

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО–ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

УДК 664.865:663.1

ХАМИДОВА АБДУЛЛАХОН ФАЙЗУЛЛАЕВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА
БИОСИНТЕЗ ЭТАНОЛА ДРОЖЖАМИ ИЗ СОКА ТОПИНАМБУРА**

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание академической степени магистра по
специальности 5А321001 «Технология производства и
переработки пищевых продуктов» (Технология производства вина
и спирта)

Научный руководитель к.б.н.,
доцент Хакимова Ш.И.

Ташкент - 2017

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ТРАДИЦИОННОЕ И НЕТРАДИЦИОННОЕ СЫРЬЁ И ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ДРОЖЖЕЙ СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА	9
1.1. История распространения топинамбура в различных странах и его целебные свойства	9
1.2. Производство этанола из традиционного сырья	14
1.3. Получение этилового спирта из топинамбура и комплексная переработка топинамбура	20
1.4. Характеристика основных групп дрожжей спиртового производства	24
Выводы по первой главе	37
ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ, МЕТОДИКА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
2.1. Методика и методы приготовления микроскопических препаратов	39
2.2. Определение размеров микробной клетки	42
2.3. Методика количественного учёта дрожжей методом прямого подсчёта клеток в счётных камерах	45
2.4. Метод определения массовой концентрации сухих веществ рефрактометрическим методом	46
2.5. Методы определения кислотности, рН, содержания этилового спирта в сброженном дрожжами соке клубней топинамбура	47
Выводы по второй главе	51
ГЛАВА III. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ДРОЖЖИ, ОТОБРАННЫЕ ПУТЁМ СКРИНИНГА, ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЭТАНОЛА ПРИ СБРАЖИВАНИИ ИМИ СОКА ТОПИНАМБУРА.	52
3.1. Исследование бродильной активности различных рас дрожжей для выявления штаммов активно сбраживающих сок топинамбура	52
3.2. Морфологические особенности и динамика роста дрожжей, активно сбраживающих сок топинамбура, в течение 7 суток культивирования	57
3.3. Определение оптимальных условий культивирования дрожжей, способствующих повышению выхода спирта, путём изучения влияния различных факторов среды	65
3.4. Получение опытных образцов этилового спирта из сока клубней топинамбура в лабораторных условиях и изучение их физико-химических показателей	82
ВЫВОДЫ	87
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	88
ПРИЛОЖЕНИЯ	99
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ	100

ВВЕДЕНИЕ

14 января 2017 года состоялось расширенное заседание Кабинета Министров, посвящённое всестороннему анализу итогов социально-экономического развития страны в 2016 году и определению важнейших направлений и приоритетов экономической и социальной программы правительства республики на 2017 год.

На заседании с докладом выступил Президент Республики Узбекистан Шавкат Мирзиёев.

В своём докладе Президент страны, детально и всесторонне анализируя имеющиеся нерешённые проблемы и используемые не в полной мере резервы, внёс предложения по ключевым стратегическим задачам и важнейшим приоритетам экономической и социальной программы республики на 2017 год. Среди приоритетных задач центральное место отведено развитию постоянного, открытого диалога с населением в рамках реализации Государственной программы «Год диалога с народом и интересов человека», продолжению активной социальной политики, направленной на дальнейшее повышение уровня и качества жизни населения, его материального благосостояния.

Перед правительством, руководителями министерств, ведомств, хозяйственных объединений и органов исполнительной власти на местах поставлены конкретные задачи по устранению недостатков в развитии отраслей и территорий, а также выработке и осуществлению комплекса мер, направленных на сохранение высоких темпов роста экономики.

По итогам обсуждения принято решение правительства республики, в котором определены практические меры по обеспечению реализации важнейших направлений и приоритетов программы социально-экономического развития страны на 2017 год. [1].

Спиртовая промышленность Узбекистана в настоящее время является одной из крупных, научно – технически развитых отраслей

народного хозяйства. В ней освоены непрерывные технологические процессы разваривания зернового сырья, осахаривания разваренной массы и её вакуум охлаждения, сбраживания сула.

Основные процессы технологии – превращение крахмала в сахар, а сахара в этиловый спирт происходит под действием ферментов дрожжей[2, 3]. Этиловый спирт находит широкое применение в народном хозяйстве. Его главный потребитель – пищевая промышленность. Спирт используется для приготовления ликёроводочных изделий, плодово – ягодных вин, в производстве уксуса, пищевых ароматизаторов и парфюмерно – косметических изделий. В микробиологической и медицинской промышленности спирт применяется для осаждения ферментных препаратов из культуральной жидкости или экстракта из твёрдофазной культуры, для получения витаминов, различных лекарственных препаратов, в качестве дезинфицирующего средства и вещества, предотвращающего инфицирование и порчу лечебных экстрактов. Небольшие количества спирта расходуются в химической, машиностроительной, автомобильной и других отраслях промышленности, а также в ветеринарии.

В Узбекистане и во многих странах мира для производства этанола основным сырьём является зерно.

Спиртовая отрасль – материалоёмкая, в структуре себестоимости спирта сырьё занимает более 60 % от общих затрат, поэтому замена его на нетрадиционное более дешёвое сырьё позволит повысить рентабельность производства и одновременно сэкономить ценные пищевые ресурсы страны – зерно [4]. Учитывая, что в отдельные периоды работы спиртовые предприятия сталкиваются с трудностями снабжения зерновым сырьём (его применяют и для других отраслей), поиск альтернативного более простого в переработке и менее дорогостоящего сырья остаётся на сегодняшний день актуальной задачей. Среди многообразия

нетрадиционных видов растений одним из перспективных для хозяйственного использования является топинамбур.

Только в последние 5 – 6 лет учёными НИИ растениеводства были созданы новые сорта топинамбура с высоким содержанием инулина «Мужиза» и «Файз – барака» с урожайностью 60 – 80 т/га. Топинамбур – уникальное сырьё для производства этанола.

Актуальность темы. Топинамбур для Узбекистана является новым перспективным углеводсодержащим сырьём для производства этилового спирта, так как топинамбур для спиртовой промышленности – самый дешёвый вид сырья. Выход спирта из данного нетрадиционного для отрасли вида сырья в 1,5 – 3,5 раза выше, чем при переработке пшеницы и картофеля при пересчёте на 1 га [5, 6].

В силу экологической пластичности ареал распространения топинамбура весьма широк - от тропиков до северных районов. Топинамбур не требователен к почвенному плодородию, его можно выращивать на любых почвах [7, 8]. Это высокопродуктивное растение, устойчиво к неблагоприятным условиям, эффективно использующее солнечную энергию для роста и развития. Обладая мощной корневой системой, растения хорошо переносят засухи. Одновременно топинамбур обладает высокой холодоустойчивостью. Клубни выдерживают замораживание до минус 20 °С, не теряя при этом жизнеспособности [9, 10, 11]. Кроме того клубни топинамбура обладают очень низким коэффициентом накопления токсических веществ (нитратов, тяжёлых металлов, радионуклидов), по сравнению с другими сельскохозяйственными культурами [12], растение не имеет специализированных вредителей и болезней.

Топинамбур (земляная груша) не накапливает после себя ингибиторов роста и токсинов, устойчива к губительным для других растений концентрациям ксенобиотиков, переносит повышенное

содержание оксидов серы, азота, сероводорода, аммиака и других газов [13].

В связи с тем, что на спиртовых заводах страны этанол получают из зерна – крахмалсодержащего сырья, а топинамбур содержит полисахарид инулин, используемые спиртовые дрожжи необходимо заменить дрожжами, хорошо сбраживающими сок топинамбура с высоким биосинтезом этанола.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР.

Диссертационная работа выполнялась по теме ППИ – 12 Новые технологии получения органических, неорганических, полимерных и других естественных материалов, по прикладному проекту «Разработка теоретических основ биосинтеза этанола из инулинсодержащего сырья».

Цель исследования. Целью данной диссертационной работы было под воздействием различных факторов внешней среды повысить биосинтез этанола дрожжами, которые активно сбраживают сок клубней топинамбура и были отобраны методом скрининга коллекционных культур дрожжей.

Задачи исследования:

- изучение влияния содержания сухих веществ и рН в соке из клубней топинамбура на бродильную активность дрожжей;
- изучение влияния количества посевного материала дрожжей и температуры на бродильную активность дрожжей;
- исследование динамики роста дрожжей, активно сбраживающих сок клубней топинамбура;
- определение физико-химических показателей сока клубней топинамбура, сброженного различными активными штаммами дрожжей.

Научная новизна и основные положения, выносимые на защиту.

Из коллекции промышленных микроорганизмов кафедры Технологии пищевых продуктов ТХТИ были отобраны 14 штаммов спиртовых, винных, пивных и каротинсинтезирующих дрожжей. В

результате скрининга этих дрожжей отобраны 6 перспективных штаммов, сбраживающих сок топинамбура. В качестве контроля нами использован штамм дрожжей *Kluyveromycesmarxianus*Y-303 полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), который в настоящее время считают одним из лучших культурв мире хорошо сбраживающих сок из клубней топинамбура.

Исследовано влияние различных факторов внешней среды для повышения биосинтеза этилового спирта дрожжами, активно сбраживающими сок клубней топинамбура. Путём скрининга и определения оптимальных условий внешней среды для биосинтеза этанола получены более продуктивные дрожжи, чем *Kluyveromycesmarxianus*Y-303.

Научной новизной работы считаем, что по биосинтезу этанола в результате скрининга получены более продуктивные дрожжи, чем *Kluyveromycesmarxianus*Y-303.

Практическая значимость. По мнению многих учёных, посвятивших исследования получению этанола из топинамбура, является приемлемым применение дрожжей вида *Kluyveromyces*[14 - 19]. Скрининг дрожжейпутём культивирования дрожжей на соке клубней топинамбура местных сортов «Мужиза» и «Файз – барака» позволил отобратькультуры хорошо сбраживающие именно местные сорта топинамбура. Следовательно, сырьё для получения этанола – клубни местных сортов топинамбура, химический состав которых благоприятен для метаболизма подобранных дрожжей и способствует активному биосинтезу этанола дрожжами.

Объекты и предмет исследований. Объектами исследований были различные штаммы спиртовых, винных, пивных и каротинсинтезирующих дрожжей, а также сок из клубней местных сортов топинамбура. Предметом исследований был скрининг дрожжей и определение оптимальных

параметров культивирования их для повышения биосинтеза этанола из сока клубней топинамбура.

Апробация работы. Изучение динамики роста и сбраживающей активности дрожжей в соке топинамбура. Актуальные вопросы в области технических и социально-экономических наук: Республиканский межвузовский сборник научных трудов 2017 г. Изучение и отбор различных рас дрожжей, активно сбраживающих сок топинамбура. Актуальные вопросы в области технических и социально-экономических наук: Республиканский межвузовский сборник научных трудов 2016 г.

Структура диссертаций. Диссертация изложена на 100 страницах. Состоит из введения, трёх глав, выводов, списков опубликованных материалов по теме диссертации, использованной литературы и приложений. В диссертации приведены 13 рисунков и 13 таблиц.

Научно–техническая база. Научные исследования проведены в лабораториях факультета Технологии пищевых производств ТХТИ и в лаборатории Микробиоконверсии растительного сырья Института микробиологии АНУз.

**ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. ТРАДИЦИОННОЕ И
НЕТРАДИЦИОННОЕ СЫРЬЁ И ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ДРОЖЖЕЙ
СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА.**

1.1. История распространения топинамбура в различных странах и его целебные свойства.

Среди многообразия нетрадиционных видов растений одним из перспективных для хозяйственного использования является топинамбур. Топинамбур, или земляная груша, является клубненосным растением из семейства сложноцветных и принадлежит к роду *Helianthus*. Он имеет гибридное происхождение и в своём первичном формообразовании приурочен к Северной Америке. В Европу растение завезли французские моряки из экспедиции Лескарбо в 1605 году. В России топинамбур распространился во второй половине XVII в [65].

Во многих государствах Европы топинамбур, как лекарственная и пищевая культура, получил особенно широкое применение за последние 15 – 20 лет. Анализ литературы показал, что из его клубней можно изготовить более 200 видов продуктов питания и во многих из них топинамбур составляет белковую основу. Известно, что из клубней топинамбура вырабатывают спирт, фруктозу, дрожжи и др. [66, 67].

Интерес к топинамбуру во многих странах, в частности, во Франции, Германии, Венгрии, Австралии, Италии, Китае и США настолько велик, что правительства этих стран выделяют огромные средства на поддержание и развитие научно – исследовательских программ, направленных на разработку новых аспектов его применения: пищевых, медико – биологических и лечебных целях [68, 69].

В России топинамбур впервые появился более 200 лет назад. Его разводили как кормовую, а потом и как пищевую культуру. Его тогда называли «Земляной грушей», или волжской репой, а то и просто репой. В исследовании топинамбура на Руси большой вклад внёс В.И. Козловский [70], который ещё в 1911 году писал о земляной груше: «Это единственное растение из всех разводимых, которое даёт большие урожаи

почти без затрат труда, не опасаясь ни мороза, ни засухи, ни дождя, ни плохой почвы..., а что для нас очень важно – не требует почти никакого ухода и не наказывает, как другие растения, за небрежность в летних работах около него или даже за невыкапывание его на зиму. Одним словом, это идеальное, самой судьбой посланное нам растение»[66, 70].

В начале 1930 года, интерес к топинамбуру проявил академик Н.И. Вавилов. Под его руководством проводились исследования по агротехнике, биологии, а также технологической переработке и хранению топинамбура[70].

В 1929 году была опубликована, предложенная В.С. Лехновичем, классификация топинамбура по признакам клубня[71], а в 1933 году по инициативе Н.И. Вавилова в Москве состоялась Первая Всесоюзная конференция по топинамбуру. Почти 50 лет – с конца 30-х до середины 80-х годов XX века для топинамбура в России длился период забвения. А в 90-е годы возникла новая волна интереса к нему не только в России, но и в других странах, в частности, в Узбекистане. В Ферганской долине, Джизакской, Сурхандарьинской и Ташкентской областях начали выращивать топинамбур под названием «Ер ноки», в основном, для использования в качестве кормовой культуры [72].

В Казахстан топинамбур был завезён из Китая, поэтому называли его «Китай картошкасы»[73].

Клубни топинамбура богаты углеводами, минеральными элементами, витаминами группы В и С, аминокислотами, органическими и жирными кислотами. Из минеральных элементов, которые в избытке содержатся в клубнях топинамбура, в первую очередь надо отметить железо, марганец, калий, кальций и цинк. Топинамбур также активно извлекает из почвы кремний, натрий и медь, участвующие в обменных процессах нашего организма [74]. Если железа в организме недостаточно, то это может привести к анемии, а дефицит марганца приводит к грубому нарушению структуры клеток и вследствие этого – к негативным

изменениям энергетического обмена [75 - 79]. Цинк входит в состав более 200 ферментов, а кремний значительно влияет на формирование соединительной ткани. Медь также чрезвычайно необходима клеткам – при её дефиците повышается уровень холестерина в крови, что может привести к нарушениям обменных процессов в организме[80].

По литературным данным [81], одной из важных особенностей топинамбура является сбалансированность его по микро- и макроэлементному составу. Он содержит железо (до 12 мг), кремний (до 8 мг), цинк (до 500 мг), магний (до 30 мг), калий (до 200 мг), марганец (до 45 мг), фосфор (до 300 мг), кальций (до 40 мг). Необходимо отметить, что дефицит этих элементов значительно снижает функциональную активность иммунной, эндокринной, нервной систем организма, ухудшает показатели крови и, следовательно, может привести к патологии в любом органе любой системы.

На другом сайте[82]в результате анализа минеральных элементов в составе топинамбура приведены следующие данные: железо – 0,4 мг; калий – 200 мг; кальций – 20 мг; магний – 12 мг; натрий – 3,0 мг; сера – 15,0 мг; фосфор – 78,0 мг и хлор – 47,0 мг.

Одним из положительных качеств топинамбура является способность к экологической самозащите: клубни топинамбура практически не накапливают в себе нитраты, способные вызывать мутацию клеток и, следовательно, развитие онкологических процессов, и, напротив, за счёт своего уникального химического состава превращают нитраты в безопасные соединения и используют их для синтеза необходимых аминокислот. Топинамбур не накапливает тяжёлые металлы (даже на участках с искусственно повышенным в 10 – 15 раз содержанием свинца, кобальта, никеля); и радиоактивные элементы. При искусственном заражении опытных делянок изотопами стронция и цезия выше фонового содержания в 10 – 20 раз, содержание этих элементов в клубнях увеличилось в 0,1 – 0,3 раза[81 – 83].

Выше приведённые данные свидетельствуют о том, что у топинамбура отсутствуют токсичное и аллергизирующее действия. Доброкачественность продуктов на основе топинамбура практически не зависит от состояния окружающей среды[84].

Интересная особенность топинамбура состоит в том, что в нём нет крахмала, а содержится инулин и другие полисахариды, дающие при гидролизе фруктозу[85 – 87].

Полисахарид инулин имеет молекулярную массу порядка 5000 – 6000 и при гидролизе образует фруктозу. Он представляет собой кристаллический порошок легко растворимый в горячей воде. Инулин в организме человека расщепляется до фруктозы, которая столь необходима для людей страдающих диабетом. Он также полезен при лечении ожирений, так как повышает всасывание кальция кишечником, тем самым, снижая риск остеопороза и атеросклеротических изменений, оказывает нормализующее влияние на метаболизм липидов. Обладает способностью снижать содержание в крови сахара, холестерина, липопротеидов, нормализовать жировой и углеводный обмен[88]. В работе С.С. Шаин указано на снижение на 30 – 40 % количества холестерина в крови при применении топинамбура [89]. Инулин можно отнести к веществам, обладающим, так называемым, пребиотическим эффектом. Пребиотики, являясь балластными неусвояемыми продуктами, оказывают позитивный оздоравливающий эффект на человека, стимулируют рост активности полезных бактерий в кишечнике, что в свою очередь приводит к угнетению патогенной микрофлоры[89].

В клубнях топинамбура содержится до 14 – 20 % инулина. Инулин применяется как основной компонент для производства фруктозного сахара и многих диетических продуктов. Инулин, обладающий многогранными лечебно – профилактическими свойствами, оценивается на мировом рынке в 6 – 8 долларов за грамм [90].

И.И. Самокиш и другие описали способ получения лечебно – профилактического инулин – пектинового концентрата в порошке для больных сахарным диабетом [91]. При этом установлено, что инулин оказывает благотворное влияние на организм человека в течение всего времени нахождения в нём. В желудочно – кишечном тракте, инулин расщепляется соляной кислотой и ферментами на молекулы фруктозы и фруктозные цепочки, которые проникают в кровеносное русло. Оставшаяся нерасщеплённая часть инулина быстро выводится, связав собой большое количество ненужных организму токсических веществ, таких как тяжёлые металлы, радионуклиды, холестерин, жирные кислоты, различные химические соединения, попавшие в организм с пищей или образовавшиеся в процессе жизнедеятельности болезнетворных микробов, живущих в кишечнике.

Наряду с этим, инулин значительно стимулирует сократительную способность кишечной стенки, что заметно ускоряет очищение организма от шлаков. В крови антитоксическую, очищающую функцию выполняют осколки фруктозных цепочек, всосавшиеся в кишечнике. Следует отметить, что природная фруктоза, из которой состоит инулин, является уникальным сахаром, который способен участвовать в тех же обменных процессах, что и глюкоза и полноценно замещать её в ситуациях, когда глюкоза клетками не усваивается. Именно поэтому диетическая и лечебная ценность инулина очень велика [91 - 92].

Для производства различных продуктов топинамбур является важным и перспективным видом сырья Узбекистана. Запасы этой культуры в республике достаточно велики, и с каждым годом его плантации расширяются. Он издавна применяется как в народной медицине, а также в качестве корма для животных и птиц. В последнее время на основе топинамбура производятся и широко применяются разнообразные биологически активные добавки. Их ценность и популярность среди населения неоспоримы.

1.2. Производство этанола из традиционного и нетрадиционного сырья.

Традиционным сырьём спиртового производства является крахмалосодержащее - зерно, картофель и сахаросодержащее сырьё - меласса. В производстве спирта основную часть **крахмалосодержащего сырья** представляют зерновые ресурсы. Связано это с преимуществами экономических показателей при использовании зерновых ресурсов в качестве сырья спиртового производства. В среднем из 1 т. зерна получается 33,6 дал спирта, тогда как из мелассы 30,1 дал, а из картофеля всего лишь 8 дал. [20, 21].

В настоящее время к основному крахмалосодержащему сырью относятся различные виды зерна. При этом к зерновым ресурсам, используемым в производстве, предъявляют определённые требования. Прежде всего, это касается экологической чистоты, а также содержания углеводов. В принципе спирт может быть получен из зерна любых культур, но предпочтение отдаётся голозерным (пшеница, рожь, кукуруза), так как по сравнению с пленчатыми (овёс, ячмень, просо) их переработка менее трудоёмка, а следовательно, более выгодна [22]. Строение, химический состав и соотношение анатомических частей зерна исследовались на протяжении многих десятков лет как отечественными, так и зарубежными учёными, поэтому хорошо изучены [20, 23, 24, 25].

Установлено, что зерна хлебных злаков имеют одинаковое строение и состоят из зародыша, эндосперма и оболочек (плодовой и семенной). Зерно ячменя содержит, кроме того, цветочные плёнки, поэтому его относят к плёнчатым культурам, а рожь и пшеницу – к голозёрным.

Для спиртового производства наибольшую ценность представляет эндосперм, в котором сосредоточена основная масса крахмала зерна [26, 27] и на долю которого приходится 70 – 80 % от массы зерновки. Большая часть тканей эндосперма построена из тонкостенных клеток, и в связи с этим содержание клетчатки, гемицеллюлоз и зольных элементов в них минимально. Вместе с тем, такие анатомические части зерна как оболочки и зародыш, напротив, характеризуются повышенным содержанием некрахмальных полисахаридов, липидов и белков. Эти соединения в классической технологии спирта являются балластными веществами, т.к. не повышают его выход из 1 ед. сырья, а напротив, могут снизить данный показатель или ухудшить качественные параметры этанола [28 - 31].

К некрахмальным полисахаридам относятся слизи. Большинство исследователей [252, 283] считает, что эти вещества представлены водорастворимыми гетерополисахаридами, состоящими из гексоз и пентоз. Слизы способны набухать в воде и давать вязкие растворы. При гидратации их объём увеличивается на 800 %. Установлено, что наличие в ржаных слизях разветвлённой арабаноксиановой фракции способствует образованию стойких комплексов слизей с белковыми веществами [24 -32].

Высокое содержание слизистых веществ во ржи и ячмене (почти в два раза больше, чем в пшенице), а также их способность к образованию нерастворимых комплексов с белковыми веществами, создают незначительные трудности при переработке данных культур в спиртовом производстве [33 - 36].

Кроме того, технологическую сложность при переработке зерна ржи создают гемицеллюлозы, которые по своему физиологическому значению занимают место между запасными углеводами и опорной тканью [36, 37]. Большая часть их остаётся нетронутой при классической переработке и лишь около 25 % может быть

прогидролизирована под действием цитолитических ферментов с образованием растворимых в воде веществ, повышающих вязкость растворов [38 - 40]. Содержание клетчатки и гемицеллюлоз в зерне ржи непостоянно и колеблется в широких пределах. Так содержание гемицеллюлоз составляет 7,5 – 11,0 %, клетчатки 1,6 – 2,7 % (на сухое вещество) [41, 42]. При чём, было установлено, что гемицеллюлозы ржи на 58 – 74 % состоят из пентозанов [43].

Особая роль в спиртовом производстве отводится белкам, так как продукты гидролиза белков – аминокислоты необходимы для обеспечения дрожжей азотистым питанием. Белки неравномерно распределяются между морфологическими частями зерна. Основное их количество (65 – 75 %) приходится на эндосперм, меньшее – на алейроновый слой (до 15,5 %) и зародыш (до 22 %). Распределение белка по частям зерновки зависит от вида культуры, её сорта и почвенно – климатических условий выращивания.

Белки зародышами алейронового слоя представлены в основном альбуминами и глобулинами, выполняющими каталитическую функцию при прорастании зерна, а белки эндосперма – альбуминами, глобулинами, проламинами и глютелинами. Большую часть белков эндосперма злаковых культур (до 80 %) составляют запасные белки: спирторастворимые проламины и щелочерастворимые глютелины. Альбумины и глобулины входят в состав мембран органелл зерна, образуют рибосомы, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, являются составной частью сложных белков – нуклеопротеидов, липопротеидов, фосфопротеидов [43, 44].

Необходимо отметить, что при осахаривании, несмотря на неблагоприятные условия для действия пептидаз содержание аминного азота в сусле увеличивается в 2,5 – 3 раза (20 % от всего растворимого азота сусла). Таким образом, большая часть белковых веществ зерна не используется в основном процессе биоконверсии

сырья в этанол, а выводится из технологии в составе отхода производства – послеспиртовой барды.

Следовательно, все вышеперечисленные сведения о химическом и о биохимическом составе зерна, распределение отдельных соединений по анатомическим частям зерновки необходимо учитывать при совершенствовании старых и разработке новых ресурсосберегающих технологий этанола из пшеницы в направлении более рационального использования основных компонентов зерна.

Известно, что при выработке этанола 60 – 75 % затрат приходится на сырьё, поэтому однопродуктовые схемы переработки зерна на этиловый спирт существенного экономического эффекта не дают. Таким образом, наиболее перспективными, с точки зрения повышения рентабельности производства являются многопродуктовые схемы, которые позволяют выработать одновременно несколько конечных продуктов.

Не содержащим крахмала традиционным сырьём для получения этанола являются свекла, меласса свекольная и из сахара – сырца, древесина, а также фрукты [45]. Сбраживание осуществляется преимущественно спиртовыми дрожжами в реакторах с мешалками. При переработке мелассы следует учитывать сравнительно высокое содержание в ней микробов, которое может достигать 10⁷ клеток на 1 г.

Нетрадиционное сырьё спиртового производства. В качестве альтернативного сырья для производства спирта можно рассматривать любой материал, содержащий сахара или полисахариды, которые в результате гидролиза превращаются в сбраживаемые вещества [15]. Этим требованиям удовлетворяют как растительные материалы, так и некоторые виды сахаросодержащих вторичных продуктов производств.

Например, в институте растениеводства и селекции растений университета почвоведения в Вене проводились работы, изучающие

возможность применения сахарного сорго для спиртового производства. Данный вид сырья наряду с сахарной свеклой, цикорием, картофелем, кукурузой, пшеницей и ячменем является наиболее подходящей культурой для получения пригодной для производства спирта биомассы. Из 1 т биомассы сорго получают 80 л спирта против 100 л/т у сахарной свеклы, 120 л/т – цикория, 115 л/т – картофеля, 400 л/т – кукурузы, 380 л/т – пшеницы и 350 л/т – ячменя. Кроме того, после выработки спирта остаются отходы, которые с успехом используются в качестве топлива [46].

Кроме того, в настоящее время активно ведутся разработки по получению спирта из такой культуры как амарант. В ходе проведённых исследований была разработана новая технология получения пищевого спирта, защищённая патентом Республики Армения. В качестве сырья использовался метельчатый зерновой амарант содержание крахмала в зёрнах которого составляло 55 – 60 %. Была подтверждена возможность получения пищевого спирта крепостью 60 % об. из данного вида сырья. Кроме того, была описана технологическая схема безотходной переработки амаранта: зерно – для получения спирта, а надземная часть растения – в виде вкусовых микродобавок при изготовлении ликёроводочной, слабоалкогольной и безалкогольной продукции [47, 48].

Ещё одним видом нетрадиционных сырья в производстве спирта является тритикале – зерновая культура, полученная путём селекции из ржи и пшеницы. Исследования показывают, что зерно тритикале обладает лучшими по сравнению с пшеницей физико – химическими показателями для использования в бродильных производствах. Так работы, проведённые в Воронежской государственной технологической академии, показали, что выход спирта из тритикале определённых сортов на 1,66 – 1,90 дал выше, чем из ржи и на 0,33 – 0,57 дал больше, чем из пшеницы с каждой тонны условного крахмала.

Производственные испытания также подтвердили перспективность и эффективность выработки этанола из тритикале с целью повышения выхода спирта и экономии сырьевых и энергетических ресурсов [49 – 53].

В качестве альтернативного сырья для производства спирта в Дагестанском государственном техническом университете были предложены плоды тутового дерева. В работах [54, 55] приведены результаты комплексного исследования тутового дерева как сырья для перерабатывающей промышленности. Отмечено, что применение ягод тутовника при производстве спирта значительно упрощает технологический процесс, вследствие чего была разработана и запатентована схема получения этанола из данного вида сырья.

Помимо растительных материалов для производства спирта может быть использовано и сырьё животного происхождения. Среди потенциальных видов такого сырья для производства этилового спирта за последние годы в США, Германии, Польше, Ирландии и других странах особое внимание уделяют молочной сыворотке – побочному продукту переработки молока в творог, сыр казеин и ряд молочно – белковых изделий. Ресурсы этого сырья исчисляются десятками миллионов тонн, а степень его использования в перерабатывающей промышленности и сельском хозяйстве ничтожно мала.

В ряде работ описана технологическая схема получения этилового спирта из подсырной, творожной, казеиновой сыворотки и их концентратов, а также из мелассы, вырабатываемой в производстве молочного сахара. Проведена селекция и подбор дрожжей, обладающих способностью сбраживать лактозу с образованием спирта. На примере практических экспериментов доказана экономическая оправданность использования молочной сыворотки для получения этилового спирта [56 – 64].

В заключении нужно отметить, что реализация вышеперечисленных проектов имеет важное народно – хозяйственное значение, так как позволит расширить производственную базу для производства этанола, обеспечит экономию ценных зерновых культур для производства пищевых продуктов, а также снизит себестоимость продуктов за счёт применения более дешёвого сырья. Среди показателей экономической эффективности предлагаемых проектов следует отметить комплексность используемых ресурсов и улучшение экологической обстановки.

Известно, что для производства спирта можно использовать такой нетрадиционный вид сырья как инулинсодержащее, в частности топинамбур. Установлено, что данный корнеплод весьма перспективен для переработки в этанол.

1.3. Получение биоэтанола из топинамбура и комплексная переработка топинамбура.

В последние годы возрос интерес к производству биоэтанола во многих развитых странах мира. Для решения топливно – энергетических и экологических проблем необходимы высокоэффективные методы переработки и утилизации растительного сырья. С этой точки зрения топинамбур давно доказал свою экономическую состоятельность. Предложены схемы получения и показаны возможности применения топинамбура, как сырья для биоэтанола [93 - 101].

В Сибирском ГТУ и Институте биофизики СО РАН доказана целесообразность использования вегетативной надземной части топинамбура для производства этанола и кормового белка. Установлено, что вегетативная масса топинамбура является перспективным сырьём для получения этанола в условиях Сибири.

Утилизация барды позволяет использовать её в качестве питательной среды для выращивания кормовых дрожжей, так как барда содержит достаточное количество веществ сахарной природы для их роста и размножения [102].

Необходимо отметить, что для максимального использования сырья необходимо производить **комплексную переработку топинамбура.**

Практический интерес представляет технология комплексной переработки топинамбура, разработанная коллективом авторов под руководством академика В.Н. Голубева при которой основными конечными продуктами являются пектин и инулин [103].

В ряде работ была рассмотрена возможность получения из клубней высокофруктозных сиропов и гидролизата мезги топинамбура, используемого в дальнейшем в хлебопекарной промышленности, получение кормового углеводно – белкового продукта из жома [104 – 108].

В Пятигорском государственном технологическом университете была разработана технология, по которой из клубней вырабатывалось три вида полуфабрикатов высокой степени готовности: полуфабрикат «пюре из топинамбура», полуфабрикат «топинамбур сырой очищенный» и порошок [109].

В Вятском государственном техническом университете была рассмотрена схема переработки топинамбура, в которой из клубней получали спирт, а из зелёной массы можно вырабатывать кормовой белковый продукт. Помимо этого она представляет интерес с точки зрения корма для скота, источника органических удобрений, сырья для бумажной промышленности (целлюлоза) и производства биогаза.

Образующаяся послеспиртовая барда и эфиральдегидный остаток после ректификации могут быть использованы для создания питательных сред при биоконверсии растительного субстрата [110]. В

заклучении необходимо отметить, что как клубни, так и зелёная масса топинамбура могут быть целиком переработаны в ходе технологических процессов.

Получение этилового спирта из топинамбура. Широкий интерес к производству спирта из топинамбура объясняется тем, что его клубни являются хорошим источником сбраживаемых сахаров.

В работах отечественных и зарубежных специалистов показана перспективность использования топинамбура для производства этанола, который является одним из самых дешёвых видов сырья для спиртовой промышленности. Выход спирта из данного нетрадиционного для отрасли вида сырья в 1,5 – 3,5 раза выше, чем при переработке картофеля и пшеницы при пересчёте на 1 га [5].

В промышленных масштабах этот процесс в разные годы применялся во Франции, Германии, Польше, США и Японии. В нашей стране первые производственные опыты по использованию клубней топинамбура на выработку спирта были произведены в 2013 г.

В процессе производства спирта из топинамбура основными являются четыре стадии:

– **подготовка сырья**, которая предусматривает приготовление из клубней **топинамбура сока**, протёртой **массы** или пюре и извлечение **Сахаров** из **исходного** материала. Это извлечение осуществляется через **клеточные стенки**;

– предварительная обработка углеводов, сущность которой заключается в осахаривании диффузного сока (перевод инулина во фруктозу), предварительную обработку углеводов осуществляют ферментативным, кислотным [111 – 113] или термическим гидролизом (под высоким давлением). Ряд работ посвящён вопросам, связанным с механической деструкцией фруктозанов топинамбура. Так, с целью интенсификации процесса гидролиза инулина и повышения выхода

редуцирующих сахаров, по мнению одних авторов [114], целесообразно проводить глубокое измельчение клубней. В другой работе [115] грубоизмельченные клубни топинамбура рекомендуют дополнительно размалывать на лабораторном дезинтеграторе ДУ – 16.

Кроме того, может быть применён комбинированный способ гидролиза, сочетающий элементы, например, термического и ферментативного гидролиза:

- получение этанола вследствие сбраживания дрожжами осахаренного сока в этиловый спирт. Эффективность образования этанола из подготовленного и обработанного должным образом сырья зависит от продуктивности штаммов дрожжей и их толерантности к этанолу, рН, температуры, добавок питательных веществ и оптимальной концентрации сахара.

- выделение этанола из бражки. Концентрирование и очистка спирта является дорогостоящей стадией в промышленном производстве этанола, так как дистилляция требует больших затрат энергии. На этой стадии происходит удаление побочных продуктов, таких как альдегиды и сивушные масла. В целом спирт из топинамбура отличается высоким качеством [15].

В университете Carlton (Оттава, Канада) для получения этанола из гидролизата клубней топинамбура использовали оригинальную систему с иммобилизованными клетками дрожжей [116]. Была достигнута максимальная производительность в 20 г этанола на 1 л ферментационной среды в час, и эта продуктивность оставалась постоянной в течение 60 дней.

В национальной лаборатории промышленных технологий Португалии сравнивали спиртоустойчивость дрожжей *Kluveromyces fragilis* (ингибирование роста и потеря жизнеспособности при 28 °С) с использованием простой среды, содержащей 2 % сахарозы, и сока топинамбура, разбавленного до аналогичной концентрации сахара.

Ферментация сока топинамбура давала 13 % этанола, в то время как выход этанола на простой среде не превышала 7 об. % [117].

Таким образом, можно сказать, что топинамбур является перспективной культурой с точки зрения переработки его в спиртовом производстве. Однако стоит учесть ряд требований – для повышения рентабельности производства при использовании топинамбура на спиртовых заводах, необходимо использовать дифференцированный способ переработки инулинсодержащего сырья, позволяющий вырабатывать кроме этанола другие конечные продукты, такие как пектиновые вещества, которые являются не только балластными, но и вредными составляющими сырья – потенциальными источниками образования метанола. Кроме того, при переработке осветлённого суслу из топинамбура появляется возможность выделить остаточные дрожжи, с целью использования их в дальнейшем для получения белковых препаратов. Разработки в этом направлении несомненно являются весьма перспективными.

1.4. Характеристика основных групп дрожжей спиртового производства.

Критерии классификации. В спиртовом производстве, как и в другой отрасли бродильных производств, основной единицей в классификации является раса (штамм), представленная чистой культурой выделенной дрожжевой клетки в пределах одного и того же вида. Расы объединяются в виды (species), виды – в роды (genus, genera), а роды – в семейства [118 – 120]. Для точного определения вида дрожжей приходится проделать ряд сложных и длительных операций, в значительной степени имеющих глубокий исследовательский характер, направленных к накоплению возможно большего числа диагностических, распознавательных признаков.

Существует две группы диагностических признаков: морфологические и культуральные. В состав культуральных входят и физиологические признаки (форма колоний в определённых питательных средах, биохимические процессы, отношение к температуре и другим условиям среды). Следует отметить, что диагностические признаки могут быть надёжными лишь в том случае, если они получены при изучении заведомо чистой культуры.

Дрожжи и дрожжеподобные организмы относятся к двум большим группам – спорообразующие дрожжи, объединяемые в один класс сумчатых грибов (Fungi), и неспорообразующие дрожжи, которые объединяются в группы несовершенных грибов (Fungi imperfecti).

Класс сумчатых грибов – Fungi (грибы, образующие аскоспоры).

Порядок одноклеточные грибы – дрожжи – Unicellomycetales .

Семейство Saccharomycetaceae, включает 17 родов, из которых производственное значение имеют 3: Saccharomyces, Pichia, Hansenula.

Род Saccharomyces Meyen. К этому роду, наиболее обширному и хорошо известному, принадлежит большинство дрожжей, имеющих значение в бродильной промышленности.

Клетки дрожжей рода Saccharomyces различной формы, чаще округлой, овальной или эллиптической, размножение вегетативное почкованием. Споры по 1 – 4 в аске, очень редко до 8. Вегетативное поколение дрожжей этого рода в обычных для них условиях развития всегда диплоидно. Старые культуры в жидкой среде дают кольцо и рост на поверхности с образованием ложного мицелия. Хорошо сбраживают сахара (не более 30 %) с образованием этанола до 18 % об. Соли азотной кислоты не усваивают.

Мейен в 1838 г. впервые объединил пивные, винные и сидровые дрожжи в один род Saccharomyces, дав им одновременно и видовые обозначения. В классификации принято при описании родов и видов помещать имя автора, давшего им название.

Внутри рода *Saccharomyces* по систематике В.И. Кудрявцева насчитывается 18 видов. Виды, относящиеся к этому роду, не различаются по морфологии, но хорошо различаются по отношению к углеводам (см. табл. 1). Ниже описаны 7 основных видов дрожжей рода *Saccharomyces*, встречающихся при переработке плодово – ягодного сырья и имеющих производственное значение.

1. *Saccharomyces vini* Meyen (по Лоддер – *Saccharomyces Cerevisiae* Hansen) наиболее распространённый вид дрожжей при сбраживании соков плодов и ягод (рис.1). Общепринятым и распространённым наименованием этих дрожжей долгое время было *Saccharomyces ellipsoideus*.

Среди всех дрожжей рода *Saccharomyces*, развивающихся при брожении соков, *Saccharomyces vini* составляют 80 %. Возможными источниками углеродистого питания всех видов дрожжей этого рода являются сахара, спирты, кислоты.

Для *Saccharomyces vini* всегда наиболее эффективны следующие ростовые вещества: пантотеновая кислота, биотин, мезоинозит. Определённое влияние оказывают тиамин и пиридоксин.

Расы дрожжей вида *Saccharomyces vini* обладают индивидуальными особенностями по спиртообразующей способности, по биосинтезу летучих компонентов и других продуктов.

2. *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (по Лоддер – *Saccharomyces cerevisiae* Hansen) – дрожжи, применяемые в других отраслях бродильной промышленности: при производстве спирта, в хлебопекарной промышленности, в пивоварении (рис.2).

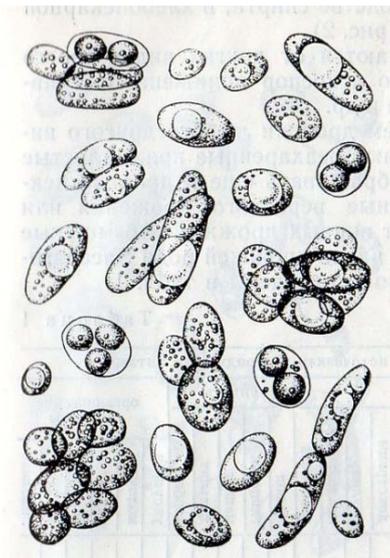


Рис. 1. *Saccharomyces vini* (x2000).

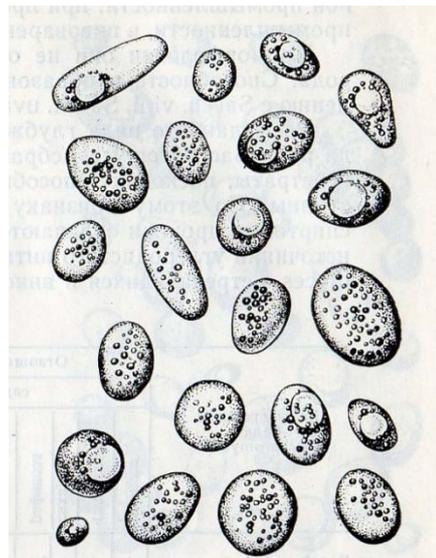


Рис. 2. *Saccharomyces cerevisiae* (раса XII) (x2000).

По морфологии они не отличаются от других видов своего рода. Способность к образованию аскоспор понижена по сравнению с *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces Uvarum* и др.

Расы данного вида глубже, чем дрожжи любого другого вида рода *Saccharomyces*, сбраживают сахаренные крахмалистые субстраты, поскольку способны сбраживать ещё и простые декстрины. По этому признаку пивные верхового брожения или спиртовые дрожжи отличаются от винных дрожжей. Возможные источники углеродистого питания видов дрожжей рода *Saccharomyces*, встречающихся в виноделии, приведены в табл. 1.

Таблица 1.

Виды дрожжей рода <i>Saccharomyces</i>	Отношение к источникам углеродистого питания													
	сахара							спирты				Органические кислоты		
	г	л	к	к	р	и	т	б	р	л	н		е	ь

4. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (по Лоддер – *Saccharomyces uvarum* Beijerinck) – на дрожжах этого вида (рис. 4) ведётся производство пива. *Saccharomyces carlsbergensis* не отличается от других видов того же рода.

По степени сбраживания сусле *Saccharomyces carlsbergensis* не отличается от *Saccharomyces cerevisiae*, однако приспособление этого вида дрожжей к развитию при низкой температуре (5 – 10 ° C) по сравнению с *Saccharomyces cerevisiae* дало основание В.И. Кудрявцеву выделить их в самостоятельный вид.

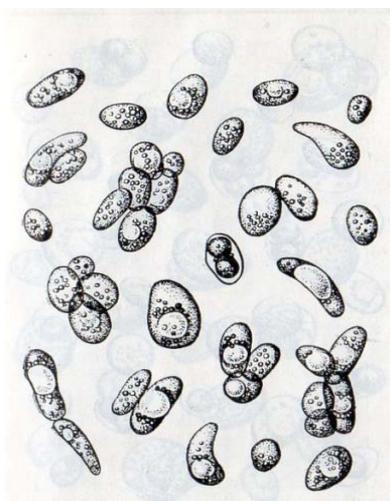


Рис. 3. *Saccharomyces uvarum* (x2000).

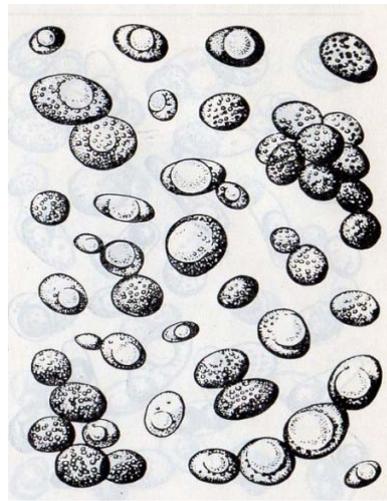


Рис. 4. *Saccharomyces carlsbergensis* (x2000).

5. *Saccharomyces chevalieri* Guilliermond (по Лоддер – *Saccharomyces Chevalieri* Guilliermond) – выделены из самозабродившего виноградного сока.

В чистых культурах *Saccharomyces chevalieri* (рис. 5) хорошо развиваются в виноградном соке и образуют в нём до 16 % об. спирта.

6. *Saccharomyces oviformis* Osterwalder (по Лоддер – *Saccharomyces Bayanus* Saccardo) – выделены из самозабродившего виноградного сока. В чистых культурах *Saccharomyces oviformis* (рис. 6) хорошо развиваются в виноградном соке, сбраживая почти полностью содержащиеся в нём сахара, образуя около 18

% об.спирта. Потребности в факторах роста у них такие же, как и у *Saccharomycesvini*.

Saccharomycesoviformis var. *cheresiensis* (рис. 7) – вызывают энергичное брожение сахаров с образованием до 17,6 % об. спирта.

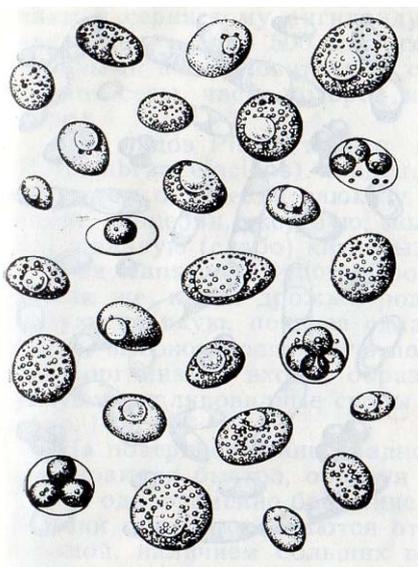


Рис.5. *Saccharomyceschevalieri*(x2000).

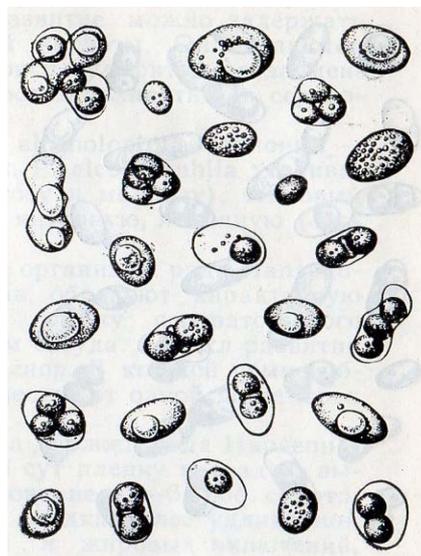


Рис.6. *Saccharomycesoviformis*(x2000).

7. *Saccharomyces chodati*Steiner (поЛоддер – *Saccharomycesitalicus*Castelli) – культура (рис. 8) выделена из спонтанно сброженного виноградного сока в Швейцарии. Не сбраживают сахарозу, однако некоторые штаммы легко приспосабливаются и используют её, хотя медленнее, чем глюкозу.

Морфология клеток дрожжей. Форма и размеры. Клетки дрожжей имеют разнообразную форму: круглую, овальную или эллиптическую, лимонообразную, цилиндрическую, иногда сильно вытянутую в виде гифов.

По сравнению с другими микроорганизмами дрожжи являются довольно крупными формами. Диаметр клеток дрожжей достигает 1 – 8 мкм, длина – 1 – 10 мкм. При таких размерах клеток поверхность

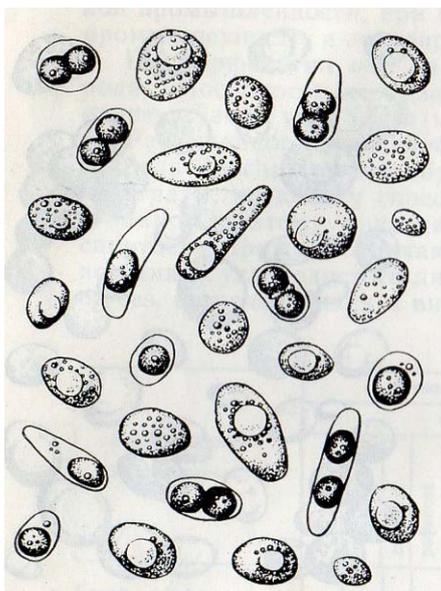


Рис.7. *Saccharomyces oviformis* var. *cheresiensis* (x2000).

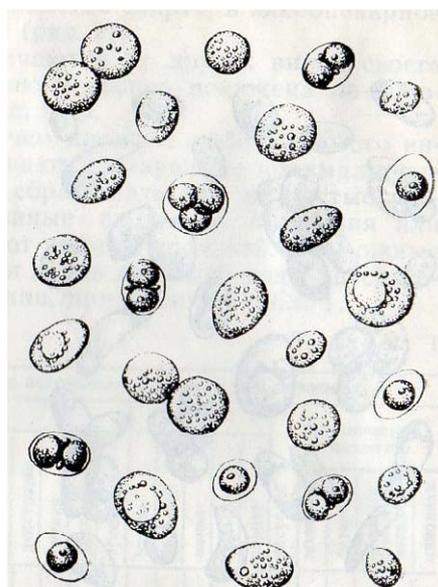


Рис. 8. *Saccharomyces chodatii* (x2000).

их в 1 л сброживаемого виноградного сока может достигать 10 м^2 . Именно такая большая поверхность клеток дрожжей определяет интенсивность их метаболизма и процесса обмена веществ с окружающей средой. Масса дрожжевых клеток, равнозначная по массе животному (500 кг), за сутки синтезирует более 50 т белка, а животное – всего около 0,5 кг.

Морфологически неизменные формы клеток дрожжей наблюдаются только у молодых культур на стандартной питательной среде.

Структура. Клетка дрожжей имеет сложное строение и состав. Размеры отдельных элементов её находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Значительные успехи, достигнутые в настоящее время в расшифровке структур клетки дрожжей и их функций, основаны на новых методах исследования – электронной микроскопии и комплексной цитологии.

Дрожжевая клетка является одноклеточным микроскопическим организмом и имеет в основном то же строение, что и клетки животных и растений (рис. 16,17). Внутри клетки содержатся компоненты, которые обычно подразделяются на органеллы и включения. К органеллам относятся клеточная оболочка, цитоплазматическая мембрана, цитоплазма,

митохондрии, вакуоли, аппарат Гольджи, ядро. Включения – это временные образования клетки (гликоген, трегалоза, жир, метахроматин и др.), которые появляются и исчезают в процессе обмена веществ.

Клеточная оболочка – плотная, тонкая и эластичная, окружает цитоплазму и придаёт характерную форму клетке дрожжей, защищает её от вредных факторов среды, несёт электрический заряд. Оболочка поддерживает внутриклеточное осмотическое давление, регулируя поступление в клетку через пору солей и других низкомолекулярных соединений.

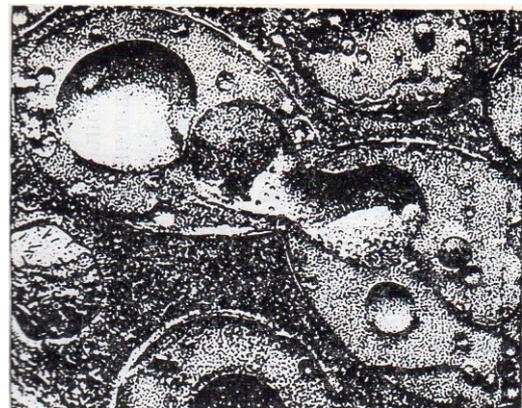
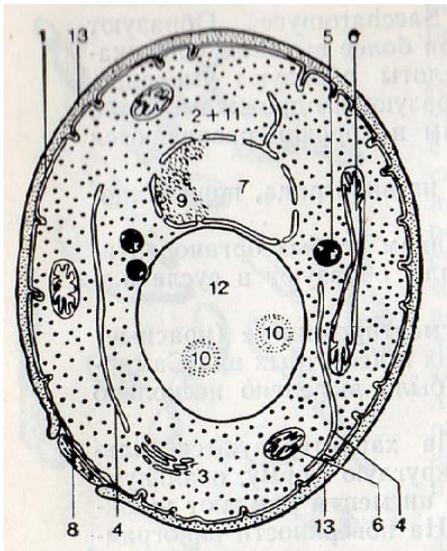


Рис.9. Схема строения дрожжевой клетки: 1–цитоплазматическая мембрана; 2–цитоплазма; 3–аппарат Гольджи; 4–эндоплазматическая сеть; 5–жировые капельки; 6–митохондрия; 7–ядро; 8–рубец, где опочковалась клетка; 9–ядрышко; 10–гранулы метахроматина (волютина); 11–рибосомы; 12–вакуоль; 13–клеточная оболочка.

Рис.10. Электронная микрофотография клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Видны клеточная оболочка и цитоплазматическая мембрана, эндоплазматическая сеть, ядро, включения.

В химический состав клеточной оболочки входят белково – полисахаридные комплексы, фосфаты и липиды. У *Saccharomyces cerevisiae* полисахаридная часть комплекса состоит примерно из равных количеств глюкозана и маннана, сумма которых составляет около 90 % от сухой массы оболочки; остальное количество её приходится на долю белка, липидов, глюкозамина.

Размножение дрожжей. Наиболее характерным и широко распространённым у дрожжей вегетативным способом размножения является почкование, лишь немногие дрожжи размножаются делением. При почковании на клетке появляется бугорок (иногда их несколько), который постепенно увеличивается в размерах. Этот бугорок называют почкой. Почкованию предшествует разделение ядра на две части, и одно вместе с частью цитоплазмы и другими клеточными элементами переходит в формирующуюся молодую клетку. По мере роста почки в месте соединения её с материнской клеткой образуется перетяжка, отграничивающая молодую дочернюю клетку, которая затем отшнуровывается (отделяется от материнской клетки [119]).

Почкующиеся клетки обычно образуют не одну, а несколько почек. Вместе с этим может начаться почкование и молодых клеток. Так постепенно образуются скопления из многих объединённых между собой клеток, называемые сростками почкования.

Кроме почкования, многие дрожжи размножаются с помощью спор. Спорообразование у дрожжей может происходить бесполом и половым путями. При бесполом образовании спор ядро клетки делится на столько частей, сколько образуется спор у данного вида дрожжей, после чего в клетке (как в сумке) образуются аскоспоры. При половом образовании спор предшествует слияние (копуляция) клеток.

В Узбекистане и во многих других странах при производстве спирта, вина, пива, кваса применяют дрожжи относящиеся к роду *Saccharomyces*.

Однако, в последние годы для получения спирта из клубней топинамбура стали применять дрожжи рода *Kluuveromyces*.

По мнению французских учёных [18, 19] при переработке клубней топинамбура, не подвергнутых предварительному гидролизу, не целесообразно использовать дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae* т.к. они не обладают инулиназной активностью.

Перспективно применение в данном случае дрожжей вида *Kluuveromyces*. Проведены исследования по сбраживанию суслу из клубней топинамбура дрожжами *K1. marxianus*, *K1. fragilis* другими.

Французскими учёными исследованы параметры спиртового брожения инулина на полусинтетических питательных средах с применением 14 видов дрожжей, обладающих способностью сбраживать инулин без предварительного его гидролиза.

Кроме дрожжей для получения этилового спирта из топинамбура предлагают использовать и другие микроорганизмы, в частности, бактерии. Так, во Франции разработан способ непрерывного получения этанола из сока топинамбура с использованием бактерий *Zygomonas mobilis*. Предварительно проводят одновременную экстракцию и полный гидролиз инулина клубней топинамбура путём инкубации в течение 18 часов при температуре 60 ° С и рН – 5,0 в присутствии инулиназы (60 ед/см).

Учёные США [17] исследовали периодическую и непрерывную твёрдофазную ферментацию клубней. В работе были использованы 2 штамма *K1. marxianus*. Сбраживание проводили при рН 2,0 – 6,3 в течение 48 – 64 часов. Авторы отмечают, что выход этанола составлял 41 – 63 % от теоретического.

Также исследовано влияние температуры сбраживания и рН среды на эффективность процесса. Установлено, что оптимальной для всех исследованных дрожжей оказалась температура 35 ° С. Выход спирта при рН 3,5 по сравнению с рН 6,0 оказался выше.

Кроме того, установлена устойчивость дрожжей *Kl. marxianus* к этанолу в зависимости от состава среды, температуры и pH. Большая устойчивость данных дрожжей к этанолу наблюдалась при их культивировании на соке топинамбура, по сравнению с культивированием на простой среде с идентичной концентрацией сахарозы.

При получении этанола из топинамбура югославские исследователи оптимизировали процесс при использовании дрожжей *S.cerevisiae* и *Kl. marxianus*[277, 278]. Они показали, что в первом случае необходимо осуществлять кислотный или ферментативный гидролиз субстрата. В работе кислотный гидролиз проводили при pH 2,0 и $t=126^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа при гидромодуле 1:1. Данная обработка, по мнению авторов, оказалась более эффективной, чем ферментативная. В случае использования дрожжей *Kl. marxianus* предобработки не требуется, т.к. штамм обладает инулиназной активностью.

Теми же исследователями подтверждена возможность получения этанола из сока топинамбура с применениями дрожжей *Kl. marxianus*. Периодическое сбраживание инулина топинамбура в данном случае продолжалось в течение 15 часов, максимальный выход спирта от теоретического составлял 93 %.

Однако, нужно отметить, что с точки зрения объекта для хранения топинамбур – сложная культура. В условиях буртового хранения клубни сохраняют качество в течение 2 – 3 месяцев. Поэтому топинамбур можно рассматривать только как дополнительный вид сырья для спиртовых предприятий, а, следовательно, с технологической точки зрения процесс его переработки в этанол, не должен сопровождаться введением в технологию новых стадий, усложнением процесса, использованием новых нетипичных для заводов рас дрожжей.

Выводы по первой главе.

Изучение литературы по данной проблеме позволяют сделать следующие выводы:

- Традиционным сырьём спиртового производства является крахмалосодержащее – зерно и картофель и сахаросодержащее – меласса;
- В качестве альтернативного, нетрадиционного сырья для производства спирта можно рассматривать любой материал, содержащий сахара или полисахариды, которые в результате гидролиза превращаются в сбраживаемые вещества;
- Из клубней топинамбура вырабатывают спирт, фруктозу, дрожжи и более 200 видов продуктов питания и во многих из них топинамбур составляет белковую основу. Одной из важных особенностей топинамбура является сбалансированность его по микро– и макроэлементарному составу;
- Клубни топинамбура не накапливают в себе нитраты, способные вызывать мутацию клеток, не накапливают тяжёлые металлы и

радиоактивные элементы. В топинамбуре нет крахмала, содержится инулин и другие полисахариды, дающие при гидролизе фруктозу;

– Для максимального использования топинамбура необходимо производить его комплексную переработку;

– Топинамбур – перспективное сырьё для производства этанола. Он является одним из самых дешёвых видов сырья для спиртовой промышленности. Выход спирта из этого нетрадиционного для отрасли сырья в 1,5 – 3,5 раза выше, чем при переработке картофеля и пшеницы при пересчёте на 1 га.;

– Во многих странах и в том числе в Узбекистане при производстве спирта применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Однако, в последние годы для получения спирта из клубней топинамбура стали применять дрожжи рода *Kluyveromyces*.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МЕТОДИКА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Объектами исследований являлись различные штаммы спиртовых, винных, пивных, каротинсинтезирующих дрожжей и сок топинамбура.

Методика и методы исследований. В работе использованы общепринятые в микробиологии и технологии спирта методика и методы исследований. Дрожжи культивировали на жидких и твёрдых питательных средах из пивного суслу с содержанием 8 % сухих веществ. У дрожжей изучали физиологическое состояние клеток и морфолого – культуральные признаки в различных стадиях их развития путём микроскопии живых неокрашенных и окрашенных фиксированных препаратов дрожжей.

2.1. Методика и методы приготовления микроскопических препаратов.

Микроскопическому анализу подвергают препараты живых и убитых (фиксированных), окрашенных и неокрашенных микроорганизмов.

Препараты готовят на предметных стёклах толщиной не более 1,2 – 1,4 мм. Поверхность стекла должна быть тщательно очищена и обезжирена

(например, хромовой смесью с последующим ополаскиванием водой, обжиганием поверхности стекла в пламени горелки). Для приготовления препаратов живых микроорганизмов применяют дополнительно покровные стёкла (толщина до 0,17 мм), которыми накрывают препарат. Чистые стёкла хранят в сухом состоянии или в обезжиривающих жидкостях.

Препараты живых клеток. Живые клетки микроорганизмов можно рассматривать под микроскопом в неокрашенных (нативных) препаратах и препаратах, окрашенных прижизненно.

Существуют два основных способа приготовления прижизненных препаратов микроорганизмов: препарат «раздавленная капля» и «висячая капля».

Препарат «Висячая капля». Небольшую каплю суспензии микробных клеток наносят на покровное стекло и осторожно накладывают на него предметное стекло с луночкой так, чтобы капля свободно помещалась в центре углубления. Края луночки предварительно смазывают вазелином, препарат переворачивают и микроскопируют. Метод используется главным образом для изучения подвижности микроорганизмов.

Препарат «Раздавленная капля». На предметное стекло наносят каплю жидкости (при работе с бактериями – водопроводную воду, при работе с микроскопическими грибами – смесь равных объёмов этилового спирта и глицерина), вносят в неё немного исследуемых микроорганизмов, размешивают и накрывают покровным стеклом. Излишек выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Выращенные на плотной среде бактерии переносят в каплю жидкости с помощью бактериологической петли, а микроскопические грибы – двумя препаровальными иглами. Культура, выращенная в жидкой среде, помещается на предметное стекло стерильной пипеткой без предварительного нанесения капли жидкости.

Микроскопируют препарат, как правило, сухой системой (объективы 8^x, 20^x, 40^x). Препарат позволяет установить форму клеток преимущественно крупных микроорганизмов, их размеры, расположение, наличие или отсутствие подвижности.

Отработанные препараты живых микроорганизмов помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором для обезвреживания[121 – 125].

Препараты фиксированных окрашенных клеток. В фиксированных препаратах микроорганизмы зафиксированы, т.е. убиты и прикреплены к предметному стеклу, а затем окрашены.

Для окраски микроорганизмов используют анилиновые красители (основные, кислые и нейтральные). Наибольшее применение имеют основные краски: метиленовый синий, основной фуксин, генцианвиолет и др.; для окраски препаратов готовят спиртовые, водно–спиртовые и водные растворы.

Окраска микроорганизмов – это сложный физико–химический процесс, в механизме которого играют роль явления электроадсорбции, капиллярности, химического сродства между красителем и объектом. Основные красители состоят из окрашивающего катиона и бесцветного аниона. Поскольку бактерии обладают поверхностным отрицательным зарядом и в них содержатся соединения кислой природы (нуклеиновые кислоты), основные красители характеризуются большим сродством к клеткам, чем кислые краски, и поэтому широко используют в микробиологии.

Некоторые красители характеризуются избирательным химическим сродством к отдельным компонентам клетки (ядерному веществу, включениям) и применяются для их выявления. Так, зёрна волютина хорошо красятся хризоидином, мителеновым синим, зёрна гранулёзы и гликогена – раствором йода, зёрна жира – суданом III.

При светлорольной микроскопии фиксированные окрашенные препараты имеют ряд преимуществ перед прижизненными: 1) высокую

контрастность; 2) возможность дифференцированного выявления клеточных структур; 3) безопасность работы; 4) длительность сохранения препарата.

Метод широко применяется при качественных и количественных микробиологических исследованиях.

Приготовление препарата включает этапы: приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску.

Приготовление мазка. На предметное стекло наносят каплю водопроводной воды, вносят в неё небольшое количество исследуемого материала, взятого из плотной среды, бактериологической петлёй и размешивают (в случае роста бактерий на жидкой среде на стекло наносят только каплю микробной суспензии). Микробную взвесь размазывают петлёй на площади 2-3 см² тонким слоем.

Высушивание и фиксация. Мазок высушивают на воздухе или в струе тёплого воздуха над пламенем горелки, держа стекло мазком вверх. Затем охлаждённый мазок фиксируют в пламени горелки: стекло с мазком, обращённым кверху, проводят 3–4 раза через пламя. При этом микробы погибают, мазок прикрепляется к стеклу, окрашиваемость клеток улучшается.

Возможна так же фиксация химическим путём (этиловым, метиловым спиртом, смесью равных объёмов спирта с эфиром и др.).

Окраска препарата. Она, может быть, простой и сложной.

При простых методах окраски используют одну краску. На охлаждённый фиксированный мазок наносят раствор выбранного красителя. Срок окраски анилиновыми красителями 1-3 мин. Затем мазок промывают слабой струёй воды, осторожно промокают фильтровальной бумагой и рассматривают с иммерсией. Применяют метод главным образом для обзорной микроскопии.

Сложные методы окраски заключаются в последовательном окрашивании двумя или несколькими красителями. Эти методы служат

для дифференциации видов микробов по способности к окрашиванию (тинкториальные свойства) или для выявления отдельных клеточных структур.

2.2. Определение размеров микробной клетки.

Измерение величины микроорганизмов проводят под микроскопом, пользуясь *окулярной линейкой* (микрометром). Микрометр представляет собой стеклянную круглую пластинку, в центре которой выгравирована шкала с делениями (50 или 100). Окуляр-микрометр помещают в окуляр делениями вниз, предварительно отвинтив глазную линзу. Линзу завинчивают вновь и окуляр вставляют в монокулярную насадку микроскопа (рис. 11).

Работа начинается с вычисления цены деления окуляра-микрометра при данном увеличении микроскопа. Для этой цели служит дополнительное приспособление – *объект-микрометр* – металлическая пластинка с отверстием в центре (рис.12). В отверстие вставлено стекло со шкалой длиной 1 мм, точно разделённой на 100 частей. Следовательно, одно деление шкалы объективного микрометра соответствует 0,01 мм, или 10 мкм. Объективный микрометр устанавливают на столик микроскопа и фокусируют при увеличении 8х. Изображение линейки перемещают в центр поля зрения и меняют объектив на тот, при котором будет произведено определение размеров микроорганизмов. Устанавливают линейки обоих микрометров параллельно и совмещают их первые черты.

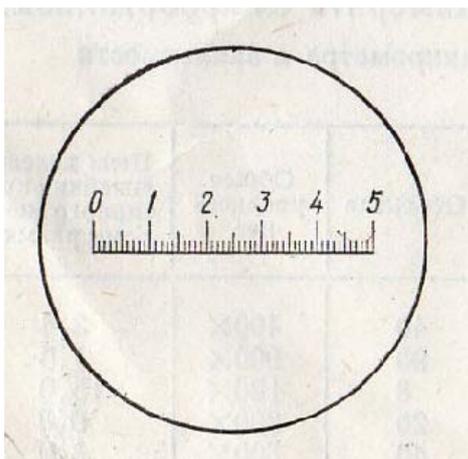


Рис. 11. Окулярный микрометр.

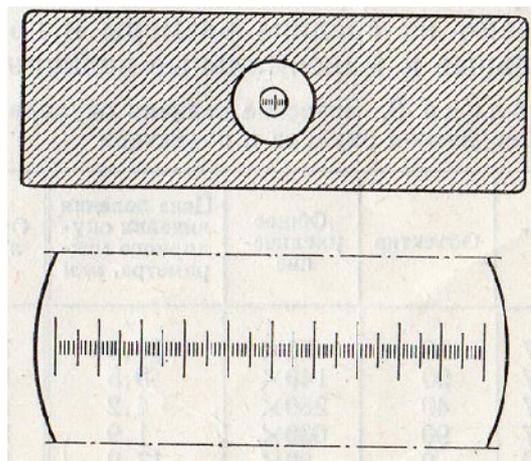


Рис. 12. Объективный микрометр.

По принципу нониуса находят следующее совмещение черт и определяют, сколько делениям объективного микрометра соответствует одно деление окулярного микрометра. Например, объективного микрометра (40 мкм) соответствует 20 делений окулярного микрометра, значит одно деление окулярного микрометра равно $40:20=2$ мкм. Заменяют объективный микрометр препаратом и при том же увеличении измеряют исследуемый объект. Если измеряемая клетка занимает в длину 2,5, а в ширину 0,75 деления окулярного микрометра, её размеры будут равны: длина $2,5 \times 2 = 5$ мкм, ширина $0,75 \times 2 = 1,5$ мкм. Для достоверности результатов производят измерения не менее 20-30 клеток и указывают их средние размеры и пределы колебаний, т.е. минимальные и максимальные величины.

Измерять микроорганизмы можно так же с помощью винтового окулярного микрометра МОВ-1-15 х. Методом математического расчёта Л.Е. Прохорович установил значения величин окулярного микрометра для всех возможных комбинаций увеличений окуляров и объективов современных биологических микроскопов (табл.2.). Пользование полученными значениями избавляет от необходимости применения

объективного микрометра и значительно ускоряет определение размеров микроорганизмов[121 – 125].

Таблица 2.

Значение величин окулярного микрометра в зависимости от увеличения окуляра и объектива.

Окуляр	Объектив	Общее увеличение	Цена деления линейки окулярного микрометра, мкм	Окуляр	Объектив	Общее увеличение	Цена деления линейки окулярного микрометра, мкм
7	8	56х	21,3	10	40	400х	3,4
7	20	140х	8,5	10	90	900х	1,5
7	40	280х	4,2	15	8	120х	15,0
7	90	630х	1,9	15	20	300х	6,0
10	8	80х	17,2	15	40	600х	3,0
10	20	200х	6,9	15	90	1350х	1,3

2.3. Метод количественного учёта дрожжей методом прямого подсчёта клеток в счётных камерах.

В наших исследованиях количественный учёт пивных дрожжей производили методом прямого счёта клеток дрожжей с использованием счётной камеры Горяева и микроскопа [126]. Счётная камера Горяева (рис. 15) имеет площадь 9 мм², объём камеры 0,9 мм³. Сетка счётной камеры разбита на 225 больших квадратов (15 рядов по 15 квадратов). Подсчитывают количество микроорганизмов в 5 больших квадратах по диагонали или по углам сетки и в середине. Так как на одной камере Горяева имеются две сетки (выше и ниже центральной части), то приготавливают два препарата: в первом считают количество клеток в пяти больших квадратах обеих сеток, во втором – лишь в одной сетке. Таким образом, подсчёт ведут в трёх сетках и подсчитывают среднее число клеток. Так как сетка состоит из 225 больших квадратов, объём одного квадрата равен

$$\frac{0,9 \text{ мм}^3}{225} = 0,004 \text{ мм}^3.$$

Таким образом, если в одном квадрате (или в $0,004 \text{ м}^3$) обнаружено a клеток, то в 1 мл (или 1000 мм^3) количество их будет равно

$$x = \frac{a \cdot 1000}{0,004} = a \cdot 250000$$

Для прямого подсчёта дрожжей под микроскопом можно использовать ещё счётную камеру Предтеченского, Тома–Цейса и Бюркера.

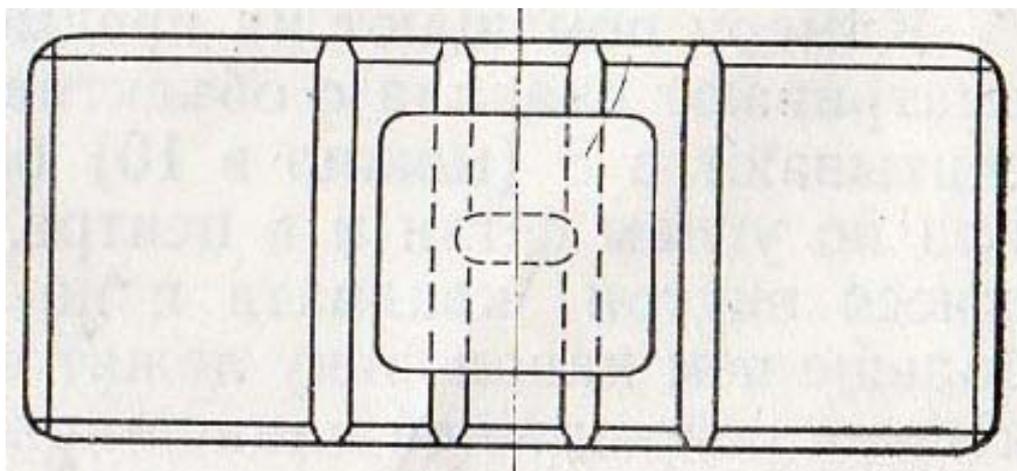


Рис. 13. Счётная камера Горяева.

2.4. Метод определения массовой концентрации сухих веществ рефрактометрическим методом.

Для определения технoхимических показателей сброженного различными штаммами дрожжей сока клубней топинамбура нами

использованы методы применяемые в спиртовом и ликёроводочном производстве [127].

Массовую концентрацию экстрактивных веществ определяют рефрактометрическим или пикнометрическим методом. В наших исследованиях использовали **рефрактометрический метод**, который основан на определении показателя преломления раствора, оставшегося после перегонки спирта из анализируемого изделия.

Проведение анализа. После перегонки спирта остаток в колбе смывают без потерь дистиллированной водой в мерную колбу вместимостью 250 – 500 см³, доводят объём дистиллированной водой до метки при температуре 20 °С. Полученный раствор перемешивают, наносят оплавленной стеклянной палочкой каплю раствора на рабочую неподвижную призму рефрактометра и сразу же накрывают подвижной призмой. Осветив поле зрения, с помощью регулировочного винта переводят линию раздела тёмного и светлого полей в окуляре до совмещения с указателем, который представляет собой пунктирную линию. Показания снимают по шкале сахарозы.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов параллельных определений двух проб, расхождение между которыми не должно превышать $\pm 0,5$ % относительно среднего значения.

2.5. Методы определения кислотности, рН, содержания этилового спирта в сброженном дрожжами соке клубней топинамбура.

Метод определения кислотности. Необходимо определять кислотность продукта, так как он даёт представление о его качестве.

Различают титруемую и активную кислотность.

Под титруемой кислотностью продукта понимают содержание всех кислых компонентов продукта, которые оттитровываются раствором щёлочи в присутствии индикаторов.

В основу метода определения титруемой кислотности положено прямое кислотно – основное титрование, базирующееся на реакции



Титруемую кислотность выражают в градусах. За градусы титруемой кислотности принимают количество кубических сантиметров раствора гидроксида натрия (или калия) концентрации 1 моль/дм³, необходимое для нейтрализации кислот, содержащихся в 100 г продукта.

Титрование проводят до точки эквивалентности. Для правильного установления точки эквивалентности при визуальном титровании важен выбор индикатора, который должен иметь хорошую чёткую окраску, изменяющуюся в небольшом интервале рН. Изменение окраски должно быть обратимым. Поэтому следует строго придерживаться условий применения того или иного индикатора.

Определение титруемой кислотности проводят визуальным или потенциометрическим методом.

Анализ состоит из двух этапов. Первый этап – экстрагирование кислот из анализируемой пробы продукта с помощью воды с последующей фильтрацией смеси. Фильтрат используют для титрования.

В жидких продуктах титрование проводят непосредственно в самом продукте.

Второй этап – титрование.

Титрование может быть визуальным и потенциометрическим. В наших исследованиях использовали визуальный метод.

При визуальном титровании в титруемый раствор добавляют 2 – 3 капли индикатора фенолфталеина и титруют раствором

гидроксида натрия (калия) при непрерывном перемешивании до получения розовой окраски, не исчезающей в течении 30 с. Отмечают объём израсходованного на титрование раствора гидроксида натрия (или калия).

В спиртовом производстве часто приходится определять **активную кислотность среды** – концентрацию водородных ионов методом прямой потенциометрии.

Это определение основано на измерении электрического потенциала, возникающего на электродах, опущенных в раствор с анализируемым веществом. Электрический потенциал возникает на электродах вследствие прохождения окислительно–восстановительных реакций. Величина окислительно–восстановительного потенциала определяется по отношению к водородному электроду, который изменяется в зависимости от концентрации водородных ионов в растворе.

В потенциометрическом анализе используют стеклянные электроды, потенциал которых зависит от концентрации водородных ионов. Принцип действия этих электродов основан на том, что стеклянный электрод проницаем для других катионов и анионов. Поэтому при помещении электродов в раствор между ними возникает разность потенциалов, поддающаяся измерению. Эта разность зависит от концентрации ионов в растворе.

Измерение рН среды на потенциометре отличается быстротой и достаточной точностью. В лабораториях заводов для определения рН в основном используют приборы следующих типов: ЛПУ – 01, рН - 340, рН – 673 и др.

Объёмную долю спирта определяют ареометрическим или пикнометрическим методом согласно ГОСТ 3639 – 79 «Растворы водно– спиртовые. Методы определения концентрации этилового спирта».

Мы использовали **ареометрический метод** который основан на определении объёмной доли этилового спирта при температуре 20 °С по относительной плотности анализируемого водно–спиртового раствора, измеряемой с помощью ареометров для спирта. Ареометр для спирта является ареометром постоянной массы, его показания основаны на зависимости между относительной плотностью водно–спиртового раствора и содержанием в нём этилового спирта.

Объёмную долю спирта (концентрацию) в водно–спиртовых растворах выражают в процентах, которые показывают количество объёмных частей безводного спирта в 100 объёмных частях водно – спиртового раствора при температуре 20 °С.

Например, если в 1 дм³ водно – спиртового раствора содержится 0,96 дм³ безводного спирта при 20 °С, то концентрация этого раствора равна 96 %.

Деления шкалы этих ареометров показывают содержание спирта в растворе в объёмных процентах при 20 °С.

Для измерения концентрации этилового спирта водно – спиртовой раствор наливают в стеклянный цилиндр осторожно по стенке цилиндра во избежание появления пузырьков воздуха.

Цилиндр с водно–спиртовым раствором помещают в водяную баню температурой 20 °С, в цилиндр опускают термометр и ареометр и выдерживают в течение 10 мин, не допуская изменений температуры.

Концентрацию спирта в технологических целях определяют в диапазоне температур от – 25 до +40 °С, используя для расчёта множители, устанавливающие соотношение между объёмной долей спирта в растворе и температурой.

Перед измерением концентрации спирта водно – спиртовой раствор следует тщательно перемешать мешалкой, перемещая её не менее пяти раз вверх и вниз по всей высоте столба раствора, не

вынимая её полностью. Затем ареометр берут за верхний конец стержня, свободный от шкалы, опускают в водно – спиртовой раствор, погружая его до тех пор, пока до предполагаемой отметки ареометрической шкалы не останется 3 – 4 мм, затем оставляют ареометр в покое. По истечении 3 мин снимают отсчёт показаний ареометра. Ареометр должен плавать в водно – спиртовом растворе, не касаясь стенок цилиндра.

Если ареометр при погружении в водно – спиртовой раствор не колеблется вдоль своей оси, то необходимо приподнять его на 3 – 4 мм и вновь опустить.

Отсчёт показаний ареометра проводят по нижнему краю мениска с точностью до 0,2 наименьшего деления.

Выводы по второй главе.

При выполнении диссертационной работы использованы общепринятые в микробиологии и технологии спирта методики и методы исследований.

У дрожжей изучали физиологическое состояние клеток и морфолого – культуральные признаки в различных стадиях их развития путём микроскопии живых неокрашенных и окрашенных фиксированных препаратов дрожжей.

Количественный учёт дрожжей производили методом прямого подсчёта клеток в счётной камере Горяева.

Массовую концентрацию сухих веществ в соке топинамбура в различные стадии брожения определяли рефрактометрическим методом.

Кислотность субстрата определяли титрованием, рН среды потенциометрическим методом, объёмную долю этилового спирта ареометрическим методом.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ДРОЖЖИ, ОТОБРАННЫЕ ПУТЁМ СКРИНИНГА, ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ЭТАНОЛА ПРИ СБРАЖИВАНИИ ИМИ СОКА ТОПИНАМБУРА.

3.1. Исследование бродильной активности различных рас дрожжей для выявления штаммов, активно сбраживающих сок топинамбура.

Известно, что традиционным сырьём спиртового производства является крахмалосодержащее – зерно и картофель и сахаросодержащее – меласса. Однако в качестве нетрадиционного сырья для производства спирта можно рассматривать любой материал, содержащий сахара или полисахариды, которые в результате гидролиза превращаются в сбраживаемые вещества.

По мнению отечественных и зарубежных исследователей топинамбур является самым дешёвым и перспективным сырьём для

спиртовой промышленности. Выход этанола из этого нетрадиционного для отрасли сырья выше, чем при переработке зерна и картофеля.

Во многих странах и в том числе в Узбекистане при производстве спирта применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Однако в последние годы для получения спирта из клубней топинамбура стали применять дрожжи рода *Kluveromyces* [4, 40, 128].

В нашей стране этиловый спирт получают в основном из зерна – крахмалосодержащего сырья. А топинамбур по химическому составу является инулиносодержащим сырьём. Его клубни содержат (% на сырую массу): сухих веществ – 22,2; воды – 77,5; белка – 2,3; жиров – 0,4; целлюлозы – 10,9; сахаров – 4,0; золы – 1,1.

Углеводный комплекс топинамбура (% от сухой массы) представлен инулином – 48,31; крахмалом – 1,08; гемицеллюлозой – 4,28; клетчаткой – 2,13; манназой – 0,68; сахарозой – 25,25 [129].

Дрожжи, используемые для производства этанола из сока клубней топинамбура должны обладать инулиназной активностью и содержать комплекс ферментов, способных последовательно превращать высокомолекулярные соединения в доступные для ассимиляции дрожжами вещества.

Российские учёные [130] исследуя влияние различных рас дрожжей на продукты биосинтеза этанола из топинамбура установили, что дрожжи *Kluveromyces marxianus Y-303* являются наиболее перспективными для получения спирта из топинамбура.

Для выполнения поставленной в данной диссертации цели исследований – проведение скрининга различных рас дрожжей, активно сбраживающих сок клубней топинамбура, и отбор выявленных активных рас дрожжей для производства спирта из топинамбура в Узбекистане, в экспериментах на основании вышеизложенных результатов российских учёных, в качестве контроля использовали *Kluveromyces marxianus Y-303*.

На кафедре Технологии пищевых продуктов нашего института имеется коллекция микроорганизмов, состоящая из пивных, винных, спиртовых, хлебопекарных, кумысных и каротинсинтезирующих дрожжей, молочнокислых бактерий, плесневых грибов и базидиомицетов. Из этой коллекции для исследований отобраны 14 видов спиртовых, винных, пивных, хлебопекарных и каротинсинтезирующих дрожжей.

Каждую отобранную культуру с помощью бактериологической петли высевали в пробирки с 10 мл солодового суслу, содержащего 8% СВ (стандартная питательная среда для дрожжей). Посевы культивировали в течение 24 часов в термостате при $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Затем для исследования эффективности сбраживания суслу из топинамбура испытуемыми дрожжами, по 1% односуточной культуры дрожжей (в логарифмической фазе роста) из пробирки отбирали пипеткой и вносили в колбочки с соком топинамбура, содержащим 12% СВ и параллельно в колбочки с солодовым суслем (8% СВ) для сравнения степени брожения. Посевы дрожжей культивировали при той же температуре, что и на пивном сусле.

Рост дрожжей и степень сбраживания ими сока топинамбура и пивного суслу отмечали через 24, 48, 72 и 168 часов культивирования трёхкестным способом (таблицы 3, 4)

Таблица 3.

Бродильная активность различных рас дрожжей при культивировании их в соке топинамбура с содержанием сухих веществ 12%.

Наименование дрожжей	Время культивирования, час.			
	24	48	72	168
Rhodotorulapilmanae Y – 33	–	–	±	–

Rhodotorulaglutinis Y – 81	–	–	–	–
Oenoferm Credo	+++	++	+	+
OenofermRouge	+++	+	+	–
Saccharomycesvini Ркацители 6	+++	+	±	±
Saccharomyces oviformis 96 - К	++	++	+	+
Saccharomyces carlsbergensis П – 95	++	++	++	±
Saccharomyces carlsbergensis П – 76	+	+++	+++	±
Saccharomyces uvarum 731	+++	++	±	–
Saflager W – 34/70	++	++	+	±
Saccharomyces cerevisiae sp.	+++	++	+	±
Saccharomyces cerevisiae Y – 717	+++	+	+	±
Saccharomyces cerevisiae Л – 3	–	±	±	–
Kluuveromyces marxianus Y – 303	++	+	±	–

Примечание: брожение (+++) – бурное, (++) – среднее, (+) – слабое, (±) – очень слабое, (–) – отсутствует.

Таблица 4.

Бродильная активность различных рас дрожжей при культивировании их в пивном сусле с содержанием 8% сухих веществ.

Наименование дрожжей	Время культивирования, час.			
	24	48	72	168
Rhodotorula pilmanae Y – 33	–	–	–	–
Rhodotorula glutinis Y – 81	–	–	–	–
Oenoferm Credo	++	++	+	+
Oenoferm Rouge	++	++	+	±

<i>Saccharomyces vini</i> Ркацители 6	++	+	+	±
<i>Saccharomyces oviformis</i> 96 - К	++	+	+	±
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> П – 95	++	+	+	±
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> П – 76	+	+	+	±
<i>Saccharomyces uvarum</i> 731	++	++	+	±
<i>Saflager</i> W – 34/70	++	+	+	±
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp.	+++	++	+	±
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y – 717	++	+	±	±
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Л – 3	++	+	+	±
<i>Kluveromyces marxianus</i> Y – 303	+	±	±	–

Примечание: Брожение (+++) – бурное, (++) – среднее, (+) – слабое, (±) – очень слабое, (–) – отсутствует.

Бродильные свойства – способность дрожжей возбуждать спиртовое брожение представляет первостепенный интерес для практики. Поэтому скрининг – отбор различных рас дрожжей, активно сбраживающих сок топинамбура, мы начали с изучения бродильных свойств культур. Правильный подбор дрожжей, активно сбраживающих сок топинамбура является важным фактором для повышения выхода спирта.

Результаты проведённых исследований (таблицы 3, 4) показали, что каротинсинтезирующие дрожжи рода *Rhodotorula* почти не развивались на обеих питательных средах. Очень слабое развитие *Rh. pilimanae* Y–33 наблюдалось лишь на третьи сутки культивирования. Поэтому считали дальнейшее изучение их нецелесообразным.

Винные дрожжи *OenofermCredo*, *OenofermRouge*, *Saccharomyces uvarum* 731, *Saccharomyces vini* Ркацители 6 и *Saccharomyces* sp. хорошо сбраживали сок топинамбура, а стандартную

среду удовлетворительно. Считаем, что эти 5 культур перспективны для продолжения исследований.

Хересные дрожжи *Saccharomyces oviformis* 96 –К, пивные дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* расы П – 95 и П – 76, *Saflager W – 34/70* сбраживали сок топинамбура лучше, чем пивное сусло, однако бродильная активность их была несколько ниже по сравнению с винными дрожжами.

Таким образом, все 14 штаммов, подвергнутых скринингу лучше развивались в соке топинамбура и сбраживали его лучше, чем пивное сусло. 5 видов дрожжей: *Saccharomyces vini* Ркацители 6, *Oenoferm Credo*, *Oenoferm Rouge*, *Saccharomyces cerevisiae* sp., *Saccharomyces uvarum* 731 отобраны для продолжения скрининга. Следует отметить, что общепризнанная раса дрожжей *Kluveromyces marxianus* Y–303 в качестве самого перспективного штамма для получения этанола из сока клубней топинамбура, по результатам наших исследований по сбраживающей активности значительно отстаёт от указанных выше пяти изученных видов дрожжей. Хуже всех исследованных культур по бродильным свойствам были хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Л–3, которые очень слабо росли в соке топинамбура.

3.2. Морфологические особенности и динамика роста дрожжей, активно сбраживающих сок топинамбура, в течение семи суток культивирования.

Как изложено выше, в результате первого этапа скрининга различных рас дрожжей нами были отобраны 5 наиболее активно сбраживающих сок клубней топинамбура культуры и в качестве контроля дрожжи *Kluveromyces marxianus* Y– 303, которые по литературным сведениям являются самым перспективным штаммом для производства спирта из топинамбура.

Исследованы морфологические особенности выбранных дрожжей. Эти дрожжи имеют различную форму: округлую, овальную или эллиптическую и размножаются почкованием.

Микроскопическое изучение клеток *Saccharomyces vini* Ркацители 6 показало, что они имеют овальную и округлую форму, размер их равен 6x8 или 4x6 мкм. *OenofermCredo* и *OenofermRouge* (немецкие штаммы дрожжей) от других изучаемых культур отличались тем, что клетки их кроме овальных и округлых форм имели ещё более вытянутые формы. Размеры немецких дрожжей почти вдвое превышали размеры других исследуемых культур. *OenofermRouge* имели величину клеток 6x10, 8x12, 6x20 мкм, а *OenofermCredo* имели размеры клеток 6x10, 8x10, 10x14, 8x20 мкм.

Клетки *Saccharomyces cerevisiae* sp. имели круглые или яйцевидные клетки размером 5 – 6,2 x 5 – 8 мкм. В период активного размножения образуют скопление из 4 – 5 клеток. У *Saccharomyces uvarum* 731 форма клеток в основном овальная, размеры в пределах 6 – 8 x 8 – 10 мкм.

Форма колоний всех изучаемых дрожжей были округлой формы, с ровными, хорошо очерченными краями, поверхность гладкая, блестящая, профиль выпуклый структуры мелкозернистая. Морфологию дрожжевых колоний изучали на агаризованном солодовом сусле. Цвет колоний белый с кремоватым оттенком. Только *OenofermRouge* отличается от колоний других дрожжей более тёмной окраской и большими размерами, 4 – 6 мм в диаметре, тогда как колонии других дрожжей колеблются в пределах 3 – 5 мм в диаметре.

Один из важных факторов, определяющих эффективность спиртового производства – физиологическая активность дрожжевых клеток. Плотность дрожжевой популяции, бродильная активность и продуктивность дрожжей оказывают существенное влияние на стабильное протекание процесса брожения, скорость сбраживания сырья и выход спирта.

Значения перечисленных показателей напрямую зависят от условий культивирования дрожжей. Вместе с тем, в технологии этанола из нетрадиционного вида сырья, к какому относится топинамбур, вопросам получения засевных дрожжей уделено недостаточно внимания. Известно только, что для сбраживания неосветлённого сусла из топинамбура целесообразно использовать схему получения засевных дрожжей, предусматривающую их последовательный пересев в среды с увеличенным объёмом нетрадиционного инулинсодержащего сырья. При таком способе первые этапы культивирования ведутся на солодовом сусле, далее в него добавляется гидролизат сока топинамбура, представляющий собой осветлённое сусло. Последняя стадия накопления биомассы проводится либо на чистом соке из топинамбура, либо на гидролизате сока[28, 131].

Поэтому при скрининге отобранных рас дрожжей первоначально мы культивировали их на жидкой питательной среде – солодовом сусле с 8% СВ, на втором этапе осветлённом соке из клубней топинамбура, содержащем 10% сухих веществ, и на третьем этапе – соке топинамбура с 20% СВ.

Известно, что содержание в сусле сахаров в количестве до 20% не задерживает брожение [132]. Высокие концентрации сахаров могут остановить брожение, при этом дополняющим ингибитором является этиловый спирт. Угнетение брожения при высокой концентрации сахара связано с тем, что дрожжи не могут преодолеть осмотическое давление сахаросодержащей жидкости.

При постепенном повышении концентрации сухих веществ сока топинамбура сбраживающая активность исследуемых дрожжей повышалась (таблицы 3, 4, 5). Это можно объяснить благоприятным химическим составом клубней топинамбура и физиологической активностью дрожжевых культур.

Среднестатистические данные показывают, что содержание сухих веществ в клубнях колеблется в пределах 19 – 30%. Основную массу сухих веществ клубней топинамбура составляют углеводы, количество которых может достигать 80 и даже 90%. Основу углеводного комплекса топинамбура составляют фруктоза и её полимеры различной степени сложности, высшим гомологом которых является инулин[85, 133].

Общее содержание фруктозанов, т.е. инулина и других углеводов, которые в результате гидролиза дают фруктозу, составляет в клубнях топинамбура 65 – 80% от общей суммы сухих веществ. Кроме фруктозанов в клубнях топинамбура есть целлюлоза, пектиновые вещества и небольшом количестве гемюцеллюлозы. Наряду с вышеперечисленными веществами клубни топинамбура содержат азотистые вещества, микро-, макроэлементы и витамины (тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота и др.).

Заслуживает особого внимания наличие собственных ферментов топинамбура, гидролизующих инулин – фруктозаны. Помимо инулиназы в клубнях были обнаружены ферменты, обладающие гидролитической активностью, называемые фруктофуранозидазой, которая открывая фруктозные остатки от цепи полифруктозана, снижает степень его полимеризации и высвобождает свободную фруктозу. Инвертаза находится в малых количествах. Она гидролизует сахарозу, а также расщепляет раффинозу на фруктозу и мелибиозу.

Для производства спирта из клубней топинамбура большое значение имеет также биосинтез дрожжевыми клетками инулиназ и фруктозидаз. Используемая в экспериментах культура *Kluyveromyces marxianus* Y – 303, в настоящее время признанная как перспективный штамм для получения спирта из топинамбура, как говорилось выше использована в качестве контроля. Известно, что дрожжи *Kluyveromyces marxianus* Y – 303 продуцируют внутриклеточную β – фруктозидазу, которая проявляет активность не только по отношению к сахарозе, но и к инулину [128].

Для культивирования исследуемых дрожжей сок топинамбура с различным содержанием сухих веществ (10, 12, 20%) использовали без предварительного гидролиза инулина и других высокомолекулярных компонентов. Хороший рост и сбраживание сока топинамбура всеми отобранными расами дрожжей свидетельствует о биосинтезе ими инулиназ, так как на двух первых этапах скрининга некоторые дрожжи не развивались (таблица 3). Видимо для их роста в соке топинамбура был недостаточно полноценным компонентный состав среды.

Сбраживающую активность дрожжей на питательной среде – соке клубней топинамбура определяли при $+30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течении 7 суток культивирования. Результаты оценивали четырёхкестным методом (таблица 5).

Таблица 5.

Бродильная активность дрожжей на питательной среде – соке топинамбура, содержащего 20% сухих веществ.

Наименование дрожжей	Время культивирования, час.			
	24	48	72	168
<i>Saccharomyces vini</i> Ркацители 6	+++	+	+	–
Oenoferm Credo	++++	+	+	±
OenofermRouge	++++	+	+	±
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp.	+++	+	+	±
<i>Saccharomyces uvarum</i> 731	+++	+	+	–
<i>Kluveromyces marxianus</i> Y – 303	++	+	±	–

Примечание: Бродильная активность (++++) – очень хорошая, : (+++) – хорошая, (++) – средняя, (+) – слабая, (±) – очень слабая, (–) – брожение отсутствует.

По бродильной активности все дрожжи значительно превосходили контроль *Kluveromyces marxianus* Y – 303. Максимальная

сбраживающая активность всех исследуемых видов дрожжей проявилась в течение 24 часов культивирования. Уже на вторые сутки роста у всех культур бродильная активность снизилась в 3 – 4 раза. Слабое брожение наблюдалось и через 72 часа, а у *Kluveromyces marxianus* Y – 303 брожение сильно ослабло. Через 168 часов культивирования очень слабое брожение продолжалось только у *OenofermCredo*, *OenofermRouge* и *Saccharomyces cerevisiaesp.*

Таким образом, самой высокой бродильной активностью обладали немецкие дрожжи *OenofermCredo*, *OenofermRouge* и *Saccharomyces cerevisiaesp.*, а контрольная культура имела самую низкую сбраживающую способность.

В таблице 6 приведены результаты изучения динамики роста отобранных для скрининга дрожжей на питательной среде – соке топинамбура, содержащего 12% СВ. Культивирование дрожжей производили при температуре $+30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ в термостате в течение 7 суток. Отбор проб для исследований производили через 24, 48, 72 и 168 часов выращивания.

По внешнему виду клеток можно определить физиологическое состояние дрожжей. В бродящих средах одновременно присутствуют молодые, зрелые, почкующиеся, старые и отмершие клетки.

Таблица 6.

Динамика роста дрожжей на питательной среде – соке топинамбура, содержащего 12% сухих веществ.

Время культивирования, час	24	48			72			168		
Наименование дрожжей	а	а	б	в	а	б	в	а	б	в
<i>Saccharomycesvini</i> Ркацителы 6	49,5	93,2	92,3	99,1	124,7	127,8	98,5	282,1	114,5	40,6
Oenoferm Credo	82	115,8	154,4	99	254,2	123	98,5	459,2	151,5	33
OenofermRouge	68,3	136,6	135,3	99,1	205	201,9	98,5	388,3	152,2	39,2
<i>Saccharomycescerevisiae</i> sp.	80,2	152,4	150,3	99	299	235,4	98,5	441,1	132,3	30
<i>Saccharomycesuvarum</i> 731	52,5	94,8	93,8	99	135,3	133,3	98,5	288,7	92,4	32
<i>Kluveromycesmarxianus</i> У – 303	30,7	64,5	63	99,1	98,2	96,7	98,5	173,9	45,2	26

Примечание: а – общее количество дрожжевых клеток, млн/мл, б – количество живых клеток, млн/мл, в – количество живых клеток в процентах по отношению к общему числу дрожжей.

Наибольшей бродильной энергией обладают зрелые клетки. Дрожжи, применяемые в производстве спирта, должны иметь высокую бродильную энергию (быстро и полно сбраживать сахара) и анаэробный тип дыхания, быть устойчивыми к продуктам своего обмена, а также к изменению состава среды, переносить высокую концентрацию сухих веществ в среде.

В 24 – часовых культурах дрожжей были только зрелые и молодые клетки. Наибольшее количество клеток обнаружено в соке топинамбура, сброженном OenofermCredo(82 млн/мл) и *Saccharomyces cerevisia*esp. (80,2 млн/мл). За это же время число клеток *Kluuyveromyces marxianus*Y – 303 самое наименьшее в 2,6 – 2,7 раза меньше, чем у предыдущих культур.

После 48 часов культивирования количество клеток всех изучаемых видов дрожжей возросло почти вдвое. Однако в культуральной среде всех дрожжей появилось незначительное количество 0,9 – 1% мёртвых клеток. В виды живых дрожжей находились в хорошем физиологическом зрелом состоянии, есть почкующиеся клетки.

Культивирование в течение 72 часов способствовало ещё большему увеличению числа клеток у всех шести видов дрожжей. Количество мёртвых клеток у всех видов составило 1,5%, есть стареющие клетки.

В связи с большой трудоёмкостью экспериментальных работ определение количества клеток 4, 5, 6 – суточных дрожжей не производили. В 168 – часовых культурах дрожжей в соке топинамбура число мёртвых клеток дрожжей достигло от 2,6% (контроль) до 30 – 40,6%. Хотя количество живых клеток достаточно высокое во всех культуральных средах с дрожжами, брожение отсутствует, так как все они находятся в стареющем состоянии.

Таким образом, изучение динамики роста различных рас дрожжей на питательной среде – соке топинамбура, содержащем 12% СВ в течение 7 суток культивирования, показал, что дрожжи OenofermCredo, OenofermRouge, *Saccharomyces cerevisia*esp. На всех стадиях брожения

отличаются очень высоким содержанием числа клеток. В 24 – х и 48 – часовых культурах дрожжи находились в физиологически активном, в молодом и зрелом состоянии. В 48 – часовых культурах имелось незначительное количество 0,9 – 1% мёртвых клеток, а в 72 – часовых – число мёртвых клеток составило 1,5%. Через 168 часов культивирования число мёртвых клеток дрожжей возрастает от 26% до 40,6%, а живые дрожжи находясь в стареющем состоянии, теряют сбразивающие свойства.

3.3 Определение оптимальных условий культивирования дрожжей, способствующих повышению выхода спирта, путём изучения влияния различных факторов среды.

Одна из особенностей микроорганизмов – их необычайная зависимость от условий окружающей среды. Малые размеры клеток определяют тесный контакт микроорганизмов со средой, поэтому они реагируют на изменение условий среды в большей степени, чем другие живые организмы. Факторы внешней среды весьма разнообразны. Решающее значение для жизнедеятельности микроорганизмов имеют набор и соотношение компонентов питательной среды. Чрезвычайно важны физико-химические факторы: кислотность среды (рН), аэрация, температура и другие. Для представителей различных групп микроорганизмов эти пределы часто неодинаковы. Изменение того или другого фактора существенно влияет на их рост и обмен веществ.

Происходящие в окружающей среде изменения так или иначе отражаются на микроорганизмах. Они могут способствовать развитию микробов, подавлять их развитие и даже привести к гибели. Может произойти изменение свойств микроорганизмов и направленность вызываемых ими биохимических процессов. Развитие микроорганизмов в свою очередь изменяет среду: в неё выделяются продукты их

жизнедеятельности, из неё микроорганизмы берут необходимые для жизни вещества.

Изучая влияние различных факторов среды на микроорганизмы можно выявить оптимальные, благоприятные условия их роста. Регулируя условия существования, можно управлять развитием, подавлять или, наоборот, интенсифицировать биохимическую деятельность микроорганизмов.

Культивирование микроорганизмов проводят на разнообразных питательных средах. Рост микробных клеток и их метаболизм протекают в строго специфических условиях и предъявляют определённые требования к составу и соотношению компонентов питательной среды.

Разработка оптимального состава среды включает подбор концентраций питательных веществ, установление необходимого рН. Не менее важным является определение воздействия на микробиологические процессы параметров культивирования: температуры, аэрации, количества посевного материала, концентрации конечного продукта.

Влияние различных исходных концентраций сухих веществ в осветлённом соке из клубней топинамбура на бродильные свойства испытываемых штаммов дрожжей.

Дрожжи в логарифмической фазе роста высевали по 3% в сусло топинамбура с различным содержанием сухих веществ: 10, 12, 14, 16, 20%, чтобы определить самое оптимальное количество СВ для бродильной активности культур. Процесс контролировали по динамике выделения CO_2 и пенообразованию визуально и отмечали трёхкрестным способом.

Засевные дрожжи (все 6 штаммов) проходили стадии последовательной адаптации к инулинсодержащему сырью – соку топинамбура. Каждую культуру дрожжей выращенную в пробирках на косом агаризованном солодовом сусле высевали в жидкое солодовое

сусло, содержащее 8% СВ, а затем в сок топинамбура с 10% СВ. Затем активированные штаммы дрожжей, как указывалось выше, высевали в сусло из топинамбура с различным содержанием сухих веществ. Процесс сбраживания осуществляли в течение 7 суток культивирования при температуре 28°C, оптимальной для всех рас дрожжей.

Экспериментальные данные по изучению влияния содержания различных количеств сухих веществ в соке топинамбура на процесс сбраживания осветлённого сусла из сока топинамбура представлены в таблице 7.

Таблица 7.

Бродильная активность дрожжей в зависимости от содержания сухих веществ (СВ) в соке топинамбура.

№	Наименование дрожжей	СВ, %	Длительность брожения, сутки						
			1	2	3	4	5	6	7
1	Oenoferm Credo	10	++	++	+	+	–	–	–
2	Oenoferm Rouge		++	++	++	+	±	–	–
3	Saccharomyces uvarum 731		++	++	++	++	±	–	–
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		++	++	++	±	–	–	–
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		+	+	+	+	–	–	–
6	Kluyveromyces marxianus Y-303		+	+	+	+	–	–	–
1	Oenoferm Credo	12	++	+++	+	±	–	–	–
2	Oenoferm Rouge		++	+++	+	±	–	–	–
3	Saccharomyces uvarum 731		++	++	+	±	–	–	–
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		++	++	+	±	–	–	–
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		+	+	++	±	–	–	–
6	Kluyveromyces marxianus Y-303		+	+	++	+	±	–	–
1	Oenoferm Credo	14	+++	+++	++	±	–	–	–

2	Oenoferm Rouge		+++	+++	++	±	–	–	–
3	Saccharomyces uvarum 731		+++	+++	++	±	–	–	–
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		+++ +	+++	++	+	±	±	–
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		+++	++	++	+	+	±	±
6	Kluuveromyces marxianus Y-303		+	+	++	+	±	±	±
1	Oenoferm Credo	16	+++	+++	++	+	±	–	–
2	Oenoferm Rouge		+++	+++	+	+	±	–	–
3	Saccharomyces uvarum 731		+++	++	+	+	±	–	–
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		+++	++	++	+	±	–	–
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		+++	++	+++	+	+	±	–
6	Kluuveromyces marxianus Y-303		+	+	++	+	±	±	–
1	Oenoferm Credo	20	+++	+++	++	+	±	–	–
2	Oenoferm Rouge		+++	+++	++	+	+	±	±
3	Saccharomyces uvarum 731		+++	+++	++	+	–	–	–
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		+++	+++	++	+	–	–	–
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		++	++	++	+	–	–	–
6	Kluuveromyces marxianus Y-303		+	+	++	+	–	–	–

Примечание: Брожение: (+++) – бурное, (++) – среднее, (+) – слабое, (±) – очень слабое, (–) – отсутствует.

В течение первых 2 суток культивирования дрожжей активное сбраживание в образцах суслу топинамбура с различным содержанием сухих веществ происходило довольно хорошее сбраживание суслу почти всеми испытываемыми штаммами, кроме дрожжей под номерами 1 и 2. На 3-4 сутки роста бродильная активность снижалась, а на пятые сутки – стала слабой или отсутствует. На 6-7 сутки развития дрожжей брожение

прекратилось совсем, за исключением немногих штаммов, которые в очень слабой степени сбраживали сусло топинамбура.

Анализ бродильной активности изучаемых дрожжей показывает, что сусло топинамбура с содержанием сухих веществ 18% благоприятна (оптимальна) для жизнедеятельности всех дрожжей за исключением *Kluuyveromyces marxianus* Y-303, который слабо сбраживал все образцы сусла с различным количеством сухих веществ.

Исходя из полученных данных (таблица 7) все последующие исследования проводили используя для **культивирования дрожжей сусло топинамбура с 20% СВ.**

Определение оптимального количества посевного материала дрожжей на их бродильную активность в соке топинамбура.

Известно, что скорость брожения зависит не только от состава сусла, но и от концентрации дрожжей в сусле, которая в свою очередь определяется их нормой введения [134]. Момент же начала брожения является характерным свойством штамма и от нормы введения не зависит. При высокой норме введения дрожжи вначале полностью исчерпывают имеющуюся в сусле глюкозу и только затем начинают использовать мальтозу. При низкой норме введения дрожжи начинают использовать мальтозу ещё до того, как вся имеющаяся в сусле глюкоза будет сброжена.

Установлено, что повышение нормы введения дрожжей может привести к лимитированию веществ, необходимых для синтеза мальтотриозы. При низкой норме введения дрожжи обладали высокой способностью сбраживать мальтозу, сохраняющейся весь период брожения.

На практике норму введения дрожжей выбирают в зависимости от следующих показателей:

концентрация сусла – при высоком содержании экстракта норму увеличивают;

температура брожения – при холодном режиме норма несколько выше;

желаемой продолжительности брожения – чем она короче, тем выше норма;

содержания кислорода в сусле – при недостаточной аэрации норму можно увеличить [135].

Результаты исследований влияния количества посевного материала дрожжей на их бродильную активность в соке топинамбура показаны в таблице 8. В связи с тем, что установленное оптимальное количество сухих веществ в соке топинамбура для роста и бродильной активности дрожжей составляет 20% СВ, в последующих экспериментах использовали сусло топинамбура содержащее 20% СВ. Кроме бродильной активности дрожжей при посеве в сусло топинамбура различных количеств посевного материала дрожжей определяли также остаточное количество сухих веществ в сброженном сусле, что позволит более точно установить оптимальное количество посевных дрожжей для решения поставленных задач. (таблица 8).

Дрожжи вводили в сбраживаемое сусло в количестве 1, 3, 5, 10%. Время культивирования их составляло 7 суток. В первые сутки культивирования почти все 6 штаммов дрожжей хорошо сбраживали сусло, на вторые сутки бродильная активность их несколько снизилась, на третьи сутки наблюдалось слабое или очень слабое брожение. В течение последних (5-7) суток наблюдалось очень слабое брожение или прекращение бродильной активности почти всех дрожжей.

В сусле топинамбура при введении 10% посевного материала бурное брожение происходило в первые сутки роста дрожжей, при этом дрожжи ассимилировали 53-57% СВ. На четвёртые сутки прекращалось брожение у всех штаммов дрожжей.

Таблица 8.

**Влияние количества посевного материала дрожжей на их бродильную
активность в соке топинамбура.**

№	Наименование дрожжей	СВ, %	Кол- во дрож- жей, %	Длительность брожения, сутки						
				1	2	3	4	5	6	7
1	Oenoferm Credo	6,0	1	+++	+	+	+	±	-	-
2	Oenoferm Rouge	5,5		+++	+	+	±	-	-	-
3	Saccharomyces uvarum 731	5,5		+++	+	±	±	-	-	-
4	Saccharomyces vini Ркацители 6	6,0		+++	+	+	±	-	-	-
5	Saccharomyces cerevisiae sp.	7,0		+	+	+	±	±	±	±
6	Kluuveromyces marxianus Y- 303	5,5		+++	++	+	±	-	-	-
1	Oenoferm Credo	6,0	3	+++	++	+	±	±	-	-
2	Oenoferm Rouge	5,5		+++	++	+	±	-	-	-
3	Saccharomyces uvarum 731	6,0		+++	++	+	±	-	-	-
4	Saccharomyces vini Ркацители 6	6,6		+++	+	+	+	±	-	-
5	Saccharomyces cerevisiae sp.	6,0		+	++	+	±	±	±	±
6	Kluuveromyces marxianus Y- 303	6,0		+++	++	+	±	-	-	-
1	Oenoferm Credo	6,5	5	+++	+	±	-	-	-	-
2	Oenoferm Rouge	6		+++	+	±	-	-	-	-
3	Saccharomyces uvarum 731	6		+++	+	±	-	-	-	-
4	Saccharomyces vini Ркацители 6	6		+++	+	±	-	-	-	-
5	Saccharomyces cerevisiae sp.	6,5		++	++	+	±	±	±	±
6	Kluuveromyces marxianus Y- 303	6,5		+++	++	+	±	-	-	-
1	Oenoferm Credo	7,0		++	++	+	-	-	-	-
2	Oenoferm Rouge	7,0		+++	+	±	-	-	-	-

3	Saccharomyces uvarum 731	7,0	10	++	+	+	-	-	-	-
4	Saccharomyces vini Ркацители 6	7,5		+++	++	±	-	-	-	-
5	Saccharomyces cerevisiae sp.	7,0		++	++	+	-	-	-	-
6	Kluuveromyces marxianus Y- 303	7,5		+++	+	±	-	-	-	-

Примечание: Брожение: (+++) – бурное, (++) – среднее, (+) – слабое, (±) – очень слабое, (-) – отсутствует. СВ, % – содержание сухих веществ в конце брожения.

В сусле топинамбура с внесёнными 5% дрожжей весь период роста и брожения дрожжей был идентичен процессу брожения суслу с 10% дрожжей. Однако в сусле с 5% посевных дрожжей сбразивалось больше сухих веществ суслу – в пределах 56,6-60%.

Визуальное определение бродильной активности в образцах с внесением в сусло топинамбура по 1 и 3% дрожжей показали почти одинаковые результаты как и при введении посевного материала дрожжей в более высоких количествах – 5-10%. Рефрактометрическое определение сухих веществ в сусле топинамбура после окончания брожения показало, что в бражке, полученной путём введения 1% дрожжей сброжено 53-63% от исходного содержания сухих веществ в сусле, а в сусле, сброженном тремя процентами дрожжей – в пределах 56-63% сухих веществ исходного суслу. На основании полученных результатов и их анализа (таблица 8) считаем, что **оптимальной нормой** для сбразивания суслу топинамбура с 20% СВ является 3% посевного материала дрожжей.

Влияние активной кислотности среды (рН) на жизнедеятельность дрожжей.

Одним из важных факторов для жизнедеятельности дрожжей и всех других микроорганизмов является активная кислотность среды, которую выражают величиной рН – отрицательный логарифм концентрации водородных ионов. Значение рН от 0 до 14 характеризует степень

кислотности или щёлочности. Микроорганизмы по разному относятся к активной кислотности среды. Некоторые из них могут развиваться в широких пределах рН, развитие других приурочено к более узкой зоне. Даже небольшие изменения активной кислотности среды заметно влияют на рост и обмен веществ микроорганизмов. В лабораторных условиях для создания и поддержания активной кислотности среды используют различные приёмы: подтитровывают среду растворами кислоты или щёлочи, добавляют к среде мел или буферные растворы.

Под влиянием рН среды может изменяться активность ферментов, а в связи с этим биохимическая активность микроорганизмов и направленность осуществляемых ими биохимических превращений. Так одни и те же дрожжи в кислой среде образуют из сахара большое количество этилового спирта и незначительное количество глицерина, в щелочной среде содержание глицерина резко увеличивается, а выход спирта снижается. Изменение реакции среды может влиять на электрический заряд поверхности клетки, в связи с чем изменяется проницаемость клетки для отдельных ионов.

Жизнедеятельность каждого вида микроорганизмов возможна лишь в более или менее определённых границах рН среды, выше или ниже которых она угнетается. Для большинства дрожжей наиболее благоприятна слабо – кислая среда с рН 5-6. Большинство бактерий лучше растёт в зоне рН 6,8-7,3, то есть в нейтральной или слабощёлочной среде.

Дрожжи в благоприятной для них кислой среде вырабатывают главным образом нейтральный продукт – этиловый спирт. В нейтральной среде образуют уксусную кислоту, которая снижает рН среды до благоприятного для них значения, а затем дрожжи начинают вырабатывать этиловый спирт.

На жизнедеятельность дрожжей значительное влияние оказывает также и активная кислотность среды. Водородные ионы изменяют электрический заряд коллоидов цитоплазматической оболочки клеток и в

зависимости от концентрации могут увеличивать или уменьшить её проницаемость для отдельных веществ и ионов. От значения рН зависят скорость поступления питательных веществ в клетку, активность ферментов, образование витаминов. При изменении рН меняются и направление самого брожения.

Жизнеспособность дрожжей сохраняется в пределах рН среды от 2 до 8. Для выращивания дрожжей оптимальным является рН 5-6 [112]. Естественный показатель рН сока клубней топинамбура был равен 6,1.

Чтобы определить влияние значений рН на бродильную активность дрожжей, по 3% посевного материала дрожжей каждого штамма высевали в 20% сок топинамбура с рН 3; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5. Посевы культивировали при 28°C в течении 7 суток, затем в сброженном сусле топинамбура определяли остаточное количество сухих веществ. Результаты эксперимента даны в таблице 9.

Ни один из испытываемых штаммов дрожжей не развивался при рН среды равном трём. При рН среды 3,5 активная сбраживающая способность всех культур проявилась лишь на четвёртые сутки культивирования. В трёх суточных культурах лишь *OenofermCredo* и *Saccharomyces vini* Ркацители проявляли активную сбраживающую способность. В бражке большая часть сухих веществ сусла оставалась несброженной и составляла 50-57% от сухих веществ исходного сусла.

Сусло топинамбура с рН 5,0 и 5,5 было более благоприятным для роста и бродильной активности всех 6 штаммов. При этих значениях рН брожение сусла длилась в течение пяти суток. Следует отметить, что в первые и вторые сутки развития большинство дрожжей сбраживали сусло бурно или средне, затем на пятые сутки бродильная активность становилась очень слабой, а на шестые сутки исчезла. *Kluuveromyces marxianus* Y-303 при рН 4,0 и 4,5 показала более низкую сбраживающую активность. Дрожжи при рН = 4,5 лучше ассимилировали сухие вещества сока топинамбура, чем при рН 4,0.

Таблица 9.

**Бродильная активность дрожжей в зависимости от рН сока
топинамбура.**

№	Наименование дрожжей	рН	Длительность брожения, сутки						СВ, %
			1	2	3	4	5	6	
1	Oenoferm Credo	3,5	-	-	+	++	+	-	8,5
2	Oenoferm Rouge		-	±	+++	++	+	-	8,2
3	Saccharomyces uvarum 731		-	-	-	+++	++	±	8,0
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		-	-	+++	+++	++	±	7,5
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		-	-	-	+++	+	±	8,0
6	Kluyveromyces marxianus Y-303		-	-	-	++	+	±	8,6
1	Oenoferm Credo	4,0	+++	+++	+++	+	±	-	7,0
2	Oenoferm Rouge		+++	+++	+++	+	±	-	7,0
3	Saccharomyces uvarum 731		+++	+++	++	+	±	-	7,2
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		++	++	++	+	+	-	8,0
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		+	++	++	++	+	±	8,0
6	Kluyveromyces marxianus Y-303		-	++	++	+	±	-	8,6
1	Oenoferm Credo	4,5	+++	+++	+	+	±	-	7,0
2	Oenoferm Rouge		+++	+++	+	+	±	-	7,0
3	Saccharomyces uvarum 731		+++	+++	+	+	±	-	7,2
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		+++	+++	+	+	±	-	7,2
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		++	++	+	++	+	±	7,0
6	Kluyveromyces marxianus Y-303		-	+	++	+	-	-	9,2
1	Oenoferm Credo		+++	+++	+	+	±	-	5,5
2	Oenoferm Rouge		+++	+++	+	+	±	-	5,5
3	Saccharomyces uvarum 731		+++	+++	++	+	±	-	5,4

4	<i>Saccharomyces vini</i> Ркацители 6	5,0- 5,5	+++	+++	+	+	-	-	5,5
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp.		+	+	++	++	+	-	6,0
6	<i>Kluveromyces marxianus</i> Y-303		±	+	+++	+	-	-	6,0

Примечание: Брожение: (+++) – бурное, (++) – среднее, (+) – слабое, (±) – очень слабое, (-) – отсутствует. СВ% – содержание сухих веществ в конце брожения.

Показатели бродильной активности дрожжей рН = 5,0 и 5,5 идентичны. У первых четырёх штаммов в первые 2 суток наблюдалось бурное брожение, которое постепенно снижалось и исчезло на 5-6 сутки культивирования. Дрожжи под номерами 5 и 6 имели более низкую бродильную активность на соке топинамбура по сравнению с другими штаммами. Показатели рН 5,0-5,5 более благоприятно влияли на бродильную активность дрожжей по сравнению с более низкими значениями рН сред из сока топинамбура. Остаточное количество сухих веществ в бражке при сбраживании суслу дрожжами при рН 5,0-5,5 самое низкое, 36-40%.

На основании экспериментальных данных установлено оптимальное значение активной кислотности среды для достижения высокой бродильной активности дрожжей в соке топинамбура, которая находится в пределах рН 5,0-5,5.

Влияние температуры на рост и бродильную активность дрожжей. Температура культивирования является важным физическим фактором, влияющим на жизнедеятельность дрожжей и других микроорганизмов. Значение температуры состоит в том, что она влияет на активность ферментов клетки. Повышение температуры может привести к инактивации ферментов и необратимому прекращению биохимических процессов в клетке. Снижение температуры, наоборот, приводит к замедлению действия ферментов. При этом микроорганизмы могут

сохранять свою жизнеспособность и длительное время находиться в состоянии анабиоза.

Температура является одним из основных факторов, определяющих возможность и интенсивность развития микроорганизмов. Каждый микроорганизм может развиваться лишь в определённых пределах температуры. Для одних эти пределы узкие, для других – относительно широкие и исчисляются десятками градусов.

Для каждого микроорганизма различают три кардинальные точки: минимум – температура, ниже которой не происходит рост микроорганизмов, максимум – температура, выше которой рост не происходит, оптимум – наилучшая температура для роста микроорганизмов.

По отношению к температуре микроорганизмы подразделяются на три группы: психрофилы, мезофиллы и термофилы [119].

Психрофилы – холодолюбивые микроорганизмы хорошо растут при относительно низких температурах. Для них характерны: минимум в пределах от – 10 до 0°C, оптимум 10-15°C и максимум около 30°C. Термофилы, или теплолюбивые микроорганизмы, лучше развиваются при относительно высоких температурах. Температурный минимум для них не ниже 30°C, оптимум 55-65°C, максимум около 70-80°C.

Мезофилы – микроорганизмы, для которых температурный минимум около 5-10°C, оптимум 25-35°C, максимум в пределах 45-50°C. Дрожжи относятся к мезофиллам. Они живут и размножаются в ограниченных температурных границах и для нормальной жизнедеятельности им необходима температура 29-30°C. Максимальная температура для развития дрожжей 38°C, минимальная 5°C; при температуре 50°C дрожжи погибают.

Оптимальные температуры для развития и для проявления максимальной бродильной активности не всегда совпадают. Дрожжи, выращенные при температуре, например, 17-22°C имеют большую бродильную энергию. С повышением температуры процесса брожения

спирт всё в большей мере угнетает жизнедеятельность дрожжей. Поэтому, чем выше температура, тем раньше брожение начинается, интенсивнее протекает, но заканчивается с большим количеством остаточных сахаров. Скорость возникновения брожения в зависимости от температуры характеризуется данными, приведёнными в таблице 10 [118].

Таблица 10.

Скорость брожения в зависимости от температуры.

Температура, °С	Начало брожения через сутки, час	Количество образовавшегося спирта, %	Температура, °С	Начало брожения через сутки, час	Количество образовавшегося спирта, %
10	8	16,2	25	3	14,5
15	6	15,8	30	1,5	10,2
20	4	15,2	35	1	6,0

Определение оптимальной температуры роста, бродильной активности дрожжей и остаточного количества сухих веществ в бражке производили путём посева каждого штамма дрожжей в логарифмической фазе роста по 3% в осветлённый сок топинамбура с рН 5,5 и содержанием сухих веществ 20%. Посевы культивировали при температурах 15, 23-24, 28, 36°С в течение семи суток и ежедневно определяли рост, бродильную активность, а в конце культивирования остаточное количество сухих веществ в бражке. В таблице 11 приведены результаты исследований влияния температуры на бродильную активность дрожжей и остаточное количество сухих веществ в соке топинамбура.

Культуры дрожжей под номерами 1, 2, 3, 4 выращенные при 15°С в первые двое суток роста бурно сбразивали сусло топинамбура, затем на 3-5 сутки энергия брожения постепенно снижалась, на 6-7 сутки брожение

отсутствовало у трёх штаммов, а у *Saccharomyces vini* Ркацители 6 продолжалось очень слабое брожение. Низкая температура (15°C) оказала неблагоприятное влияние на развитие дрожжей под номерами 5-6, они слабо сбразивали сусло, а остаточное количество сухих веществ было довольно высоким 12%, в то же время у других дрожжей в бражке содержалось 7,5-9,5% СВ.

При 23-24°C все дрожжи кроме контроля под номером 6 в первые сутки культивирования хорошо сбразивали сусло топинамбура, постепенно их бродильная активность снижалась. На пятые сутки роста прекратилось брожение у *Saccharomyces uvarum* 731, но у других дрожжей даже через 7 суток в слабой или очень слабой степени проявлялась сбразивающая способность. Динамика роста *Kluveromyces marxianus* Y-303 отличалась от других штаммов дрожжей, бурное брожение их наступило на вторые сутки культивирования, а в другие дни наблюдалось слабое брожение. При температуре 23-24°C остаточное содержание сухих веществ в бражке довольно низкое – 36-46,6% от исходного содержания их в сусле топинамбура, большая часть которых сброжена дрожжами.

Таблица 11.

Влияние температуры на бродильную активность дрожжей в соке топинамбура.

№	Наименование дрожжей	t, °C	Длительность брожения, сутки							СВ, %
			1	2	3	4	5	6	7	
1	Oenoferm Credo	15	+++	+++	++	+	±	–	–	7,5
2	Oenoferm Rouge		+++	+++	++	+	±	–	–	8,0
3	<i>Saccharomyces uvarum</i> 731		+++	+++	++	+	±	–	–	8,0
4	<i>Saccharomyces vini</i> Ркацители 6		+++	+++	++	+	+	±	±	9,5
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp.		±	+	+	+	+	+	+	12,0
6	<i>Kluveromyces marxianus</i>		±	+	+	+	+	+	+	12,0

Y-303										
1	Oenoferm Credo	23- 24	+++	++	+	±	±	±	±	6,0
2	Oenoferm Rouge		+++	++	+	±	±	±	±	6,0
3	Saccharomyces uvarum 731		+++	+++	+	+	-	-	-	6,0
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		+++	+++	+	+	±	±	±	6,0
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		++	++	+	±	±	±	+	7,0
6	Kluveromyces marxianus Y-303		+	+++	+	+	+	+	+	7,0
1	Oenoferm Credo	28	+++	++	+	±	±	-	-	6,0
2	Oenoferm Rouge		+++	++	+	±	-	-	-	5,5
3	Saccharomyces uvarum 731		+++	++	+	±	-	-	-	6,0
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		+++	+	+	±	±	±	-	6,0
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		+++	+++	++	+	-	±	-	6,8
6	Kluveromyces marxianus Y-303		+++	+++	++	±	+	-	-	6,5
1	Oenoferm Credo	36	++	++	±	-	-	-	-	7,0
2	Oenoferm Rouge		++	++	±	-	-	-	-	7,0
3	Saccharomyces uvarum 731		++	++	±	-	-	-	-	10,0
4	Saccharomyces vini Ркацители 6		++	+	±	-	-	-	-	10,0
5	Saccharomyces cerevisiae sp.		++	+	±	-	-	-	-	10,0
6	Kluveromyces marxianus Y-303		++	±	+	-	-	-	-	8,0

Примечание. Брожение: (+++) – бурное, (++) – среднее, (+) – слабое, (±) – очень слабое, (-) – отсутствует. СВ% – содержание сухих веществ в конце брожения.

Для активного сбраживания сула топинамбура дрожжами температура **28-30°C** оказалась благоприятной. При этой температуре все испытуемые штаммы дрожжей в первые сутки культивирования бурно сбраживали сок топинамбура. В последние дни постепенно степень сбраживания постепенно снижалась, а через 7 суток прекратилось совсем.

Остаточное содержание сухих веществ в образцах бражки равнялось 40-45,3% СВ.

По литературным данным температурный максимум развития дрожжей составляет 40°C [119]. Поэтому для определения влияния высоких температур на изучаемые дрожжи, выбрали действие $t = 36^{\circ}\text{C}$. При этой температуре бродильная активность дрожжей была ниже по сравнению с предыдущими температурами, а остаточное содержание несброженных сухих веществ в бражке значительно выше, чем при более низких температурах развития дрожжей. По литературным данным оптимальная температура развития находится в пределах 28-30°C. Согласно полученных экспериментальных данных (таблица 11) в наших исследованиях также благоприятной температурой для биосинтеза этанола является 28-30°C, так как низкое содержание сухих веществ в бражке свидетельствует о лучшем биосинтезе этанола дрожжами на осветлённом соке топинамбура.

Таким образом, экспериментально установлены оптимальные параметры роста и бродильной активности отобранных путём скрининга перспективных штаммов дрожжей, для которых благоприятными оказались содержание сухих веществ в соке из клубней топинамбура в пределах 18-20% СВ, посевного материала дрожжей в количестве 3%, оптимальное значение активной кислотности среды находится в пределах рН 5,0-5,5, а самой благоприятной температурой для культивирования дрожжей является температура 28-30°C.

3.4. Получение опытных образцов этилового спирта из сока клубней топинамбура в лабораторных условиях и изучение их физико-химических показателей.

Перед постановкой опытов каждую культуру дрожжей отобранную для получения этанола из сока топинамбура активировали выращивая на стерильном солодовом сусле 8° Б, затем на втором этапе односуточные культуры в логарифмической фазе роста пересеивали в сок топинамбура, содержащем 10% сухих веществ, третий этап размножения дрожжей производили в соке топинамбура с 12–14% сухих веществ. Выращенные на последней среде односуточные дрожжи по 3% вносили в сок топинамбура с 20% СВ при температуре 30°С.

Для проведения экспериментов клубни топинамбура тщательно промывали водопроводной водой, очищали от кожуры, измельчали, пропускали через соковыжималку. Полученный сок фильтровали через ватно–марлевый фильтр и разливали по 1 л в 6 колб ёмкостью 1,5 л и стерилизовали при 0,05 МПа в течение 20 мин. В питательной среде из сока топинамбура было 20% сухих веществ.

Каждую из шести активированных односуточных культур дрожжей вносили по 3% в колбы со стерильным соком топинамбура. Посевы культивировали при экспериментально установленных оптимальных параметрах роста и бродильной активности отобранных путём скрининга перспективных штаммов дрожжей (см. раздел 3.3. данной работы) в течение 72 часов.

В течение трёх суток культивирования происходили морфологические изменения клеток в популяции дрожжей. Дрожжевая культура в зависимости от изменений, происходящих в среде, т.е. в разные фазы роста, приобретает морфологические возрастные изменения, которые изучали путём микроскопии живых клеток дрожжей, через 24, 48 и 72 часа культивирования. Различают молодые, зрелые и старые дрожжи.

В первые сутки культивирования обнаружены в основном **молодые дрожжи**. У них наблюдается тонкая оболочка, гомогенная протоплазма, вакуоли отсутствуют или только намечаются. Такие дрожжи интенсивно размножались, в состоянии почкования были около 70–80% клеток.

Молодые дрожжи наблюдаются в состоянии логарифмической фазы роста, хотя преобладают молодые, однако встречаются и старые дрожжевые клетки.

В 48-часовой культуре доминировали **зрелые** и старые дрожжи. Зрелые дрожжи характеризуются появлением зернистости в протоплазме, наличием больших вакуолей в клетках и замедленным размножением. Почкующиеся клетки в них составляли не более 10-15%. Признаком зрелых дрожжей является наличие в них гликогена – запасного питательного вещества клетки.

В 72-часовой культуре были в основном **старые** и мёртвые клетки дрожжей. Старые дрожжи отличаются утолщённой оболочкой, зернистой, гетерогенной цитоплазмой, крупными вакуолями. Иногда несколько вакуолей. В старых клетках есть жировые включения. Старая культура дрожжей не содержит гликогена и почти не размножается. Характерным признаком её является наличие большого количества мёртвых клеток. В мёртвых клетках цитоплазма собрана в комок в центре клеток. Она постепенно деформируется, оболочка распадается и клетка погибает. Старые были и в фазе зрелости.

За 3 суток культивирования в процессе брожения протекают три периода: взбраживание, главное брожение и дображивание в лабораторных условиях. В таблице 8 приведены физико-химические показатели сока топинамбура, сброженного различными расами дрожжей в течение трёх суток культивирования.

Результаты исследований показали, что кислотность сока топинамбура, сброженного различными расами дрожжей составила от 2,2 г/л до 2,8 г/л., рН сока находился в пределах 4,4–4,9.

Таблица 12.

Физико-химические показатели сока топинамбура, сброженного различными расами дрожжей.

№ обр.	Наименование дрожжей	Кислотность, г/л	рН	Сухие вещества, %	Этиловый спирт	
					масса %	% по отношению к контролю
1	Oenoferm Credo	2,3	4,5	6,2	8,7	174
2	Oenoferm Rouge	2,2	4,4	6,3	8,4	168
3	Saccharomyces uvarum 731	2,4	4,5	7,0	8,3	166
4	Saccharomyces vini Ркацители 6	2,5	4,6	7,4	7,9	158
5	Saccharomyces cerevisiae sp.	2,4	4,6	7,8	7,1	142
6	Kluuveromyces marxianus Y-303	2,8	4,9	12,9	5,0	100
7	Сок топинамбура без дрожжей	1,0	6,1	20	–	–

Примечание: *Kluuveromyces marxianus* Y-303 – контроль.

Хотя *Kluuveromyces marxianus* Y – 303 считается признанным перспективным штаммом для получения этанола из топинамбура во многих странах производящих спирт, в исследованиях выбранные нами штаммы значительно превосходят его по биосинтезу этанола из топинамбура.

Таким образом, лучшей культурой для получения этилового спирта из сока клубней топинамбура являются дрожжи *Oenoferm Credo*, которые образовали этанол на 74% больше, чем *Kluuveromyces marxianus* Y – 303. Следующая перспективная культура – *Oenoferm Rouge*, которая превосходит контрольную культуру по биосинтезу этанола на 68%. *Saccharomyces uvarum* 731, хотя считаются ароматобразующими пивными дрожжами, образовали спирт на 66% больше по сравнению с *Kluuveromyces marxianus* Y – 303. Дрожжи *Saccharomyces vini* Ркацители 6

и спиртовые *Saccharomyces cerevisiae* sp. по биосинтезу этанола превзошли контроль на 58% и 42%. Для сравнения см. таблицу 13.

Таблица 13.

Кислотность, pH, сухие вещества и этанол в соке топинамбура, сброженного различными видами дрожжей.

Наименование дрожжей	Кислотность, г/л	pH	Сухие вещества, %	Этиловый спирт	
				%	% по отношению к контролю
<i>Saccharomyces vini</i> Ркацители 6	2,4	4,5	6,9	7,9	144
Oenoferm Credo	2,5	4,4	5,6	8,8	161
Oenoferm Rouge	2,5	4,4	5,8	8,6	156
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> sp.	2,4	4,5	8,2	7,1	129
<i>Saccharomyces uvarum</i> 731	2,5	4,4	6	8,4	153
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y – 303	2,2	4,6	11,8	5,5	100
Сок топинамбура без дрожжей	1,0	6,1	20	–	–

Столь высокая активность биосинтеза этанола избранными пятью видами дрожжей при культивировании в соке клубней топинамбура, свидетельствует о наличии в их клетках инулиназы, трансфруктозидазы, β -фруктофуранозидазы и комплекса других ферментов, с различной степенью полимеризации, способствующих, ассимиляции дрожжами инулина.

Таким образом проведённые исследования влияния факторов внешней среды на дрожжи, образующие биоэтанол из сока топинамбура,

позволили установить оптимальные параметры роста и бродильной активности отобранных путём скрининга перспективных штаммов дрожжей, что позволило увеличить биосинтез этанола на 12-14% по сравнению с исследованиями проведёнными в 2015 г.

Выводы.

1. Исследована бродильная активность 14 штаммов различных рас дрожжей, из которых 5 видов: OenofermCredo, OenofermRouge, Saccharomycesvini Ркацители 6, Saccharomycescerevisiaesp., и Saccharomycesuvarum 731 хорошо росли в соке топинамбура и

сбраживали его лучше, чем стандартную среду – пивное сусло. Эти штаммы были отобраны для дальнейших исследований.

2. Изучена динамика роста отобранных дрожжей в соке топинамбура, содержащего 12% сухих веществ в течение 7 суток культивирования. В динамике развития дрожжей определяли физиологическое состояние клеток: количество молодых, зрелых, почкующихся, старых и отмерших клеток.
3. Установлены оптимальные параметры роста и бродильной активности перспективных штаммов дрожжей, для которых благоприятным оказалось содержание сухих веществ в соке из клубней топинамбура в пределах 18-20% СВ, количество посевного материала дрожжей 3%, оптимальное значение pH 5,0-5,5, а самой благоприятной температурой культивирования дрожжей является 28-30°C.
4. Для получения биоэтанола из сока клубней топинамбура лучшей культурой являются дрожжи OenofermCredo, которые образовали этанол на 74% больше, чем контроль - *Kluyveromyces marxianus* Y – 303. OenofermRouge также перспективен, превосходит контроль по биосинтезу этанола на 68%, а *Saccharomyces uvarum* 731 – на 66%. *Saccharomyces vini* Ркацители 6 и спиртовые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* sp. По биосинтезу этанола превзошли контроль на 58% и 42%.

Список использованной литературы.

1. Доклад президента республики Узбекистан Шавката Мирзиёева на расширенном заседании кабинета министров, посвящённым итогам

социально-экономического развития страны в 2016 году и важнейшим приоритетным направлениям экономической программы на 2017 год.

Газета /Народноеслово, №11 (6675), 16 января 2017г, с 1-4.

2. Технология спирта / В.Л.Яровенко, В.Л.Маринченко, В.А. Смирнов и др. Под ред. проф. В.Л. Яровенко. – М.: Колос – Пресс,2002. – 465 с.
3. Поляков В.А., Римарёва А.В., Ксандопуло Г.Б. Перспективные биотехнологические процессы для спиртовой промышленности // Производство спирта и ликёроводочных изделий.2002, №1. С. 6 – 8.
4. Понамарева М.С. Разработка комплексной технологии этанола из топинамбура на основе дифференцированных способов переработки сырья. Дисс... док. техн. наук. – Москва.: Московский гос. ун-т пищевых технологий, 2009. – 162с.
5. Варламов Г.П., Долгошеев А.М., Варламов А.Г., Зимин В.С. Технология и оборудование для глубокой переработки топинамбура: получение спирта // Тракторы и с/х машины – 1999. – №7. – с. 9 – 11.
6. Бархатов В.Ю., Мамедова Э.И., Рубан В.С. Способ гидролиза инулина топинамбура // Известия вузов. Пищевая технология. – 1998. - № 2- 3. – С.48–49.
7. Давидович С.С. Земляная груша. – М.: гос. изд-во с. – х. литературы, 1957. – 180 с.
8. Кочнев Н.К., Калинин М.В. Топинамбур – биоэнергетическая культура XXI века. М.: Изд-во АРЕС. 2002.–76 с.
9. Голубев В.Н., Мамонова Г.В. Сохранение качества клубней топинамбура / Хранение и переработка сельхозсырья. – 1997. –№ 12. – с.20–23.
10. Багаутдинова Р.И., Федосеева Г.П. Продуктивность и фракционный состав углеводного комплекса разных по скороспелости сортов топинамбура / Сельскохозяйственная биология. – 2000. – №1. – С.55–63.
11. Зеленков В.Н., Шаин С.С. Многоликий топинамбур в прошлом и настоящем. Новосибирск, 2000. – 241 с.
12. Мурзагулов К., М. Зурабов, Д. Мухамбетов, А. Аканов Изучение токсичности вытяжек из клубней топинамбура // Главный зоотехник, 2004 №2. С. 13–15.
13. Прокопенко Л.С., Юрченко Х.Ф. Химический состав и питательная ценность клубней топинамбура // Топинамбур и топинамбур – проблемы возделывания и использования: Тез. докл. III Всес. Науч.–произв. конф.– Одесса, 1991.– С. 59.

14. Вагабов М-З. В., З.М. Керимова, З. М-З. Мангуева и др. Интенсификации гидролиза инулинсодержащего сырья с целью получения этанола. // Хранение переработка сельхозсырья, 2006, №2. С. 43–45.
15. Вагабов М-З. В., З.М. Керимова, З. М-З., Малдыцева Т.В., Корнеева О.С. Применение ферментных препаратов с целью ускорения гидролизаинулина при производстве этилового спирта // Биотехнология 2005, №1. с. 34–36.
16. Корнеева О.С., Вагабов М-З. В., Керимова З-М. З, Мальцева Т.В. Использование инулинсодержащего сырья для получения спирта // Материал I Международной научно-практической конф. «Растительные ресурсы для здоровья человека (возделывание, переработка, маркетинг» Москва, 2002. С. 164–166.
17. Gibbons W.R. Batch and continuous solid-phase fermentation of Jerusalem artichoke tubers // J. Ferment. Technol. – 1989. – Vol. 67. – №4. – P. 258–265.
18. Chabbert N., Braun Ph., Guirand J.P., Arnoux M., Galzy P. Productivity and fermentability of Jerusalem artichoke according to harvesting date // Biomass–1983.–№3.–pp. 209–224.
19. Chabbert N., Guirand J.P., Arnoux M., Galzy P. The advantageous use of a early Jerusalem artichoke cultivar for the production of ethanol //Biomass.–1983. №8.–pp. 233–240.
20. Михалев А.А. Состояние и перспективы развития алкогольной отрасли // Производство спирта и ликероводочных изделий – 2001 – №3 – с. 4–5.
21. Чешинский Л.С. Рынок зернового сырья для производства спирта, пиво, напитки, 1999, №5. – С. 38–39.
22. Аксенов В.В., Ломова Т.Г. Перспектива использования топинамбура. Сборник II Международной научно-практической конференции «Пища, экология, качество», Краснообск 2002, с. 39–40.
23. Воронина Т.Ю., Рязанова Т.В. и др. Использование зерна злаковых культур для биохимической переработки (для производства пищевого этанола) // Сиб. экологич. журнал. – 1997. – Т. 4.–№5. –С. 515–519.
24. Казаков Е.Д., Кретович В.Л. Биохимия зерна и продуктов его переработки. –М. Агропромиздат. – 1989.– 368 с.
25. Кретович В.Л. Биохимия зерна и хлеба. –М.: Наука.–1991.–136 с.
26. Братерский Ф.Д. Ферменты зерна. –М: Колос, 1994.–196 с.
27. Голубев В.Н., Волкова Н.В., Кушалаков Х.М. Топинамбур – состав, свойства, способы переработки, области применения. –М.–1995.–82 с.

28. Бондарь М.В. Разработка технологии получения и сбраживания осветленного сусла при переработке зернового сырья на этанол. Автореф. дисс... канд. техн. наук. – Воронеж. – 1999. – 20 с.
29. Востриков С.В. Безотходная экологически безопасная технология получения этилового спирта // Производство спирта и ликероводочных изделий.– 2001.–№3. –С. 8–10.
30. Дубовицкий Ю.Е. Разработка комплексной технологии переработки зерн пшеницы на этиловый спирт и белковый продукт. Дисс... канд. техн. наук.–М.: 2003. –182 с. 3 –22 с.
31. Максимова Е.М. Разработка комплексной ресурсосберегающей технологии этанола на основе целенаправленного изменения реологических характеристики зерна. Дисс... канд. техн. наук. –М. –2001. –180 с.
32. Дарманьян Е.Б., Дарманьян П.М. Межмолекулярная ассоциация гемицеллюлозы и растительных белков // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31 С. 346–352.
33. Поляков В.А., Римарева Л.В. О научном обеспечении биотехнологии ферментных препаратов для перерабатывающих отраслей АПК // Хранение и переработка сельхозсырья. –2003. –№8. – С. 106–111.
34. Фурсов О.В., Анисеева Л.А., Кузовлер В.А. и др. Особенности ферментативного гидролиза крахмальных гранул зерна злаковых // Прикладная биохимия и микробиология. – 1990. –Т. 26. – Вып.3. – С. 371–377.
35. Saastamoinen M., Plaumi S., Rumpulainen J. Pentosan and β -glucan content of Finnish winter rye varieties as compared with rye of six other countries // J. Cereal Chem. – 1989. – V.10 – №3 – p. 199–207.
36. Vinkh C.J. A., Reynaert H.R., Grobet P.J., Delcour J. A. Physicochemical and functional properties of rye nonstarch polysaccharides. Variability in the structure of water-soluble arabinoxylans // J. Cereal Chem. –1993 – V.70 – №3 –p. 311–317.
37. Saibel W. Backtechnische Wirkung von Weizenkleberzusätzen in Weizenmehl // Getreide, Mehl und Brot. – 1985. – Н.39. – №8. – S.248–252.
38. Васильева Н.Я., Цурикова Н.В. и др. Сбраживание крахмалсодержащего сырья с применением ферментного препарата Целловеридин Г2х // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2001 – №4 – с.46–47.
39. Востриков С.В., Губрий Г.Г. и др. Влияние ферментного препарата Целлобранин Г3х на процесс получения и сбраживания осветленного зернового сусла термотолерантной расой дрожжей

- Saccharomyces Cerevisiae* Y-1986 // Изв. ВУЗов. Пищевая технология, 2001 – №2-3 – с. 59-61. 52.
40. Крикунова Л.Н. Разработка ресурсосберегающих технологий этанола из крахмало- и инулинсодержащего сырья на основе новых для спиртовой отрасли способов его переработки. Дисс... док. техн. наук. – Москва – 2008.–278 с.
41. Кошечкина В.Н., Емельянова Н.А. и др. Содержание и физико – химические свойства некоторых некрахмальных полисахаридов ржи. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1978. – №14. – С.5-7.
42. Лисовская Л.П., Николаев Б.А., Родченко Д.А. Исследование особенностей микроструктуры ржи. // Хранение и переработка зерна. – М.: ЦНИИТЭИ Минзага СССР. – 1980 – вып.4.
43. Рядчиков В.Г. Улучшение зерновых белков и их оценка. – М.: Колос.– 1978.–368 с.
44. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А. и др. Пищевая химия / Под. ред. А.П. Нечаева. – СПб.: Гиорд.–2003.–640 с.
45. Мюллер Г., Литц П., Мюнх Г.Д. Микробиология пищевых продуктов растительного происхождения // Пер. с нем. А.М. Квашникова // Под. ред. И.М. Грачевой. –М.: Пищевая промышленность, 1977.–343 с.
46. Wiczochek A. *Helianthus tuberosus* as a potential energy source // Acta aliment pol. – 1988.– V.14.– №2.–Рр. 115-122.
47. Казумов Н.Б., Казумян К.Н., Казумян Н.К., Казумян А.Н., Казумян Г.А. Безотходное производство спирта из амаранта. Пр-во спирта ликероводоч. изделий, 2007; N1.– С. 30-31.
48. Казумян Л. А., Н.Н. Казумян. Использование амаранта в производстве пищевого спирта и крепких напитков // Виноделие и виноградарство 2/2004 стр. 15-17.
49. Гунькина Н.И.; Фараджиева Е.Д., Саввин С.И., Горбунов В.Н. Изучение реологических свойств замесов для оптимизации водно-тепловой обработки тритикале. Всерос. науч. – произв. конф. «Интродукция нетрадиц. и ред. сельх. растений»: Материалы. – Пенза, 1998; Т.3. – С. 78-80.
50. Гунькина Н.И.; Фараджиева Е.Д. Оптимизация переработки тритикале., Пр-во спирта и ликеровод. изделий, 2002, №1 с. 16-17.
51. Фараджиева Е.Д., Гунькина Н.И. Применение новых сортов тритикале в производстве спирта // Первый международный симпозиум Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования.: Тез. докл. – Пущино, 1995.

52. Фараджиева Е.Д., Гончаров С.В., Горбунов В.Н. Перспективы использования зерна тритикале в бродильной промышленности Тритикале России. – Ростов н/Д, 2000. – С. 118–123.
53. Фараджиева Е.Д., Куршева И.Г., Савин С.И. Получение спирта из тритикале тонкого помола с оптимизацией процессов осахаривания и брожения // Известия вузов. Пищевая технология. – 1995. – №5–6. – С.44–45.
54. Джаруллаев Д.С. Новое сырье для производства спирта Пр-во спирта ликероводоч. изделий, 2002; N 1. – С. 38–39.
55. Джаруллаев Д.С. Универсальное и экономичное сырье – тутовник Пищ. промышленность, 2000; N 5. – С. 36.
56. Грачева И.М., Иванова Л.А., Кантере В.М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия. М.: Колос 1992, 384 с.
57. Залашко М.В., Капич А.Н., Милик Л.Т. Алкогольный напиток из молочной сыворотки, молочная промышленность, 1997 №3, с. 28.
58. Залашко М.В., Картель А.Н., Мишин Л.Т., Обьедков К.В. Этиловый спирт на основе молочной сыворотки // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2001.–№3. – С. 12–13.
59. Кравченко Э.Ф., Оносовская Н.Н., Перфильев Г.Д., Яковлева О.Я. Оптимизация технологических режимов получения этилового спирта и молочной сыворотки. Сыроделие и маслоделие, 2001; N5.– С. 36–39.
60. Лукерченко В.Н. Новый штамм дрожжей для сбраживания лактозы. Пищ. пром-сть, 2001; N 2. – С. 58.
61. Лукерченко В.Н. ЗАО «Конверсия» Молочная сыворотка – перспективное сырье для получения этилового спирта. Пищ. пром-сть, 2000; N 7. – С. 108–109.
62. Обьедков К.В., Оганезова И.А., Залашко М.В., Образцова Н.В., Капич А.Н. Производство этилового спирта из молочной сыворотки. // Междунар. науч. – практ. конф. «Энергоресурсосберегающие технологии перераб. с. – х. сырья»: Тез. докл.. – Минск, 1996; Ч.1 –С. 93–94.
63. Оносовская Н.Н.; Кравченко Э.Ф.; Эрвольдер Т.М. Особенности получения этилового спирта из молочной сыворотки. Науч.–теорет. конф. «Науч. основы прогрессив. технологий хранения и перераб. сельхозпродукции для создания продуктов питания человека»: Тез. докл.– Углич, 1995. – С. 322–323.
64. Храпцов А.Г., Нестеренко П.Г. Рациональная переработка и использование белково–углеводного молочного сырья. Молочная промышленность, 1998, с. 104.

65. Эйхе Э.П. Топинамбур или земляная груша М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1957 193 с.
66. А.С. 1347468 СССР. Способ получения фруктозного сиропа / К.А. Калунянц, Ф.Г. Нахлядов, Л.Н. Крикунова // Опубл. 22.11.1985 – № 12.
67. Голубев В.Н., Волкова И.В., Кумаланов Х.Н. Топинамбур: Состав, свойства, способы переработки и области применения. – М.: 1995. – 146 с.
68. Ellegard L., Anderson H., Bosseus I. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe or bile acids but in ileostomy subjects. // Euro J. Clin Nutr. – 1997. – Vol. – 51. – № 1. – P. 1–5.
69. Химический состав продукта топинамбура – <http://www.sunduk.ru/recepts/prods/p11384.htm> – 18.01.2006.
70. Патент. 91107958/ 14.06.05. Способ получения инулин – пектинового концентрата в порошке для медицинских и пищевых целей из свежего сырья / Самокиш И.И., Зяблицева Н.С., Компануев В.А. – 1997.
71. Фруктоза. <http://www.acrilat.kiev.ua/rus>.
72. Шувалова О. Целитель топинамбур. – СПб.: Невский проспект, 2001. I часть. – 128 с.
73. Болтасов Н.М. Земляные груши. – М., 1991, – 117 с.
74. Л.В. Катренко. Топинамбур. Источник полезного сахара. Издатель: Диля: 2005. – С. 128 с.
75. А.С. 1392105 СССР. Способ получения фруктозного сиропа из инулинсодержащего сырья. / Л.Д. Бобровник, И.С. Гулый, А.С. Ефимов // Опубл. 30.04.88. БИ. № 16.
76. Миронов Ю. Дикий подсолнух, он же топинамбур (электронный адрес: <http://наука.relis.ru/46/0209/46209118.htm>).
77. Решетник Л.А., Пракопьева О.В., Парфенова Е.О. Эффективность применения сухого порошка и сырых клубней топинамбура у детей с оксалатной нефропатией. / Микроэлементы в медицине. – 2001. – Т.2. – №2, с. 27–30.
78. Костромина Н.А. Химия координационных соединений. / Под. ред. Костроминой Н.А. – М.: Высш. школа, 1990. – 432 с.
79. Макаров К.А. Химия и медицина. – М.: Просвещение., 1981. – 442 с.
80. Шувалова О. Целитель топинамбур. – СПб.: – Невский проспект, 2001. – 158 с. II часть.
81. ВИТАМАКС XXI-век – Топинамбур – <http://vitamax.dp.ua/ingr-1408> – 04.12.2005.
82. Топинамбур – <http://agromage.com/bes-id.php.id=2611> – 21.01.2006.

83. Лапшина Т.Б., Александрова М. Н., Цевлев Н.И. Рост и развития топинамбура на дерново – глеевых и торфяно – перечнанных почвах Коми АССР. / Новые виды растений на Севере. – 1980. – С. 76–89.
84. Кривицкая Е.И. Перспективы использования порошка топинамбура для профилактики заболеваний органов пищеварения // Тез. докл. Всесоюз. науч. – производ. конф. – М.: 1990. – 244 с.
85. Прокопенко А.С., Юрченко Х.Ф. Химический состав и питательность клубней топинамбура. // Тез. докл. Всесоюз. науч. – производ. конф. – Одесса, 1991. – 134 с.
86. Климацкая Л.Г., Куркатов С.В. Особенности среды обитания и здоровья населения Красноярского края. – Красноярск: Издательство Красноярской государственной медицинской академии, 2002. – 91 с.
87. Кахана Б.М., Арасимович В.В. Биохимия топинамбура. / Б.М. Кахана, В.В. Арасимович. – Кишинев, 1974. – 79 с.
88. Тезисы докладов участников третьей Всесоюзной научно – производственной конференции «Топинамбур и топинамбур – проблемы возделывания и использования». – Одесса: Маяк, 1991. – 127 с.
89. Шаин С.С. Топинамбур: новый путь к здоровью и красоте. / С.С. Шаин. – М.: ЗАО «Фитон», 2000. – 128 с.
90. Химический состав продукта топинамбура – http://avtorneizvesten.ru/spravochnaya_kniga/topinambur/index.html.
91. Инулин. <http://samsay.ru/narodrasti/914-topinambur-ili-zemlyanayagrusha-inulin-s-gryadki.html>.
92. Шаин С.С. Топинамбур: новый путь к здоровью и красоте. / С.С. Шаин. – М.: ЗАО «Фитон+», 2002. – 158 с.
93. Акулов Н.И., Леденев В.П. О производстве биоэтанола в России Ликероводочное производство и виноделие. 2005, № 10. с. 4–5.
94. Горохов Г.И. Исследование закономерностей процесса механической деструкции трудногидролизующих полисахаридов растительных материалов. Автореф. дис. канд. техн. наук. – Л., 1966. – 18 с.
95. Павенский И.С. Производство и применение этанола за рубежом // производство спирта и ликероводочных изделий. 2001, №1. с. 29.
96. Поляков В.А., Леденёв В.П., Туршатов М.В., Кривченко В.А., Моисеева Н.Д. Рожь – эффективное сырье для производства спирта и биоэтанола // Аграрная наука Евро–Северо–Востока / Сев. – Вост. науч. – метод. центр. Россельхозакадемии, 2008; N 11. – С. 258–263.
97. Рейнгарт Э.С., Кочнев Н.К., Пономарева А.Г., Звягинцев П.С. Перспективы использования топинамбура для производства биоэтанола // Достижения науки и техники АПК, 2008, №1. с. 38–40.

98. Рейнгарт Э.С., Кочнев Н.К., Пономарева А.Г. Топинамбур: выращивание, уборка, получение биоэтанола // Сельский механизатор, 2008, №11. с. 45–47.
99. Рейнгарт Э.С., Кочнев Н.К., Пономарева А.Г. Топинамбур: выращивание, уборка, получение биоэтанола // Сельский механизатор, 2008, №12. с. 38–39.
100. Рейнгарт Э.С., Кочнев Н.К., Пономарева А.Г. Топинамбур: выращивание, уборка, получение биоэтанола // Сельский механизатор, 2009, №1. с. 15–18.
101. Римарева Л.В. Микробные ферментные препараты в спиртовом производстве // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2002. – №4. С. 27–31.
102. Жуков В.К., Шахтарина Е.В. Использование топинамбура для получения энергосистем // Материалы международной научно–техн. конф. «Аграрная энергетика в XXI веке» Минск, 2001. с. 199–202.
103. Голубев В.Н., Гончаров Н.И., Куев В.Л., Беленькая И.Р. Влияние температуры на механохимическую экстракцию инулина в технологии получения глюкозо–фруктозных сиропов из клубней топинамбура // Проблемы влияния тепловой обработки на пищевую ценность продуктов питания: Тез. докл. Всес. науч. техн. конф. – Харьков. – 1990. – С. 244.
104. Кисникаткин С.А., Денисов А.А. Промышленная переработка топинамбура. Сборник материалов научно–практ. конф. «Проблемы АПК и пути их решения. Совершенствование ресурсосберегающих технологий и технических средств производства сельскохозяйственной продукции» Пенза, 2003. с. 113–116.
105. Кулиненко Д.О., Шакир И.В.; Панфилов В.И.; Манаков М.Н. Комплексная переработка топинамбура с получением инулина // Пряно–аромат. лекарств. растения: перспективы интродукции и использ. – Минск, 1999. – С. 51–52.
106. Кондратенко В.В., Купин Г.А., Шаззо Р.С., Екутеч Р.И. Комплексная переработка топинамбура на продукты питания функционального назначения. Инновационные технологии в области холодильного хранения и переработка пищевых продуктов, 2008. – С. 132–133.
107. Пащенко Л.П. Рациональные аспекты в переработке топинамбура // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1999. – №7 – С. 13–17.
108. Пащенко Л.П., Мустафьев Р.М. Биоконверсия экстрактов из топинамбура в получении высокофруктозных сиропов // Топинамбур – проблемы возделывания и использования: Тез. докл. III Всес. науч. – произв. конф. – Одесса, 1991. – С. 133–134.

109. Калашнова Т.В., Курлаева М.И. Безотходная переработка клубней топинамбура. Инновационные технологии в пищевой промышленности Пятигор. гос. технол. ун–т. – Пятигорск, 2008. – С. 171–175.
110. Воробьев Г.И., Сушкова В.И. Безотходное производство спирта и кормовых белковых продуктов из топинамбура // Всероссийская научно–практ. конференция с международным участием «Пищевая промышленность: интеграция науки, образования и производства» 2005. с. 118–120.
111. Бобрик Л.Д., Гулий И.С., Лужко Г.А. Использование высоко–низкотемпературного гидролиза для получения фруктозы из топинамбура // Топинамбур и тописолнечник – проблемы возделывания и использования: Тез. докл. ПВсес. конф. –Иркутск, 1990. – С.22.
112. Фурманова И. Б. Разработка малоотходной технологии фруктозного сиропа и топинамбура. Автореф. дисс... канд. техн. наук. – М. – 1990. –25 с.
113. Василик О.И., Ремесло Н.В. и др. Анализ, строение и изменение растительной ткани топинамбура при воздействии технологических параметров // Разработка и внедрение высокоэффективных ресурсосберегающих технологий оборудования и новых видов пищевых продуктов в пищевых перерабатывающих отраслях АПК: Тез. докл. науч.–техн. конф. – Киев, 1991. – С. 161–162.
114. Голубев В.Н., Куев В.Л., Гончаров Н.И. Биотехнологические аспекты переработки топинамбура // Пищевая промышленность. – 1991. – №9. – С. 52–53.
115. Калунянц К.А., Рогов С.И., Фурманова И.Б. Влияние дезинтеграторной обработки на степень гидролиза инулинсодержащего сырья. Совершенствование технологических процессов производства новых видов пищевых продуктов и добавок: Тез. докл. Всес. конф. мол. учен. и спец. – Киев 1989. – С. 26. Калинина О.А. Разработка ресурсосберегающей технологии получения этанола из зерна ржи. // Дис... канд. техн. наук. – М.– 2002. – 144 с.
116. Dissertation Abstract international. – 1988. – Vol. 49. – №3. – p.609.
117. Biotechnology and Bioengineering. – 1988. – Vol. 31.–№7. –p.705–710.
118. Бурьян Н.И. Микробиология виноделия – Ялта, 1997. – 432 с.
119. Мудрецова – Висс К.А. Микробиология. Изд–во «Экономика». М., 1985. – 256 с.
120. Шлегель Г. Общая микробиология. М., «Мир». 1987. – 567 с.
121. Практикум по микробиологии. / Под ред. Е.Н. Егорова – М.: МГУ. – 307 с.

122. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Московский университет, 1995. – 222 с.
123. Лерина И.В., Педенко А.И. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. – М.: Экономика, 1980. – 152 с.
124. Асонов Н.Р. Практикум по микробиологии – М.: Агропромиздат, 1988. – 156 с.
125. HakimovaSh.I. Oziq – ovqatmikrobiologiyasi. – Toshkent: «O`zbekiston» nashriyotijodiyuyi, 2005. – 304 b.
126. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. / А.И. Нетрусов [и др.] М.: Издательский центр «Академия», 2005.
- 127.Полыгалина Г.В. Технологический контроль спиртового и ликероводочного производств. – М.: Колос, 1999. – 336 с.
128. Мальцева Т.В. β – фруктозидаза дрожжей *Kluuveromycesmarxianus*Y – 303, препаративное получение, свойства и применение в биотехнологии: Дис... канд. биол. наук. – Воронеж: Воронежская гос. технол. академия, 2003.
129. Пономарева М.С., Ильяшенко Н.Г., Шабурова Л.Н. Выбор способа предобработки топинамбура для ферментации в пищевой этанол. // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2007. – №4. – с. 10–12.
130. Керимова З.М., Мангуева М.–З., Ихласова Б.И., Мурзаева П.Д. Исследование влияния различных рас дрожжей на продукты биосинтеза этанола из топинамбура. // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2008. – №1. – с. 22–23.
131. Александрова М.М. Разработка энерго– и ресурсосберегающей технологии этанола из топинамбура // Дисс. канд. техн. наук. – М., 2001. – 138 с.
132. Арабидзе Г.В. Биохимические особенности дрожжей вида *S. uvarum*, //Прикладная биохимия и микробиология. – 1968. – №5. – с. 603–606.
133. Володин В.В., Брусов О.А. Углеводный состав клубней *Helianthustuberosus*L / Матер. науч. конф. посв. 30–лет. Институтабиологии, 1992. – С.9.
134. Brown M.L. Some effects of wort composition on the rate and extent of fermentation by brewing yeast J.Inst. Brew., 1972, 78. №1, p. 51-57.
135. Жвирблянская А.Ю., Исаева В.С. Дрожжи в пивоварении. – М.: Пищевая промышленность. 1979. – с.248.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Список опубликованных работ

1. **Хамидов А.Ф.**, Таджибаева Н.Н., Хакимова Ш.И., Саидходжаева М.А. Изучение динамики роста и сбраживающей активности дрожжей в соке топинамбура. // Актуальные вопросы в области технических и социально-экономических наук: Республиканский межвузовский сб. науч. трудов. часть 1. – Ташкент, 2017. - С. 281-282.
2. **Хамидов А.Ф.**, Кадырова М.Т., Хакимова Ш.И., Аширбаева М.П. Изучение и отбор различных рас дрожжей, активно сбраживающих сок топинамбура. // Актуальные вопросы в области технических и

социально-экономических наук: Республиканский межвузовский сборник научных трудов. – Ташкент, 2016. - С. 140-141.