоактивными являются клетки с утолщенной клеточной стенкой. Утолщение клеточной стенки происходит в случае дисбаланса между углеродом, азотом и фосфором в питательной среде, а также при наличии в ней ингибиторов роста [6].

Возможности использования морфометрического метода в исследовании клеток дрожжей изучались на дрожжах *S. cerevisiae* штаммы W-34/70 и S-189. Обработка фотографий (контрастирование, изменение яркости цвета и т.д.) позволила различить молодые клетки с мелкими вакуолями и старые клетки с одной крупной вакуолью, занимающей практически все пространство в цитоплазме (рисунок 3). Окрашивание метиленовым синим позволило выявить живые (неокрашенные), мертвые (окрашенные в темно-синий цвет), и ослабленные (имеющие слабую голубую окраску) клетки.

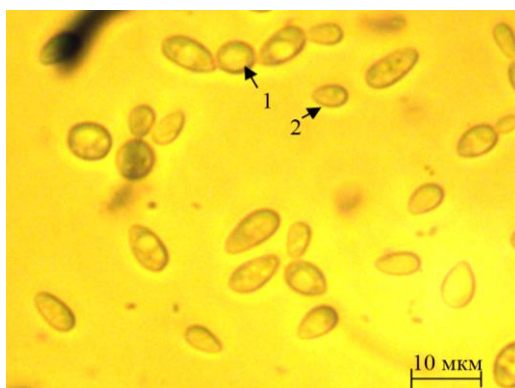


Рисунок 3 – Популяция клеток дрожжей:

1 – крупные, зрелые клетки с одной вакуолью; 2 – молодые клетки с мелкими вакуолями

Figure 3. Yeast cell population: 1 – large, mature cells with one vacuole; 2 – young cells with small vacuoles

Размеры дрожжевых клеток в контрольном варианте очень сильно варьируются (коэффициент вариации составил 20–40%), что связано с неоднородностью дрожжевой популяции. Размеры клеток зависят от штамма, возраста клеток, физиологического состояния и условий их культивирования. Количество мелких клеток в оптимальных условиях культивирования не должно превышать 5–10% и лишь в конце процесса может достигать 15%. Увеличение числа мелких клеток в начале или середине процесса свидетельствует о нарушении технологии [15, 16]. Для выявления информативных морфологических признаков дрожжевых клеток, подверженных влиянию стрессового фактора использовали различные концентрации спирта. Контрольный образец не содержал спирта. Оценивали изменение количества клеток в 1 мл суспензии (таблица 2), форму и размеры живых и ослабленных клеток.

Таблица 2. Влияние этилового спирта на размножение клеток дрожжей

Table 2. The influence of ethyl alcohol on yeast cell multiplication

Вариант опыта	Количество клеток ($\times 10^5$) в 1 мл суспензии	
	34/70	S-189
в начале культивирования	37 ± 3	70 ± 5
после культивирования с внесением в среду этанола в количестве (%):		
0 (контроль)	120 ± 9	238 ± 18
5	110 ± 8	160 ± 12
10	65 ± 5	125 ± 9
20	40 ± 3	82 ± 6

Уже при действии 5% этанола наблюдается снижение интенсивности почкования дрожжевых клеток. У штаммов достоверных отличий нет. При внесении в суслу 10% этанола его влияние более выражено, что проявляется в уменьшении количества клеток и возникновении агрегации дрожжевых клеток (образуются флоккулы). Наибольшее токсическое воздействие оказывает 20% раствор спирта, что сопровождается достоверным уменьшением числа дрожжевых клеток.

Интенсивность выделения углекислого газа характеризует бродильную активность дрожжей. Наибольшее количество углекислого газа в контрольных образцах (без этанола) наблюдается у штамма S-189 (таблица 3).

С увеличением доли вносимого этанола в суспензии количество CO_2 прямо пропорционально уменьшается. Наибольшее влияние оказывают 20% раствор спирта. При увеличении концентрации этилового спирта увеличивается доля мертвых и ослабленных (окрашенных метиленовым синим) клеток (таблица 3), также наблюдается флокуляция клеток.

Наиболее уязвимыми являются молодые клетки, мелкие без накопления гликогена. В варианте опыта с максимально исследуемой концентрацией этанола практически все клетки окрашиваются метиленовым синим (процент мертвых клеток для штамма W-34/70 составляет 89%, для S-189 – 91%).

Таблица 3. Содержание мертвых и ослабленных клеток, образование CO₂ при влиянии этанола разной концентрации

Table 3. The number of dead and weekend cells and CO₂ formation under the influence of ethanol in different concentrations

Концентрация этанола, %	W-34/70		S-189	
	V CO ₂ , мл	количество мертвых и ослабленные клетки, %	V CO ₂ , мл	количество мертвых и ослабленные клетки, %
0 (контроль)	4,50 ± 0,25	8,0 ± 2,8	5,0 ± 0,25	10,0 ± 3,4
5	2,40 ± 0,10	13,0 ± 3,2	3,85 ± 0,20	13,0 ± 1,8
10	0,62 ± 0,10	39,0 ± 3,9	1,55 ± 0,20	35,0 ± 2,4
20	0,20 ± 0,10	89,0 ± 5,2	0,20 ± 0,10	91,0 ± 9,1

Обработка микрофотографий с помощью программного компьютерного обеспечения MC-foto и Левенгук позволили измерить длину, ширину клеток и определить их площадь проекции, а также рассчитать коэффициент удлиненности клеток (K_y). Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Морфологическая характеристика неокрашенных метиленовым синим дрожжевых клеток (штаммов: S-189, W-34/70)

Table 4. Morphological characteristics of yeast cells (S-189 and W-34/70 strains) unstained with methylene blue

	K _y		Длина, мкм		Ширина, мкм		S, мкм ²	
	S-189	W-34/70	S-189	W-34/70	S-189	W-34/70	S-189	W-34/70
Контроль	1,22 ± 0,03	1,21 ± 0,05	5,31 ± 0,19	5,99 ± 0,33	4,40 ± 0,15	5,02 ± 0,23	18,95 ± 1,12	24,82 ± 2,39
5%	1,12 ± 0,03	1,20 ± 0,02	4,73 ± 0,21	5,66 ± 0,11	4,25 ± 0,18	4,73 ± 0,06	16,57 ± 1,66	21,41 ± 0,59
10%	1,10 ± 0,02	1,09 ± 0,02	4,22 ± 0,13	4,90 ± 0,16	3,85 ± 0,13	4,53 ± 0,15	13,03 ± 0,80	17,77 ± 1,10
20 %	1,08 ± 0,01	1,08 ± 0,01	4,10 ± 0,13	4,85 ± 0,15	3,80 ± 0,12	4,50 ± 0,14	12,23 ± 0,50	17,13 ± 0,05

При увеличении токсического воздействия этанола наблюдается уменьшение коэффициента удлиненности живых клеток у всех изучаемых штаммов, клетки становятся округлыми (рисунок 4). Изменение формы дрожжевых клеток сопряжено с уменьшением удельной площади поверхности клеток дрожжевой популяции, что приводит к снижению их метаболизма [12].

Увеличение воздействия этанола приводит к уменьшению площади проекции основных клеток (рисунок 5). Происходящее можно описать как плазмолиз, когда вода по градиенту концентрации переходит в окружающую среду, а клетки при этом «сжимаются» (сжимаются) [6].

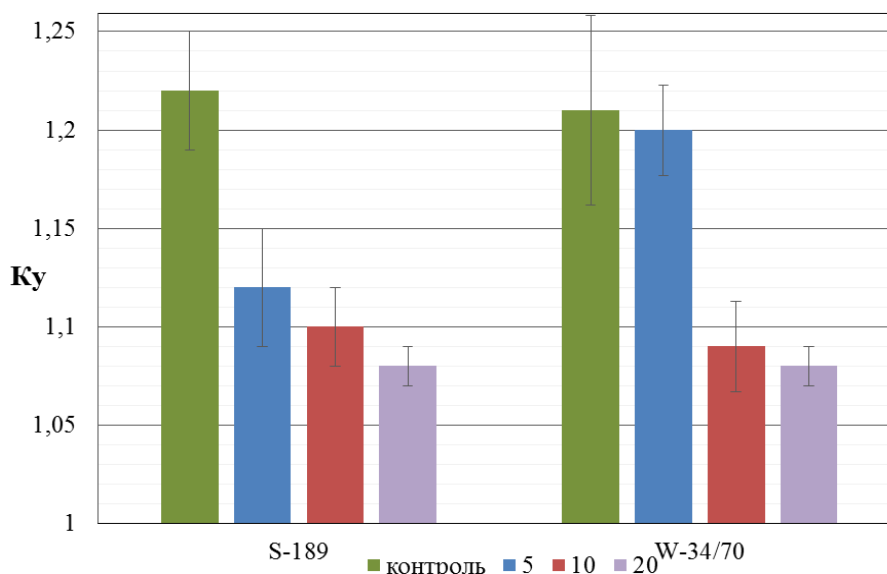


Рисунок 4 – Изменение коэффициента удлиненности (K_y) основных дрожжевых клеток при токсическом действии этилового спирта

Figure 4. The changes in coefficient of elongation (K_y) of the main yeast cells under toxic influence of ethyl alcohol

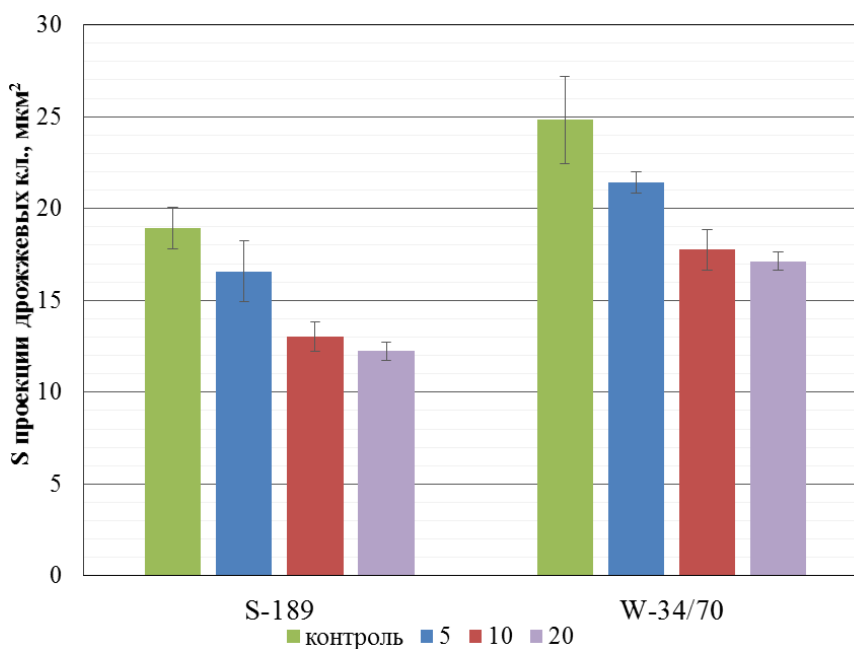


Рисунок 5 – Изменение площади проекции основных дрожжевых клеток при токсическом действии этилового спирта

Figure 5. The changes in projected area of the main yeast cells under toxic influence of ethyl alcohol

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. При микроскопии клеток дрожжевой популяции по морфологическим признакам (характеризующим размер и форму клеток, с учетом ультраструктуры) можно выявить клетки в различных физиологических состояниях: различного возраста, в состоянии стресса. При увеличении токсического воздействия этанола показатели формы и размера клеток закономерно изменяются.

2. Негативное влияние этанола подтверждено изменением показателей, характеризующих физиологические процессы в клетках дрожжевой популяции: с увеличением доли вносимого этанола в суспензии количество CO₂ прямо пропорционально уменьшается, наибольшее влияние оказывают 20% раствор спирта. Интенсивность почкования клеток также уменьшается обратно пропорционально доле вносимого этанола.

3. Увеличение концентрации этанола в среде приводит к появлению признаков стресса клеток дрожжевой популяции: растет доля ослабленных и мертвых клеток, при этом наблюдается флокуляция клеток. Наиболее уязвимыми к токсическому воздействию спирта являются молодые мелкие клетки.

4. Влияние стрессовых факторов (токсическое воздействие этанола) приводит к изменению морфологических параметров клеток: клетки становятся более округлыми, площадь проекции уменьшается вследствие плазмолиза.

Заключение

Проведенные анализы позволяют заключить, что морфометрический анализ клеточной популяции дрожжей, проведенный на основе микрофотографий препаратов, дает возможность дифференцировать клетки, определять их размер, форму, что в свою очередь, позволяет быстро оценить состояние клеток в ходе технологического процесса.

Литература

1. Китиссоу П.К., Андреев А.Н. Исследование влияния сухих инстантных дрожжей в технологии быстрозамороженных тестовых полуфабрикатов на свойства теста и качество изделий // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2015. № 1. С. 70–78.
2. Mesquita T.J.V., Sargo C.R., Fuzer J.R., et al. Metabolic fluxes-oriented control of bioreactors: a novel approach to tune micro-aeration and substrate feeding in fermentations. *Microb Cell Fact.* 2019, V. 18, Is. 150, pp. 1–7.
3. Кузнецова Т.А., Иванченко О.Б. Влияние ценных компонентов биомассы *Chlorella sorokiniana* на жизнедеятельность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Вестник КрасГАУ. 2019. №. 11(152). С. 151–157.
4. Пермякова Л.В. Исследование возможности использования пищевых подкормок на стадии хранения пивных дрожжей // Вестник КрасГАУ. 2018. № 3. С. 146–151.

5. 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. № 5. С. 8–11.
6. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2004. 221 с.
7. Прунтова О.В., Сахно О.Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии. Владимир: Изд-во Владимирского гос. ун-та, 2005. 76 с.
8. Skruzny M., Pohl E., Abella M. FRET Microscopy in Yeast. *Biosensors*. 2019. V. 9, Is. 4, pp. 122–139.
9. Vowinckel J., Hartl, J., Butler R., Ralser M. MitoLoc: A method for the simultaneous quantification of mitochondrial network morphology and membrane potential in single cells. *Mitochondrion*. 2015, no. 24, pp. 77–86.
10. Давыденко С.Г. Создание и применение нового экспресс-метода оценки качества семенных дрожжей // Пиво и напитки. 2012. № 5. С. 20–23.
11. Ямашев Т.А., Решетник О.А. Влияние предварительной активации дрожжей пероксидом водорода на их адаптацию к осмотическому стрессу // Вестник КНИТУ. 2010. № 11. С. 301–306.
12. Боргоякова А.С. Кузнецова Т.А., Иванченко О.Б. Разработка морфофизиологического метода оценки качества дрожжей // Пищевые технологии и биотехнологии: сб. тр. Казань: БРИГ, 2016. С. 97–99.
13. Кузнецова Т.А., Иванченко О.Б., Калинин Н.С. Влияние компонентов шиповника на морфофизиологическое состояние клеток дрожжей // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. № 8(62). Часть 2. С. 16–20.
14. Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М. Физиологическое состояние дрожжей. СПб: Изд-во Ун-та ИТМО, 2013. 48 с.
15. Крикунова Л.Н., Рябова С.М., Песчанская В.А., Урусова Л.М. Влияние янтарной кислоты на метаболизм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Пиво и напитки. 2015. № 1. С. 36–38.
16. Świącilo A. Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast-new insight into an old phenomenon. *Cell Stress Chaperones*. 2016, V. 21, Is. 2, pp. 187–200.

References

1. Kitissou P.K., Andreev A.N. Investigation of the influence of dry instant yeast in technology frozen test finished test properties and quality of products. *Processes and Food Production Equipment*. 2015, no. 1, pp. 70–78 (*In Russian*).
2. Mesquita T.J.B., Sargo C.R., Fuzer J.R., et al. Metabolic fluxes-oriented control of bioreactors: a novel approach to tune micro-aeration and substrate feeding in fermentations. *Microb Cell Fact*. 2019, V. 18(150), pp. 1–7.
3. Kuznecova T.A., Ivanchenko O.B. The influence of valuable components of chlorella sorokiniana biomass on the vitality of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Herald KrasGAU*. 2019, V. 11(152), pp. 151–157 (*In Russian*).
4. Permjakova L.V. The research of the possibility of using food top dressings at the stage of beer yeast storage. *Herald KrasGAU*. 2019, V.11 (152), pp. 151–157 (*In Russian*).
5. Davidenko S.G., Vasileva L.M., Batashov B.E., Dedegkaev A.T. Application of methods of yeasts dyeing to estimate their physiological state. *Beer and Beverages*. 2011, no. 5, pp. 8–11 (*In Russian*).
6. Bab'eva I.P., Chernov I.Y. *Yeast biology*. Moscow, Fellowship of Scientific Publications KMK Publ., 2004. 221 p. (*In Russian*).
7. Pruntova O.V., Sahno O.N. *Laboratory workshop on general microbiology*. Vladimir, Vladimir State University Publ., 2005. 76 p. (*In Russian*).
8. Skruzny M., Pohl E., Abella M. FRET Microscopy in yeast. *Biosensors*. 2019. V. 9, Is. 4, pp. 122–139.
9. Vowinckel J., Hartl, J., Butler R., Ralser M. MitoLoc: A method for the simultaneous quantification of mitochondrial network morphology and membrane potential in single cells. *Mitochondrion*. 2015, no. 24, pp. 77–86.
10. Davidenko S.G. The creation and application of a new rapid method of assessing the quality of the seed yeast. *Beer and Beverages*. 2015, no. 1, pp. 36–38 (*In Russian*).
11. Yamashev T.A., Reshetnik O.A. The effect of pre-activation of yeast with hydrogen peroxide on their adaptation to osmotic stress. *Proceedings of Kazan Technological University*. 2010, no. 11, pp. 301–306 (*In Russian*).
12. Borgoyakova A.S., Kuznecova T.A., Ivanchenko O.B. Development of a morphophysiological method for evaluating the quality of yeast. *Food Technology and Biotechnology. Proceedings of the Conference Title* (Kazan, 13–14 April 2016). Kazan, Brig, 2016, pp. 97–99 (*In Russian*).
13. Kuznecova T.A., Ivanchenko O.B., Kalinkin N.S. Influence of the rose hips components on the morpho-physiological state of yeast cells. *International Research Journal*. 2017, no. 8(62), Part 2, pp. 16–20 (*In Russian*).
14. Meledina T.V., Davidenko S.G., Vasileva L.M. *Physiological state of yeast*. St. Petersburg, ITMO University Publ., 2013. 48 p. (*In Russian*).
15. Krikunova L.N., Ryabova S.M., Peschanskaya V.A., Urusova L.M. Effects of succinic acid on the metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Beer and Beverages*. 2015, no. 1, pp. 36–38 (*In Russian*).
16. Świącilo A. Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast-new insight into an old phenomenon. *Cell Stress Chaperones*. 2016, V. 21, Is. 2, pp. 187–200.

Статья поступила в редакцию 24.01.2020