

# СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОЭТАНОЛА ИЗ ВИНОГРАДНОЙ ВЫЖИМКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

THE CURRENT STATE AND WAYS  
TO IMPROVE THE PRODUCTION  
OF BIOETHANOL FROM GRAPE POMACE  
USING YEAST *SACCHAROMYCES*  
*CEREVISIAE*

Z. Jamalov  
R. Kemlarov

**Summary.** Bioethanol production from agricultural waste is an alternative to fossil fuels. Grape pomace is the most common sediment in the world, including in Uzbekistan. Whether strong yeast with high resistance to inhibitors is necessary for the production of lignocellulose bioethanol is still unknown. It has been established that these stressors significantly hinder the growth of crops and the productivity of fermentation. Due to the limited amount of nutrients, exposure to sunlight, temperature fluctuations and low acid and ethanol content, grape by-products were chosen as an extreme environment for the search for strong natural yeast. A bio-processing plant for the processing of grape by-products can become a short-term solution for the clean, efficient and cost-effective production of bioethanol and value-added products.

**Keywords:** biofuels, bioethanol, pomace, yeast, fermentation, strains, hydrolysis, processing, lignocelluloses, glucose.

**Джамалов Зоҳид Зафарович**

Аспирант, Казанский Федеральний университет  
z.djamalov@mail.ru

**Кемалов Руслан Алимович**

К.т.н., Казанский федеральный университет  
kemalov@mail.ru

**Аннотация.** Производство биоэтанола из сельскохозяйственных отходов является альтернативой ископаемому топливу. Виноградный выжимка — самая распространенный осадок в мире, в том числе в Узбекистане. Необходимы ли крепкие дрожжи с высокой устойчивостью к ингибиторам, для производства лигноцеллюлозного биоэтанола, еще неизвестно. Установлено, что эти стрессоры значительно препятствуют росту сельскохозяйственных культур и продуктивности ферментации. Из-за ограниченного количества питательных веществ, воздействия солнечных лучей, колебаний температуры и низкого содержания кислоты и этанола виноградные субпродукты были выбраны в качестве экстремальной среды для поиска крепких натуральных дрожжей. Биоперерабатывающий завод по переработке виноградных субпродуктов может стать краткосрочным решением для чистого, эффективного и рентабельного производства биоэтанола и продуктов с добавленной стоимостью.

**Ключевые слова:** биотоплива, биоэтанол, выжимка, дрожжи, ферментация, штаммы, гидролиз, переработка, лигноцеллюлозы, глюкоза.

## Введение

**Т**ранспортный сектор является крупнейшим в мире источником выбросов парниковых газов из-за его высокой зависимости от ископаемого топлива. Хотя ископаемое топливо удовлетворяет наши потребности в энергии, его вклад в изменение климата в результате выбросов парниковых газов является глобальной дилеммой. Снижение зависимости от невозобновляемых источников энергии и сокращение выбросов парниковых газов являются двумя основными преимуществами. Биоэтанол является привлекательной альтернативой нефтяному топливу благодаря своим многочисленным преимуществам. Использование возобновляемого топлива в этом секторе для достижения нейтральности выбросов парниковых газов является неизбежным решением для устойчивых и экологически чистых источников энергии. Однако для того, чтобы биоэтанол был конкурентоспособным по срав-

нению с невозобновляемыми источниками топлива, необходимо преодолеть множество препятствий. Использование возобновляемого топлива в этом секторе для достижения нейтральности выбросов парниковых газов является неизбежным решением для устойчивых и экологически чистых источников энергии. Одним из наиболее важных препятствий является продовольственная безопасность.

Биоэтанол первого поколения, полученный из пищевых культур, таких как кукуруза, рис, ячмень, картофель, сахарный тростник и другие крахмалистые пищевые культуры. Однако для того, чтобы биоэтанол мог конкурировать с невозобновляемыми источниками топлива, необходимо преодолеть множество препятствий. Биоэтанол второго поколения с использованием несъедобной, недорогой и обильной лигноцеллюлозной биомассы, такой как древесная и травянистая биомасса, лесные остатки, промышленные и сельскохозяйствен-

ные отходы и другие непродовольственные культуры. Биоэтанол второго поколения с использованием непищевой, недорогой и обильной лигноцеллюлозной биомассы, такой как древесная и травянистая биомасса, лесные остатки, промышленные и сельскохозяйственные отходы, включая виноградные выжимки и другие непищевые культуры в качестве сырья для решения проблемы соотношения продуктов питания и топлива, связанной с использованием пищевого сырья.

Производство биоэтанола из агропромышленных отходов также является подходящей альтернативой как было ранее упомянуто, учитывая необходимость замены ископаемого топлива. Виноградный шрот является остатком суслу и виноделия и является одним из наиболее распространенных остатков в мире. В соответствии с постановлением ПП-5200 «Постановление президента республики Узбекистан О дополнительных мерах по внедрению кластерной системы в развитие виноградарства, государственной поддержке привлечения передовых технологий в данную сферу», к 2022 году в Узбекистане планируется засеять 181 000 га виноградников. Ожидается, что на виноградниках будет собрано около 2 миллионов тонн винограда, что составляет 400 тыс. тонн виноградной выжимки [9]. Среди прочего, было предложено его использование для производства биоэтанола. С другой стороны, экспериментальные анализы, проведенные на кафедре технологии нефти, газа и углеродных материалов Казанского федерального университета, показывают, что виноградная выжимка является подходящей сырьём для производства биоэтанола путем прямого брожения (без предварительного гидролиза) его сахаров (сахарозы). Прямая ферментация имеет преимущество с точки зрения затрат на производство этанола по сравнению с процессами, в которых в качестве сырья используется крахмал или целлюлоза.

Лигноцеллюлоза является одним из основных источников возобновляемого органического сырья на планете и обладает свойствами, которые очень трудно разлагать. В основном это связано с присутствием лигнина, сложного биополимера с неправильной структурой смеси моно и ароматических олигомеров. Отходы лигноцеллюлозной биомассы (стебли зерна, древесная щепа, солома и т.д.) в основном выбрасываются из целлюлозно-бумажной промышленности и сельскохозяйственной промышленности, и успех обработки лигноцеллюлозой в основном зависит от ее пригодности для вторичной переработки, поэтому в настоящее время ее обработка крайне необходима. В настоящее время в основном проводится модификация (разложение) лигнина. В настоящее время лигноцеллюлозная биомасса подвергается в основном химической обработке (сульфатный метод, сульфитный метод и т.д. в целлюлозно-бумажной промышленности), что приво-

дит к значительному разрушению окружающей среды. В рамках перехода к «зеленой технологии», биоремедиации, важно найти альтернативы химическим методам.

В настоящее время мезофильные дрожжи используются для производства биоэтанола. Наиболее желательными дрожжами являются термофильные дрожжи, ферментирующиеся при температурах 40 °C или выше, поскольку это снижает затраты на перекачку и охлаждение, а также обеспечивает эффективное осахаривание. Кроме того, грибы являются основными разлагателями биомассы лигноцеллюлозы в природных экосистемах, а базидиомицеты составляют более 90% продуктов распада лигноцеллюлозы. *Trametes hirsuta* 072 эффективно расщепляет лигнин.

### Экспериментальная часть

Продукцию этанола *Saccharomyces cerevisiae* Fm17 и эталонными дрожжами 27P сравнивали с продукцией азотистых дрожжей с добавлением коктейля ингибиторов (табл. 1) в комбинации глюкозы (100 г/л) и ксилозы (50 г/л). Штаммы Fm17 и 27P, которые показали высокие выходы этанола при 25 °C и 40 °C, были отобраны в качестве наиболее устойчивых к ингибиторам изолятов и в качестве эталонных штаммов (табл. 2) [9]. Было показано, что Fm17 является одним из наиболее устойчивых к ингибиторам штаммов. Наиболее термостабильны среди исходных 40 штаммов (табл. 1). Эти эксперименты проводились при температуре, близкой к оптимальной температуре эталонных дрожжей, то есть 30 °C, чтобы более четко показать разницу в производительности между двумя штаммами. Во-первых, два Дрожжа, коктейль а, приготовленный путем увеличения концентрации каждого ингибирующего соединения, как описано выше, В, С, оценивали на их ферментативную способность в присутствии D (табл. 3) [9]. В присутствии коктейлей а и в характеристики ферментации *Aspergillus oryzae* были сходными, при этом объемная емкость и скорость потребления глюкозы в целом были выше, чем в контрольной среде (без ингибиторов) (табл. 1). Вероятно, это связано с присутствием слабой кислоты, присутствующей в смеси., который, как известно, увеличивает скорость ферментации при низких концентрациях (менее 100 ммоль/л) [3]. С другой стороны, в коктейле С с общим содержанием слабых кислот, близким к 187 ммоль / л, fm17 достиг объемной продуктивности, эквивалентной продуктивности дрожжевого бульона с контролируемым добавлением азота, тогда как продуктивность контрольного штамма 27P была вдвое меньше, чем у бульона без ингибиторов. и что Fm17 достиг объемной продуктивности, эквивалентной продуктивности дрожжевого бульона с контролируемым добавлением азота, тогда как продуктивность контрольного штамма 27P была вдвое меньше, чем

Таблица 1. Влияние на коктейль синтетических ингибиторов и препараты лигноцеллюлозных гидролизатов, подаваемых в различных концентрациях, на эффективность ферментации в присутствии 100 г / л глюкозы и 50 г/л ксилозы при 30 °С.

Штаммы	Коктейль с ингибитором <sup>а</sup>	Объем употребления глюкозы после 48 ч, г/л/ч	$Q_{48ч}$ г/л/ч	$q_{48ч}$ г/г/ч	$Y_{X/G}$ г/г	$Y_{E/G}$ г/г	Высокая концентрация этанола, г/л
Fm 17	0% ГСТ	2,24 <sup>b</sup>	0,93 <sup>b</sup>	НО	НО	0,49 (96%)	48,8
	25% ГСТ	2,38 <sup>b</sup>	1,02 <sup>b</sup>	НО	НО	0,47 (92%)	47,6
	50% ГСТ	1,76 <sup>b</sup>	0,70 <sup>b</sup>	НО	НО	0,45 (89%)	43,4
	75% ГСТ	0,53 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	НО	НО	0,42 (82%)	18,6
	100% ГСТ	-	-	-	-	-	-
27P	0% ГСТ	2,28 <sup>b</sup>	0,95 <sup>b</sup>	НО	НО	0,48 (94%)	47,7
	25% ГСТ	2,38 <sup>b</sup>	1,04 <sup>b</sup>	НО	НО	0,44 (86%)	44,0
	50% ГСТ	1,12 <sup>b</sup>	0,46 <sup>b</sup>	НО	НО	0,42 (83%)	40,6
	75% ГСТ	0,19 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	НО	НО	0,24 (46%)	2,4
	100% ГСТ	-	-	-	-	-	-
Fm 17	нет	1,73	0,88	0,34	0,027	0,49 (97%)	49,4
	A	2,07	1,01	0,31	0,030	0,49 (95%)	48,6
	B	2,06	1,00	0,30	0,031	0,48 (94%)	47,9
	C	1,89	0,87	0,31	0,030	0,47 (92%)	47,1
	D	0,24	0,07	0,11	0,009	0,46 (90%)	19,0
27P	нет	1,68	0,88	0,29	0,026	0,49 (95%)	48,9
	A	2,07	1,02	0,30	0,029	0,48 (95%)	48,3
	B	2,04	0,97	0,31	0,029	0,47 (92%)	46,7
	C	0,92	0,43	0,22	0,027	0,45 (88%)	45,0
	D	0,02	0,01	0,02	0,003	0,29 (58%)	0,3

НО, не определено; ГСТ, гидролизат сахарного тростника;  $Q_{48ч}$ , объемная производительность через 48 ч;  $q_{48ч}$ , удельная производительность через 48 ч;  $Y_{X/G}$ , выход биомассы через 72 часа на исходной глюкозе;  $Y_{E/G}$ , выход этанола на грамм потребляемой глюкозы рассчитан на основе наибольшего производства этанола (процент теоретического максимума указан в скобках).

<sup>а</sup>Комбинация 100 г/л глюкозы и 50 г/л ксилозы использовалась для дополнения бульона дрожжевых азотистых основ без ингибиторов (в таблице указано как «нет» или «0% ГСТ»).

<sup>б</sup>Параметр определяется после 42 ч.

у бульона без ингибиторов. продуктивность Fm17 также была вдвое ниже, чем у дрожжевого бульона с контролируемым добавлением азота. Устойчивость к Fm17 была еще более выражена в коктейле D с большинством ингибиторов (табл. 1). Концентрация этанола достигла 19 г/л, но удельный выход составил 0,11 г/г / ч и был в 3 раза ниже, чем у дрожжевого бульона на основе азота без добавления ингибиторов.

Считается, что повышенная ферментативная способность селективных дрожжей Fm17 в коктейле C связана с более выраженной способностью превращать фурфурол и 5-гидроксиметилфурфурол по сравнению с эталонным штаммом 27P (рис. 1).

Эти дрожжи снижали уровни фурфурола до более низких уровней 5-гидроксиметилфурфурола, что согласуется с предыдущими исследованиями [4].

Более того необходимостью было подтверждение более сильных фенотипов устойчивости к фурфуролу в *Saccharomyces cerevisiae* Fm17, и об этом нам говорит снижение содержания данных соединений в гораздо большей степени в токсичном коктейле D (рис. 1b). По прошествии 72 часов культивирования штамм Fm17 снижал концентрацию фурфурола и 5-гидроксиметилфурфурола в коктейле D до 9% от начальной концентрации, но 27P не вызывал значительного превращения фуранов (рис. 1b). С другой стороны, более быстрое превращение ингибиторов Fm17 по сравнению с 27P указывает нам на способность штамма Fm17 метаболизировать компоненты фурана для улучшения. Альтернативой этому быстрому превращению может быть итог большой скорости метаболизма Fm17, который свидетельствует о значительно более высоком выходе биомассы после 72 часов и достаточно более высокого объема поглощения глюкозы через 48 часов (табл. 1).

Таблица 2. Влияние слабых кислот и фуранов на рост дрожжей в среде пептон-декстрозы при pH 4,5 (добавление глюкозы 20 г/л), недавно выделенных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, наиболее устойчивых к ингибиторам, и наиболее устойчивых эталонных дрожжей 27P.

Ингиби-торы	Штаммы <i>Saccharomyces cerevisiae</i>							Концентрации	
	Fm90	Fm64	Fm17	Fm89	Fm38	Fm12	371 <sup>ab</sup>	г/л	ммоль/л
Муравьи-ная к-та НСООН	93	92	94	94	90	91	99	0,61	13
	91	92	94	91	90	91	93	1,22	27
	89	90	91	89	88	89	89	1,83	40
	86	87	90	87	83	86	85	2,44	53
Уксусная к-та CH <sub>3</sub> COOH	89	98	99	96	95	96	99	1,80	30
	88	96	96	92	87	90	89	3,60	60
	83	89	92	90	84	88	86	5,40	90
	80	88	91	85	78	87	82	7,20	120
Молочная к-та CH <sub>3</sub> СНОНСООН	100	100	100	100	100	100	100	1,72	19
	100	100	100	100	100	100	100	3,45	38
Фурфурол	100	100	100	100	99	100	100	5,17	57
	100	100	100	100	96	100	99	6,89	76
	90	95	93	90	94	90	92	0,69	7
	74	91	89	85	90	84	88	1,38	14
5-гидрокси-ме- тил-фурфурол	52	87	86	58	61	77	67	2,08	22
	29	51	60	39	28	0	12	2,77	29
	91	82	91	87	90	92	87	0,94	7
	87	77	81	70	80	90	84	1,86	15
Коктейль <sup>c</sup>	79	69	78	59	75	84	73	2,81	22
	70	35	73	48	64	74	48	3,75	30
A	82	87	91	88	90	80	83	-	-
B	63	70	80	72	70	70	65	-	-
C	52	63	71	60	55	51	35	-	-
D	0	0	0	0	0	0	0	-	-

<sup>a</sup>Значения представлены в виде относительной оптической плотности роста (%), измеренной для каждого штамма после 40 часов роста азотных дрожжей без ингибиторов, и представляют среднее значение за 3 итерации. Стандартная ошибка всегда была менее 4% (не показана). Значения выше 90 выделены жирным шрифтом, а значения ниже 50 выделены курсивом.

<sup>b</sup>Контроль деформации.

<sup>c</sup>Информацию о ингибиторах в коктейле для компостирования см. в таблице 3.

Fm17 производил почти 0,46 г этанола на 1 г глюкозы (теоретический выход 90%) в коктейле D, демонстрирующем самые тяжелые условия, и показал наиболее многообещающий выход этанола из всех протестированных коктейлей (табл. 1). Это преимущество было очевидным по сравнению с контрольным штаммом 27P. Было высказано предположение, что выход биомассы обеих дрожжей в конце ферментации был выше в бульоне, содержащем ингибиторы дрожжей на основе азота, за исключением D-коктейля, чем в дрожжевом бульоне на основе азота без добавления ингибитора, и что фуран и слабая кислота достигли высокой концентрации. Это могло бы оказать благотворное влияние на производство биомассы.

Удивительно, но в присутствии каждого коктейля ингибиторов у обеих дрожжей были обнаружены более низкие количества глицерина и ксилита по сравнению с уровнями, наблюдаемыми в контроле без ингибиторов с добавлением азотистого основания дрожжей. И фурфурол, и 5-гидроксиметилфурфурол метаболизировались в обеих дрожжах (Рис. 1), и не было различий в концентрации жирных кислот, что позволяет предположить, что фуран воздействовал, как иной акцептор электронов в процессе ферментации и что образование ксилита не было обнаружено, была соответственно удалена. Считается, что низкая выработка глицерина обусловлена тем фактом, что регенерация фурфурола до фурфурилового спирта преимущественно глицери-

Таблица 3. Состав коктейлей с синтетическими ингибиторами, добавляемыми для дополнения азотистой основы дрожжевых бульонов

Ингибиторы	Коктейли			
	A	B	C	D
Муравьиная кислота (HCOOH)	0,61	1,22	1,83	2,44
Уксусная кислота (CH <sub>3</sub> COOH)	1,80	3,60	5,40	7,20
Молочная кислота (CH <sub>3</sub> CHOHCOOH)	1,72	3,45	5,17	6,89
Фурфурол	0,69	1,38	2,08	2,77
5-гидрокси-метилфурфурол	0,94	1,86	2,81	3,75

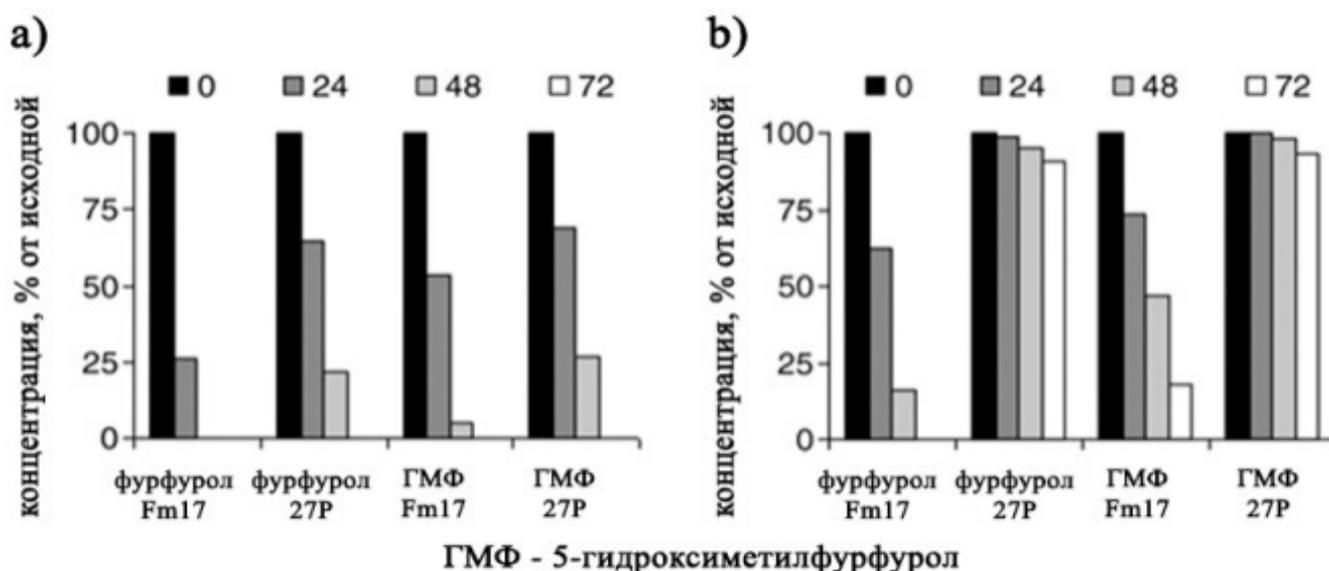


Рис. 1. Фурфурол и 5-гидроксиметилфурфурол их конверсия после 0, 24, 48 и 72 часов ферментации штаммами *Saccharomyces cerevisiae* Fm17 и 27P в присутствии коктейлей ингибиторов. а) коктейль С и б) коктейль D. эксперименты проводились в трех экземплярах. Стандартная погрешность всегда была менее 4%.

на в качестве окислительно-восстановительного поглотителя для метаболизма дрожжей [4, 6, 11].

## Результаты

Характеристики ферментации штаммов *Saccharomyces cerevisiae* Fm17 и 27P в азотных дрожжах с добавлением гидролизата целлюлозы сахарного тростника. В лигноцеллюлозных гидролизатах и синтетических коктейлях ферментативные свойства дрожжей могут различаться из-за ингибирующего действия других вредных соединений, которые невозможно идентифицировать или определить количественно, даже если основные ингибиторы гидролиза имеют одинаковый состав [1]. Основная цель этого исследования заключалась в выделении, скрининге и характеристике нового

штамма *Saccharomyces cerevisiae* для коммерческого производства биоэтанола второго поколения на основе стойкости и сильных характеристик ферментации. Таким образом, гидролизат гемицеллюлозы, полученный из газа сахарного тростника, обработанного паром, использовался в качестве ингибирующего сырья. Данное сырье считается одним из наиболее популярных источников лигноцеллюлозы в мире, и при предварительной обработке паром [2, 10], одним из наиболее распространенных методов предварительной обработки, оно обеспечит условия, характерные для выработки биоэтанола во всем мире. Гидролизаты гемицеллюлозы, получившиеся в пост предварительной обработке водяным паром при 200 °C в временном промежутке 10 минут, имели низкие концентрации сахаров (в основном ксилозы) и в некоторой степени высокие содержания ингибиторов (2,0

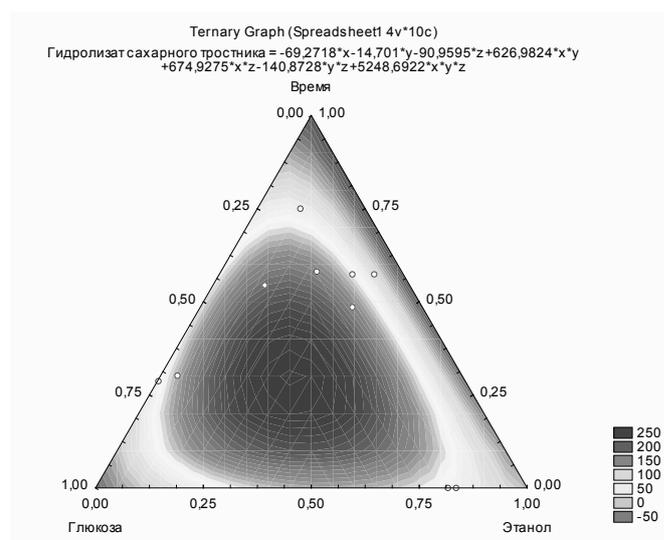
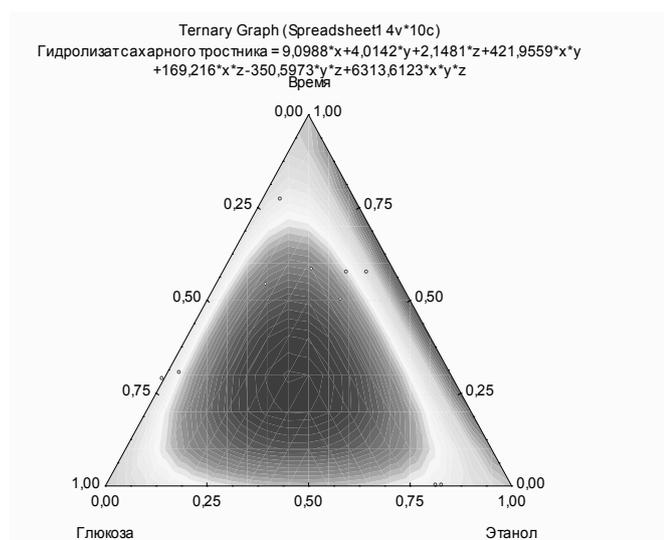
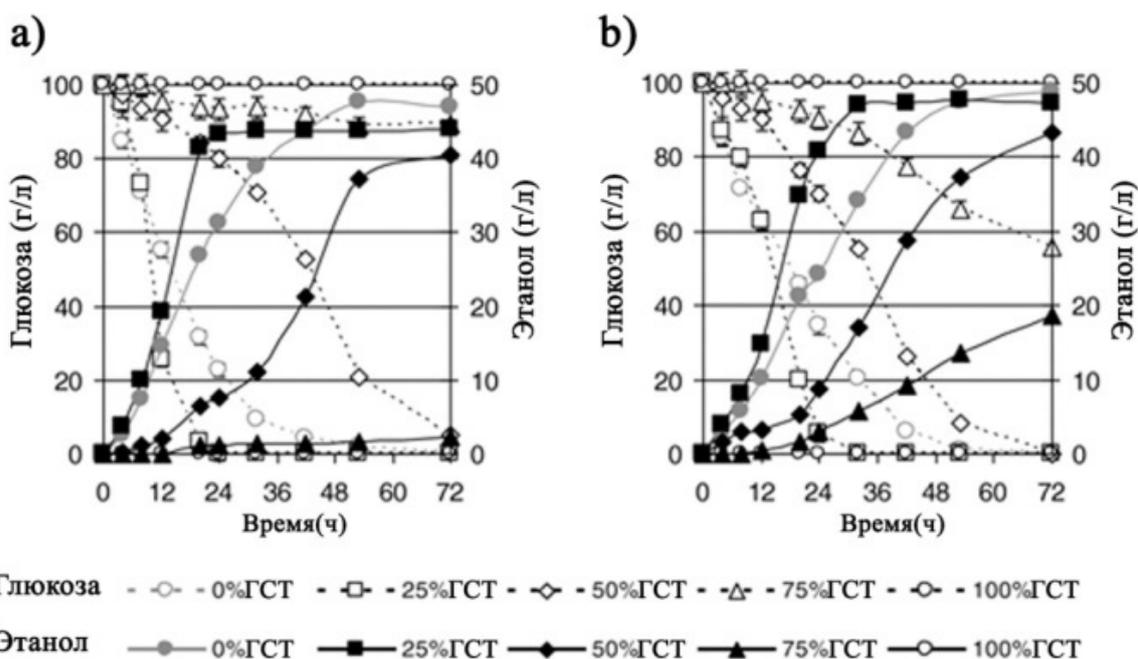


Рис. 2. Потребления глюкозы с помощью штаммов *Saccharomyces* а) Fm17 изолированный штамм и б) 27P эталонный коммерческий штамм. Композиции гидрализата сахарного тростника (ГСТ) (основная масса) составляли 25%, 50%, 75% и 100% ГСТ, а бульон добавляли 100 г/л глюкозы и 50 г/л ксилозы. Все эксперименты проводились в трех экземплярах и представлены в виде среднего  $\pm$  стандартных отклонений.

г/л фуральдегида, алифатических кислот более 14 г/л, значительные количества фенольных кислот и альдегидов). Напротив, уровни 1,5–1,6 г/л фуральдегида и 5,2–5,5 г/л алифатических кислот ранее были обнаружены в 2-ух ферментативных гидролизатах жома тростника [7]. Эти авторы описывают третий гидролизат, который содержит 4,5 г/л фуральдегида и 7,4 г/л жирных кислот, которые их штаммы дрожжей не могут ферментировать.

Чтобы оценить способность дрожжей к углеродному брожению в присутствии гидролизатов сахарного тростникового жома, в азотистый дрожжевой бульон добавляли 4 различных концентрации гидролизатов сахарного тростника до конечной концентрации (все по объему) 25%, 50%, 75%, и 100%, азотистая основа дрожжей без гидролизата сахарного тростника в качестве контроля составляла 0%. В рисунки 2. 100 г/л глюкозы и 50 г/л ксилозы добавляли в качестве источников углерода во все среды.

В присутствии 25% гидролизата сахарного тростника дрожжи показали эквивалентные титры этанола (Fm17 и 27P, 47,6 и 44,0 г/л соответственно) и объемную продуктивность в 1,1 раза выше, чем при 0% гидролизате сахарного тростника (табл. 1). Такое же поведение наблюдалось в синтетических коктейлях (табл. 1), что позволяет предположить, что слабая кислота, содержащаяся в гидролизате, снова оказала благоприятное влияние на выработку этанола обоими штаммами. Скорость поглощения глюкозы в 25%-ном гидролизате сахарного тростника была значительно выше, чем в случае добавления гидролизата, не содержащего сахарный тростник (рис. 2). При 50% гидролизате сахарного тростника самая высокая концентрация этанола была эквивалентна у обоих штаммов (табл. 1), Fm17 достиг объемной эффективности 27P в 1,5 раза. Что еще более важно, резкое улучшение устойчивости к Fm17 было наглядно продемонстрировано сбравиванием 75% гидролизатов сахарного тростника с получением до 18,6 г/л этанола. С другой стороны, количество этанола, получаемое с помощью 27P, в 7,7 раза ниже (рис. 2). Однако ни один из этих факторов не был обнаружен. Рост и выработка этанола были обнаружены только в 100% растворе гидролизата сахарного тростника у обоих штаммов (рис. 2). Аналогичные результаты были получены, но не наблюдалось образования этанола в присутствии  $H_2SO_4$  жмыха сахарного тростника, пропитанного исходным раствором, с концентрацией фурана в 2 раза выше, чем в жмыхе предварительно обработанной, который мы использовали, и концентрацией слабой кислоты в 2 раза ниже (не 14,2 г/л, а 7,4) [7].

Стабильность штамма Fm17 показана в таблице 1. Штамм Fm17 показал выходы этанола близкие к 0,45 и 0,42 г этанола на 1 г глюкозы, в 50% ГСТ и 75% ГСТ

соответственно, и эти уровни были значительно выше, чем у штамма 27P. Кроме того, если мы сравним данные, полученные с *Saccharomyces cerevisiae* ATCC96581 [8], мы обнаружим, что надежность штамма Fm17 высока. ATCC96581, выделенный из использованного сульфитного ферментационного оборудования, культивировали в среде, состав слабых кислот, фуранов и альдегидов которой эквивалентен составу гидролизатов сахарного тростника [8]. Этот штамм также был очень устойчивым [5], но его выход этанола составлял 0,28 г этанола на 1 г глюкозы, что, по крайней мере, в 1,4 раза меньше, по сравнению со штаммом Fm17. По всей видимости выделение дрожжей из вижимки винограда оказалась очень высокоэффективной стратегией производства устойчивых дрожжей, учитывая враждебную среду, представленную ферментационной установкой отработанного сульфитного раствора.

## Обсуждение

Используя 40 °C в качестве основного условия отбора, современной коллекции дрожжей, выработанных из виноградных выжимок, сначала оценили на способность к брожению, измеренную потреблением глюкозы и производством этанола в среде с высокими концентрациями глюкозы (100 г/л) и ксилозы (50 г/л). Затем тестировали устойчивость дрожжей к ингибиторам с использованием отдельных ингибиторов различной концентрации или специального бульона с добавлением коктейля соединений-ингибиторов. Также было изучено влияние pH культуры и содержания сахара на устойчивость дрожжей к ингибиторам. Поскольку конечной целью было получение коммерчески доступного штамма дрожжей с высокой ферментативной способностью, мы использовали пропариваемый гидролизат мякоти сахарного тростника в качестве субстрата, чтобы максимально имитировать промышленную среду.

Разделение и просеивание для эффективного брожения в минимальных условиях с использованием проницаемых и термостойких дрожжей. Хотя ферментация при высоких температурах считается важным фенотипом для повышения эффективности производства биоэтанола дрожжами в больших масштабах, до сих пор не проводились скрининговые исследования с целью выявления дрожжей, способных расти и бродить при температуре выше 40 °C. По этой причине мы выделили дрожжи из виноградных остатков, неиспользованного источника микробного биоразнообразия для производства лигноцеллюлозного биоэтанола, используя лабораторные чашки Валлерштейна, культивируемые при 38°C, 40°C и 42°C, и отобрали термостойкие и резистентные дрожжи. Поскольку большое количество колоний наблюдалось при 38 °C, а рост был ограничен при 42 °C, колонии отбирали из чашек, культивируе-

мых при 40 °С, и выделяли термостойкие штаммы для дальнейшего изучения и определения генотипа. Все 40 штаммов были идентифицированы как *Saccharomyces cerevisiae*, и сначала была проведена оценка способности к потреблению глюкозы при 200 г/л глюкозы или синтетической минимальной питательной среде с добавлением комбинации глюкозы (100 г/л) и ксилозы (50 г/л) при 40 °С. Эти углеводороды считаются для предъявления гексозы и пентозы в большинстве лигноцеллюлозных гидролизатов. В этой статье показано способность дрожжей к потреблению глюкозы и определяется ферментирующая сила, потребляемой на 1 литр бульона минимальной синтетической питательной среде, как описано в методах.

## Выводы

В этом исследовании мы применили различные методы селекции к штамму *Saccharomyces cerevisiae* и применили комплексный подход к стратегическому отбору сортов винограда в качестве источника устойчивых дрожжей, который оказался эффективным в выделении новых штаммов, способных справляться с наибольшими стрессами, специфичными для производства биоэтанола в больших масштабах. Результаты показали, что выжимка винограда является многообещающей средой для выделения дрожжей, устойчивых к ингибированию, нагреванию и осмотическому давлению, и что их значительно больше.

## ЛИТЕРАТУРА

- Galbe M, Zacchi G: A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biot* 2002, 59: 618–628. 10.1007/s00253-002-1058-9
- Hamelinck CN, Van Hooijdonk G, Faaij APC: Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenerg* 2005, 28: 384–410. 10.1016/j.biombioe.2004.09.002
- Jönsson LJ, Aliksson B, Nilvebrant NO: Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels* 2013, 6: 16. 10.1186/1754-6834-6-16
- Martin C, Jönsson LJ: Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Enzyme Microb Tech* 2003, 32: 386–395. 10.1016/S0141-0229(02)00310-1
- Lindén T, Peetre J, Hahn-Hägerdal B: Isolation and characterization of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation plant. *Appl Environ Microb* 1992, 58: 1661–1669.
- Palmqvist E, Almeida JS, Hahn-Hägerdal B: Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in bath culture. *Biotechnol Bioeng* 1999, 62: 447–454. 10.1002/(SICI)1097-0290(19990220)62:4<447::AID-BIT7>3.0.CO;2-0
- Martin C, Galbe M, Nilvebrant NO, Jönsson LJ: Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl Biochem Biotech* 2002, 98–100: 699–716.
- Martin C, Galbe M, Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B, Jönsson LJ: Ethanol production from an enzymatic hydrolysate of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Tech* 2002, 31: 274–282. 10.1016/S0141-0229(02)00112-6.
- Национальная база данных законодательства, 29.07.2021 г., № 07/21/5200/0731.
- Kemalov A., Kemalov R., Valiev D. Scientific and practical aspects of development of ultrafine dispersions of modified petroleum oils. *Chemistry and Technology of Fuels and Oils* 2013 vol.45 № 6, pages 465–471
- A.F. Kemalov, R.A. Kemalov, D.Z. Valiyev and V.I. Gaynulin Estimation of Potential Capability of Natural Bitumens and High Viscosity Oils for Refining According to Fuel-Bitumen Scheme. *Indian Journal of Science and Technology*, Vol 9(18), May 2016

© Джамалов Зохид Зафарович ( z.djamalov@mail.ru ), Кемалов Руслан Алимович ( kemalov@mail.ru ).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»