



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΝΕΩΣΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΒΙΩΣΙΜΩΝ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΥΣΙΜΗΣ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΑΠΟ ΜΕΛΑΣΑ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΖΑΧΑΡΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΟΥ
ΓΚΟΥΦΑ ΝΙΚΟΛΑΟΥ – ΑΝΔΡΕΑ

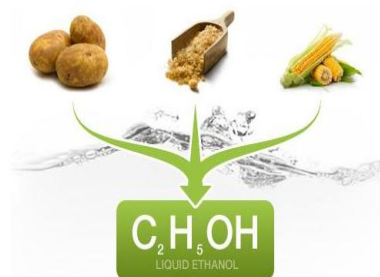
ΧΑΝΙΑ, 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αναπλ. Καθηγητής **ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΤΣΟΥΤΣΟΣ**
(ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Επ. Καθηγήτρια **ΔΑΝΑΗ ΒΕΝΙΕΡΗ**

Επ. Καθηγητής **ΠΕΤΡΟΣ ΓΚΙΚΑΣ**



Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανανεώσιμων και Βιώσιμων Ενεργειακών Συστημάτων, της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος, του Πολυτεχνείου Κρήτης κατά τη χρονική περίοδο Μάιος έως Οκτώβρη του 2013, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεοχάρη Τσούτσο.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Θεοχάρη Τσούτσο, για την υποστήριξη, καθοδήγηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας, αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσε για την ενασχόληση μου με ένα τόσο επίκαιρο θέμα, όπως είναι ο τομέας των βιοκαυσίμων. Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω επίσης στον Καθηγητή κ. Πέτρο Γκίκα, για την αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας, ενώ ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Καθηγήτρια κ. Δανάη Βενιέρη, τόσο για την αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και για την συνεχή υποστήριξη και βοήθεια.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ηλία Νερατζή του τμήματος Οινολογίας, του ΤΕΙ Αθήνας, για την παραχώρηση του στελέχους του ζυμωτικού μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

Ευχαριστίες θα ήθελα ακόμα να απευθύνω στον κ. Ιωάννη Κανάκη για την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά, όλους τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος των οποίων η συνεισφορά ήταν καταλυτική για την αποπεράτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους φίλους και τους γονείς μου για την αμέριστη ηθική και ψυχολογική υποστήριξη, αλλά και την κατανόηση που έδειξαν τόσο κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, όσο και στο σύνολο των χρόνων φοίτησης μου στα Χανιά.

Γκούφας Νικόλαος-Ανδρέας
Οκτώβριος 2013

Τα τελευταία χρόνια δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στην αναζήτηση εναλλακτικών καυσίμων στον τομέα των μεταφορών, δεδομένης της συνεχόμενης αύξησης της τιμής του πετρελαίου. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα βιοκαύσιμα, τα οποία παράγονται από χρησιμοποιημένα προϊόντα και απόβλητα, και ως απώτερο σκοπό έχουν τη μείωση των περιβαλλοντικών και οικονομικών προβλημάτων. Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετάται η παραγωγή βιοαιθανόλης από μελάσα, η οποία αποτελεί παραπροϊόν κατά τη διεργασία παραγωγής της κρυσταλλικής ζάχαρης.

Σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας είναι η μελέτη επιρροής των περιβαλλοντικών παραγόντων κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, για την παραγωγή αιθανόλης. Ο ζυμωτικός μικροοργανισμός ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *Saccharomyces Cerevisiae* και οι περιβαλλοντικές συνθήκες οι οποίες λήφθηκαν υπόψη ήταν η θερμοκρασία, η συγκέντρωση υποστρώματος (μελάσα) και μικροοργανισμού, καθώς και η παρουσία ή όχι θρεπτικών.

Η βέλτιστη παραγωγή βιοαιθανόλης (53,47%) επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το στέλεχος Chardonnay MV95203 με περιβαλλοντικές συνθήκες, 30°C, 1g/L αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών, 20% συγκέντρωση μελάσας και pH=4,5. Παρόλα αυτά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη διεξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων, καθώς και σφαιρική εξέταση του θέματος από τεχνική και οικονομική άποψη, για τον προσδιορισμό της βέλτιστης διάρκειας ζύμωσης.

In recent years, special attention is given to the search for alternative fuels in the transport sector, given the continuous increase in the price of oil. Interest is shown in the biofuels, which are produced out of used products and waste, and ultimate aim at reducing the environmental and economic problems. This research project studies the production of bioethanol from molasses, which is a byproduct of the production process of crystallized sugar.

The purpose of this thesis is to study the influence of environmental factors in the ethanol fermentation process. The fermentative microorganism used was *Saccharomyces Cerevisiae* and the environmental conditions that were taken into consideration were the temperature, the concentration of substrate (molasses) and micro-organism, and the presence or absence of nutrients.

The optimal production of bioethanol reached 53,47% using the strain Chardonnay MV95203 with environmental conditions, 30 ° C, initial concentration of microorganisms 1g/L, 20% molasses concentration and pH = 4.5. However, further research is needed to conduct accurate conclusions and a comprehensive review of the issue from a technical and economic point of view, to determine the optimal duration of fermentation.

1 Εισαγωγή 2

1.1 Ιστορική αναδρομή.....	2
1.2 Πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης.....	4
1.2.1 Πρώτες ύλες 1 ^{ης} γενιάς.....	4
1.2.2 Πρώτες ύλες 2 ^{ης} γενιάς.....	4
1.2.3 Πρώτες ύλες με μελλοντικές δυνατότητες.....	5

2 Διεθνής Επιστημονική Εμπειρία 6

2.1 Βιοαιθανόλη	6
2.1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα χρήσης της	6
2.1.2 Νομοθετικό πλαίσιο	7
2.1.3 Στατιστικά στοιχεία	9
2.1.4 Μελλοντικές προοπτικές.....	10
2.2 Μελάσα	11
2.2.1 Γενικές παρατηρήσεις.....	11
2.2.2 Βασικά συστατικά	12
2.2.3 Άλλες ιδιότητες της μελάσας.....	14
2.2.4 Αξιοποίηση της μελάσας	15
2.2.5 Διαφορές μεταξύ μελάσας ζαχαρότευτλων και ζαχαροκάλαμου	17
2.3 Μικροοργανισμοί.....	18
2.3.1 Κύριοι αιθανολοπαραγωγικοί μικροοργανισμοί	18
2.3.2 <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	18
2.3.3 Άλλοι μικροοργανισμοί για την παραγωγή βιοαιθανόλης.....	20
2.4 Διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης	20
2.5 Παράγοντες επίδρασης κατά τη διαδικασία της ζύμωσης	22

3 Υλικά και Μέθοδοι 25

3.1	Μικροοργανισμοί.....	25
3.2	Πρώτες ύλες και χημικά Αντιδραστήρια.....	25
3.3	Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν	26
3.4	Αναλυτικές Μέθοδοι	26
3.4.1	Μέτρηση pH.....	26
3.4.2	Εκτίμηση μικροβιακής ανάπτυξης.....	26
3.4.3	Μέτρηση ολικών σακχάρων.....	27
3.4.4	Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων	27
3.4.5	Μέτρηση παραγόμενης αιθανόλης	29
3.5	Πειραματική Διαδικασία.....	30
3.5.1	Ανάπτυξη ζυμωτικού μικροοργανισμού	31
3.5.2	Στάδιο διερεύνησης	31
3.5.3	Ζύμωση σε ημιαερόβιες συνθήκες, απουσία θρεπτικών.....	33
3.5.4	Ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες, παρουσία θρεπτικών	34
4	Αποτελέσματα & Συζήτηση	35
4.1	Κωδικοποίηση αποτελεσμάτων.....	35
4.2	Στάδιο διερεύνησης.....	36
4.3	Ζύμωση σε ημιαερόβιες συνθήκες, απουσία θρεπτικών	39
4.4	Ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες, παρουσία θρεπτικών	41
4.5	Παραγόμενη αιθανόλη.....	49
5	Συμπεράσματα	50
6	Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα	51
7	Βιβλιογραφία	52

Ευρετήριο πινάκων

Κυρίως μέρος

Πίνακας 2.2-1 Διαφορές στην σύσταση μελάσας από ζαχαροκάλαμα και τεύτλα(Olbrich, 1963)	17
Πίνακας 3.5-1 Πειραματικές συνθήκες δοκιμαστικής ζύμωσης	32
Πίνακας 3.5-1 Πειραματικές συνθήκες 1ου πειράματος	33
Πίνακας 3.5-1 Πειραματικές συνθήκες 2ου πειράματος	34
Πίνακας 4.1-1 Χρωματική κωδικοποίηση διαγραμμάτων	35

Παραρτήμα

Πίνακας I-1 Παραγωγή καύσιμης βιοαιθανόλης σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα έτη 2011 και 2012 σε εκατομμύρια λίτρα(Eurobserv'et, 2013).	viii
Πίνακας I-2 Κατανάλωση βιοαιθανόλης για τον τομέα των μεταφορών σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση για το έτος 2012 (toe)	viii
Πίνακας II-1 Παραδείγματα 2ης γενιάς προκλήσεων σχετικά με τη βιοαιθανόλη (Mousdale, 2008)	x
Πίνακας III-1 Συντελεστής ιξώδους μελάσας τεύτλων	xi
Πίνακας III-2 Μέση σύνθεση μελάσας από ζαχαρότευτλα	xi
Πίνακας III-3 Κατανομή του ολικού αζωτούχου περιεχομένου της μελάσας(Olbrich, 1956)	xi
Πίνακας III-4 Συντελεστής ιξώδους μελάσας τεύτλων και άλλων υλικών	xii
Πίνακας III-5 Έρευνα σχετικά με τις βιοχημικές διεργασίες αξιοποίησης της μελάσας(Olbrich, 1956)	xii
Πίνακας IV-1 Σημαντικές επιπτώσεις της αιθανόλης στη φυσιολογία των ζυμών (Walker, 1998)	xiii

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα VI-1 Επωαστήρας	Εικόνα VI-2 Φασματοφωτόμετρο	xv
Εικόνα VI-3 Φυγοκεντρητής	Εικόνα VI-4 Λυοφιλοποιητής	xv
Εικόνα VI-5 Μελάσα		xvi
Εικόνα VI-6 Αντιδραστήριο DNS	Εικόνα VI-7 Διαδικασία ρύθμισης pH	xvi
Εικόνα VI-8 Αντιδραστήρια προς ζύμωση		xvi

Κυρίως Μέρος

Διάγραμμα 4.2-1 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο(Διερευνητικό Πείραμα)	36
Διάγραμμα 4.2-2 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο(Διερευνητικό Πείραμα)	37
Διάγραμμα 4.2-3 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο(Διερευνητικό Πείραμα)	37
Διάγραμμα 4.3-1 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο(Πείραμα 1)	39
Διάγραμμα 4.3-2 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο(Πείραμα 1)	39
Διάγραμμα 4.3-3 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο(Πείραμα 1) ..	40
Διάγραμμα 4.4-1 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών 0,5g/L(Πείραμα 2)	41
Διάγραμμα 4.4-2 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών 1g/L(Πείραμα 2)	42
Διάγραμμα 4.4-3 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών 2g/L(Πείραμα 2)	42
Διάγραμμα 4.4-4 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών 0,5g/L(Πείραμα 2)	43
Διάγραμμα 4.4-5 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών 1g/L(Πείραμα 2)	44
Διάγραμμα 4.4-6 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών 2g/L(Πείραμα 2)	44
Διάγραμμα 4.4-7 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 10%(Πείραμα 2)	45
Διάγραμμα 4.4-8 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 20%(Πείραμα 2).....	45
Διάγραμμα 4.4-9 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 30%(Πείραμα 2).....	46
Διάγραμμα 4.4-10 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 10%(Πείραμα 2).....	47

Διάγραμμα 4.4-11 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 20%(Πείραμα 2).....	47
Διάγραμμα 4.4-12 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 30%(Πείραμα 2).....	48
Διάγραμμα 4.5-1 Διάγραμμα Θεωρητικής Απόδοσης Αιθανόλης.....	49

Παράρτημα

Διάγραμμα V-1 Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης, <i>S. Cerevisiae</i>	xiv
Διάγραμμα V-2 Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης ολικών σακχάρων	xiv
Διάγραμμα V-3 Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων	xiv

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται σε πειραματικό επίπεδο η απόδοση του συνολικού συστήματος για την παραγωγή καύσιμης βιοαιθανόλης, χρησιμοποιώντας ως σακχαρούχο υπόστρωμα μελάσα και ζυμωτικό μικροοργανισμό τον *Saccharomyces Cerevisiae*. Κύριος στόχος είναι η βελτιστοποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών οι οποίες οδηγούν στη μέγιστη ζυμωτική απόδοση. Οι παράμετροι οι οποίες εξετάστηκαν, είναι η θερμοκρασία, η αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού, καθώς και η συγκέντρωση του υποστρώματος.

1 Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή

Ο τομέας της βιοτεχνολογίας, κυρίως αναφερόμενοι στην πρακτική του χρήση, βρίσκει εφαρμογή από πολύ παλιά, ιδίως όσον αφορά την παραγωγή αιθανόλης (αιθυλικής αλκοόλης). Ανάμεσα στα αξιόλογα ευρήματα της μοριακής αρχαιολογίας, είναι η πιθανότητα ύπαρξης οينوποιίας ήδη από το 5400-5000 πΧ σε περιοχές της δυτικής Ασίας (McGovern, 2003).

Επίσης δεδομένα μερικής αλληλουχίας DNA προσδιορίζουν τη χρήση ζύμης αντίστοιχης με το σύγχρονο *Saccharomyces Cerevisiae* ως βιολογικό παράγοντα για την παραγωγή κρασιού, μπίρας και άρτου στην αρχαία Αίγυπτο (McGovern, 2003).

Κρασιά, μπίρες από δημητριακά, αλκοολούχα ποτά από μέλι, χουρμά αλλά και από φρούτα που καλλιεργούνταν στην περιοχή της Εύφορης Ημισελήνου είναι πιθανό να είχαν συγκεντρώσεις έως και 10% κατ' όγκο. Η συγκέντρωση της αιθανόλης σε τέτοια υγρά ως αποτέλεσμα απόσταξης σε ένα ευρύ φάσμα πόσιμων ποτών είναι κοινώς γνωστά ως «οινοπνευματώδη». Η εξέλιξη αυτής της χημικής τεχνολογίας ακολουθεί μια εκπληκτικά μεγάλη χρονοσειρά (Rose, 1977):

- Κινεζικά κείμενα από το 1000 πΧ προειδοποιούν για κατάχρηση αποσταγμένων οινοπνευματωδών.
- Ο Arnold de Villeneuve, ένας Γάλλος χημικός, έγραψε την πρώτη διατριβή σχετικά με την απόσταξη το 1310.
- Η πρώτη καταγεγραμμένη παραγωγή αποσταγμάτων δημητριακών στη Βόρεια Αμερική ήταν αυτή του γενικού διευθυντή της αποικίας της Νέας Ολλανδίας το 1640 (στο Staten Island).
- Η συσκευή διπλής απόσταξης που επινοήθηκε από τον Ιρλανδό Aeneas Coffey έγινε δεκτή από το γραφείο ειδικών φόρων κατανάλωσης του Ηνωμένου Βασιλείου το 1830. Η συγκεκριμένη συσκευή με πολλές παραλλαγές και βελτιώσεις στο βασικό σχεδιασμό, συνεχίζει να παράγει υψηλής ποιότητας αιθανόλη (94-96% κατ' όγκο) (Mousdale, 2008).

Η απόσταξη αποδίδει «αλκοόλη 95%», ένα δυαδικό αζεότροπο (μίγμα σταθερής σύνθεσης) με σημείο βρασμού 78,15 °C. Η «καθαρή» αλκοόλη παρασκευάζεται με τη φυσική απομάκρυνση του υπολειπόμενου νερού, έχει εμπειρικό τύπο C_2H_6O και μοριακό βάρος 46,07. Είναι ένα καθαρό άχρωμο διάλυμα με πυκνότητα (στους 20 °C) 0,789 g/mL. Το κύριο χαρακτηριστικό της αιθανόλης είναι το χαμηλό σημείο ανάφλεξης στους 13 °C (Budavari,

1989). Για το λόγο αυτό κίνησε το ενδιαφέρον όσον αφορά τη χρησιμοποίηση της ως καύσιμη ύλη.

Μέχρι το 1905, η αιθανόλη αποτελούσε το πρωταρχικό καύσιμο για τους μηχανικούς και τους αυτοκινητιστές, γνώμη που σε μεγάλο βαθμό επηρεαζόταν από τους φόβους για ανεπάρκεια πόρων του πετρελαίου και της αύξησης της τιμής της βενζίνης. Ο Henry Ford σχεδίαζε να χρησιμοποιήσει την αιθανόλη ως κύριο καύσιμο για το μοντέλο T (που παρουσιάστηκε το 1908) σύντομα όμως άλλαξε κατεύθυνση προς τη λιγότερο δαπανηρή εναλλακτική λύση της βενζίνης. Το τελικό αποτέλεσμα ήταν ένα ευέλικτο αυτοκίνητο το οποίο μπορούσε να κινηθεί με αιθανόλη, βενζίνη ή συνδυασμό και των δύο. Ο Ford προβλέποντας τη σημερινή ώθηση για εμπορική ανάπτυξη μεγάλης κλίμακας παραγωγή αιθανόλης από куτταρινούχα υλικά είχε δηλώσει, *«Το καύσιμο του μέλλοντος θα προέρχεται από φρούτα όπως το σουμάκι ή τα μήλα, αγριόχορτα, πριονίδια – σχεδόν από οτιδήποτε»*. Καθοριστικό ρόλο στη χρήση της αιθανόλης ως καύσιμο έπαιξε και ο ειδικός φόρος κατανάλωσης της μετουσιωμένης αιθανόλης (σε ισχύ από το 1907). Η μετέπειτα εξελικτική πορεία της έχει ως εξής(ICM, 2012):

- Το 1918, κατά τη διάρκεια του πρώτου παγκοσμίου πολέμου η αυξημένη απαίτηση καυσίμου αυξάνει τη χρήση αιθανόλης στα 60 χιλιάδες γαλόνια το χρόνο.
- Το 1920 η βενζίνη γίνεται το πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο καύσιμο κινητήρων.
- Το 1942 ο δεύτερος παγκόσμιος πόλεμος ενισχύει τη ζήτηση αιθανόλης, κυρίως για συνθετικό καουτσούκ και ως αεροπορικό καύσιμο.
- Ο Charles E. “Chuck” Yeager γίνεται ο πρώτος πιλότος που σπάει το φράγμα του ήχου καίγοντας μίγμα αιθανόλης, υγρού οξυγόνου και αζώτου.
- Μετά τον δεύτερο παγκόσμιο κατά τις δεκαετίες 50’ και 60’ η εμπορική αιθανόλη πέφτει σε δυσμένεια.
- Το 1973 ο οργανισμός εξαγωγών αραβικών πετρελαιοπαραγωγών χωρών(OPAC) αποφάσισε για εμπάργκο πετρελαίου, ενώ ένα μόλις χρόνο μετά το 1974, ο οργανισμός προστασίας του περιβάλλοντος(EPA) εξέδωσε ένα διάταγμα σχετικά με την οριστική απομάκρυνση του μολύβδου από τη βενζίνη. Τα δύο τελευταία αυτά γεγονότα θέτουν τη βάση για την επιτυχή επαναφορά της αιθανόλης.
- Η Chrysler ήταν η πρώτη εταιρία που εγγυήθηκε το 1979 για τη χρήση της πρόσμιξης βενζίνης 90% - αιθανόλης 10% (E10).
- Το 1994 επιτεύχθηκε η πρώτη εμπορική παραγωγή καύσιμης αιθανόλης από куτταρίνη (ίνες καλαμποκιού).
- Το 1995 οι αμερικάνικες αυτοκινητοβιομηχανίες ξεκίνησαν την μαζική παραγωγή ευέλικτων σε καύσιμα οχημάτων.

- Ρύπανση των υπόγειων υδάτων παρακίνησε το 2000 την νομοθετική απαγόρευση ή μείωση χρήσης του μεθυλοτριτοβουτυλαιθέρα (MTBE) με επακόλουθο την αύξηση της χρήσης της αιθανόλης,

1.2 Πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης

1.2.1 Πρώτες ύλες 1^{ης} γενιάς

Οι πρώτες ύλες πρώτης γενιάς για την παραγωγή αιθανόλης αρχικά παραπέμπουν σε πηγές φυτικής βιομάζας (φυτομάζα), οι οποίες είναι επίσης ανθρώπινες και ζωικές θρεπτικές πηγές, όπως τα άμυλα σιτηρών και οι καλλιέργειες ζάχαρης. Διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, πηγές σακχαρούχου και αμυλούχου βιομάζας.

- *Σακχαρούχος*: Σακχαρότευτλα, σακχαροκάλαμο, γλυκό σόργο, μελάσα, ώριμα φρούτα κ.α.
- *Αμυλούχος*: πατάτα, αγριαγκινάρα, αραβόσιτο, σιτάρι, κριθάρι, σίκαλη, σόργο, κασάβα κ.α.

1.2.2 Πρώτες ύλες 2^{ης} γενιάς

Η χρήση πρώτων υλών 1ης γενιάς για να συμβαδίζουν με τις συνεχώς αυξανόμενες απαιτήσεις για μελλοντική παραγωγή βιοκαυσίμων δεν είναι βιώσιμη τα τελευταία χρόνια και για το λόγο αυτό έχουν γίνει σημαντικές μειώσεις στην παραγωγή αιθανόλης από αμυλούχες και σακχαρούχες πρώτες ύλες.

Οι 2ης γενιάς πρώτες ύλες για παραγωγή βιοαιθανόλης αναφέρονται σε μη βρώσιμες πηγές βιομάζας και κυρίως σε λιγνοκυτταρινούχες πηγές. Αυτό αντιπροσωπεύει την μεγαλύτερη πηγή άνθρακα στη Γη (εκτιμώμενη ετήσια παραγωγή 10^{10} MT, (Sanchez & Cardona, 2008) και περιλαμβάνει 2 κύριες κατηγορίες πρώτων υλών

- *Υλικά απόβλητα* όπως άχυρο, υπολείμματα καλαμποκιού (κοτσάνια, ίνες και στάχυα), απόβλητα ξύλου/πριονίδια, δασικά απόβλητα, χαρτιά/χαρτόνια, βαγάση, χρησιμοποιημένα σιτηρά, αστικά στερεά απόβλητα (MSW), γεωργικά απόβλητα.
- *Ενεργειακές καλλιέργειες* όπως δασύλλια περιοδικής υλοτόμησης (SRC) και ενεργειακά χόρτα (*Miscanthus giganteus*), φαλαρίδα (*Phalaris arundinaceae*), καλάμι (*Arundo donax*), ήρα, καλλιεργούμενα σε κατώτερης ποιότητας γεωργική γη και ρυπασμένα βιομηχανικά εδάφη.

1.2.3 Πρώτες ύλες με μελλοντικές δυνατότητες

Τα θαλάσσια μακροφύκη (seaweeds) απαιτούν ελάχιστη χρήση γεωργικής γης και καθαρού νερού για καλλιέργεια και αποτελούν μία ενδιαφέρουσα πηγή βιομάζας για την παραγωγή βιοαιθανόλης (Horn et al., 2000a; 2000b). Η έλξη τους ως πηγή βιομάζας για βιοκαύσιμα πηγάζει από το γεγονός πως οι θαλάσσιες καλλιέργειες έχουν ρυθμούς ανάπτυξης και πρωταρχικούς ρυθμούς παραγωγής πολύ γρηγορότερους από τους αντίστοιχους των επίγειων φυτών. Ως χαμηλών απαιτήσεων, υψηλών αποδόσεων βιομάζας, οι θαλάσσιες καλλιέργειες μπορεί να αντιπροσωπεύσουν ένα παράδειγμα πρώτων υλών 3ης γενιάς για παραγωγή βιοαιθανόλης.

Περιορισμένη παραγωγή βιοαιθανόλης είναι ακόμα εφικτή από επεξεργασία αποβλήτων αλκοολούχων ποτών όπως για παράδειγμα της μπύρας(πχ η εταιρεία Merrick & Co., Colorado, USA - www.ethanolproducer.com June 6, 2008). Επίσης, απόβλητα μαγειρεμένων τροφίμων (όπως το ψωμί) έχουν προοπτική για βιομετατροπή σε καύσιμη αλκοόλη(πχ η φιλανδική εταιρεία St1 Biofuels, www.st1.eu).

Άλλες μορφές πιθανών ζυμώσιμων υλικών συμπεριλαμβάνουν τα αστικά στερεά απόβλητα (MSW) τα οποία στις ανεπτυγμένες χώρες συλλέγονται για εναπόθεση από αστικές κοινότητες. Τα MSW αποτελούν μία από τις χαμηλότερες σε κόστος πηγή πρώτης ύλης για κυτταρινούχα παραγωγή βιοαιθανόλης. Συνδυάζει χαρτί/χαρτόνι, οικογενειακά και φυτικά απόβλητα και επιτυγχάνει μία υψηλότερη ενεργειακή τιμή της τάξης των 12,7MJ/ξηρό kg.

2 Διεθνής Επιστημονική Εμπειρία

2.1 Βιοαιθανόλη

2.1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα χρήσης της

Η αιθανόλη ως καύσιμο έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών καυσίμων, με κυριότερο την μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Παρακάτω αναφέρονται τα βασικότερα αυτών (Παπανικολάου, 2006):

- Είναι μη ορυκτό καύσιμο του οποίου η παρασκευή και η καύση δεν αυξάνουν το φαινόμενο του θερμοκηπίου.
- Είναι βιοαποικοδομήσιμη, μη τοξική και διαλυτή στο νερό.
- Η χρήση της μπορεί να μειώσει σημαντικά τις εκπομπές CO₂, αφού η παραγωγή της μέσω της ζυμώσιμης βιομάζας αποτελεί μέρος του κύκλου του άνθρακα.
- Η υψηλή περιεκτικότητα της σε οξυγόνο μειώνει τα επίπεδα του μονοξειδίου του άνθρακα.
- Με τη χρήση μιγμάτων αιθανόλης μειώνονται δραστικά οι εκπομπές υδρογονανθράκων, οι οποίοι αποτελούν μία από τις κύριες αιτίες για την μείωση του στρώματος του όζοντος.
- Τα υψηλής συγκέντρωσης μίγματα αιθανόλης μειώνουν τις εκπομπές μονοξειδίου του αζώτου σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20%
- Τα υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης μίγματα μπορούν να μειώσουν κατά 30% τις εκπομπές των πτητικών οργανικών συστατικών(VOCs).
- Αυξάνει τον αριθμό των οκτανίων της βενζίνης με μικρό κόστος.
- Σαν ενισχυτής του αριθμού οκτανίων αντικαθιστά άλλα επιβλαβή πρόσθετα, όπως το μόλυβδο.
- Σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα των οποίων τα αποθέματα είναι πεπερασμένα, η αιθανόλη είναι ανανεώσιμη πηγή ενέργειας αφού προέρχεται από τη βιομάζα.
- Μειώνει η εξάρτηση των κρατών από το πετρέλαιο.
- Δημιουργεί νέες προοπτικές απασχόλησης στον γεωργικό τομέα, καθώς ανοίγει ο δρόμος για τις ενεργειακές καλλιέργειες.
- Παράγεται εύκολα ακόμα και σε οικογενειακή κλίμακα και αποδίδει 34% περισσότερη ενέργεια από αυτή που απαιτείται για την παραγωγή της.

Από την άλλη πλευρά, εκφράζονται διάφοροι προβληματισμοί, τόσο κοινωνικοοικονομικοί όσο και παραγωγικοί (Παπανικολάου, 2006):

- Τίθεται το κοινωνικό ερώτημα της σημαντικότητας της βιομάζας ως βρώσιμη ύλη για την αντιμετώπιση της παγκόσμιας πείνας, αντί της παραγωγής βιοαιθανόλης.
- Το ενεργειακό περιεχόμενο της αιθανόλης αντιστοιχεί στα 2/3 περίπου του αντίστοιχου της βενζίνης.
- Το κόστος παραγωγής της αιθανόλης είναι ακόμη ιδιαίτερα υψηλό.
- Σε μεγαλύτερες από τις επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις, η αιθανόλη είναι πιθανό να μπλοκάρει ή ακόμα και να καταστρέψει τμήματα του συστήματος διανομής καυσίμων σε ορισμένα οχήματα και να σταματήσει τη ροή του μίγματος καυσίμου, ειδικότερα σε ζεστές καιρικές συνθήκες.
- Υπάρχουν αντιδράσεις από τους παραγωγούς των συμβατικών καυσίμων, όσον αφορά την παροχή ελαφρυντικών μέτρων στη βιομηχανία της βιοαιθανόλης.

2.1.2 Νομοθετικό πλαίσιο

Στα πλαίσια της συμφωνία του Κιότο, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή πρότεινε το 2001 την αύξηση χρήσης των μη ρυπογόνων ανανεώσιμων καυσίμων προερχόμενων από καλλιέργειες. Ο στόχος ήταν τα βιοκαύσιμα να αντιπροσωπεύουν το 2% των συνολικών καυσίμων χρησιμοποιούμενων για μεταφορές μέχρι το 2005. Ήταν ακόμα προγραμματισμένο το ποσοστό αυτό να αυξηθεί στο 5.75% μέχρι το 2010.

Όσον αφορά το νομοθετικό πλαίσιο το οποίο στοχεύει στον έλεγχο αλλά και την προώθηση χρήσης των βιοκαυσίμων υφίστανται οι ακόλουθες οδηγίες:

- Η Οδηγία 2003/30/ΕΚ, σχετικά με την προώθηση της χρήσης βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων για τις μεταφορές.

"Η παρούσα οδηγία επιδιώκει να προάγει τη χρήση των βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων προς αντικατάσταση του πετρελαίου ντίζελ ή της βενζίνης στις μεταφορές σε κάθε κράτος μέλος, προκειμένου να συμβάλει στην επίτευξη στόχων όπως η τήρηση των δημοσιεύσεων σχετικά με τις κλιματικές μεταβολές, η φιλική προς το περιβάλλον ασφάλεια του εφοδιασμού και η προώθηση των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας" (ΟΔΗΓΙΑ 2003/30/ΕΚ).

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης οδηγίας ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί:

"βιοκαύσιμα": υγρό ή αέριο καύσιμο για τις μεταφορές το οποίο παράγεται από βιομάζα

"βιομάζα": το βιοαπικοδομήσιμο κλάσμα προϊόντων, αποβλήτων και καταλοίπων από γεωργικές (συμπεριλαμβανομένων φυτικών και ζωικών ουσιών), δασοκομικές και συναφείς βιομηχανικές δραστηριότητες, καθώς και το βιοαπικοδομήσιμο κλάσμα των βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων.

Σύμφωνα με την οδηγία η βιοαιθανόλη κατατάσσεται στα βιοκαύσιμα.

"βιοαιθανόλη": αιθανόλη η οποία παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαπικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, για χρήση ως βιοκαύσιμο.

Τα βιοκαύσιμα μπορούν να διατίθενται υπό τις ακόλουθες μορφές:

- i. ως αμιγή καύσιμα ή με υψηλή περιεκτικότητα σε παράγωγα πετρελαιοειδών, σύμφωνα με συγκεκριμένα ποιοτικά πρότυπα που ισχύουν για τις μεταφορές.
- ii. ως βιοκαύσιμα αναμεμιγμένα με παράγωγα πετρελαιοειδών, σύμφωνα με τα συναφή ευρωπαϊκά πρότυπα.
- iii. ως υγρά τα οποία προέρχονται από βιοκαύσιμα.

Επιπλέον στην παρούσα οδηγία ορίζεται πως η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ, όταν χρησιμοποιούνται σε σχήματα σε καθαρή μορφή ή ως μείγμα, θα πρέπει να τηρούν τις ισχύουσες ποιοτικές προδιαγραφές προς εξασφάλιση της βέλτιστης απόδοσης των κινητήρων.

Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι το κοινό ενημερώνεται για τη διαθεσιμότητα των βιοκαυσίμων και άλλων ανανεώσιμων καυσίμων. Για ποσοστά βιοκαυσίμων αναμεμιγμένων με παράγωγα πετρελαιοειδών που υπερβαίνουν την οριακή τιμή 5% σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων(FAME) ή 5% σε βιοαιθανόλη, θα επιβληθεί ειδική σήμανση στα σημεία πωλήσεων.

Η Ελλάδα εναρμόνισε την εθνική της νομοθεσία με το Νόμο 3423/05 "*Εισαγωγή στην Ελληνική Αγορά των Βιοκαυσίμων και των Άλλων Ανανεώσιμων Καυσίμων*".

- Η Οδηγία 2009/28/EK, σχετικά με την προώθηση της ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές και την τροποποίηση και τη συνακόλουθη κατάργηση των οδηγιών 2001/77/EK και 2003/30/EK.

"Η παρούσα οδηγία θεσπίζει κοινό πλαίσιο για την προώθηση της ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές. Θέτει υποχρεωτικούς εθνικούς στόχους για το συνολικό μερίδιο ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές στην ακαθάριστη τελική κατανάλωση ενέργειας και το μερίδιο ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές στις μεταφορές. Καθορίζει κανόνες για τη στατιστική μεταβίβαση μεταξύ κρατών μελών, για κοινά έργα μεταξύ κρατών μελών και με τρίτες χώρες τις εγγυήσεις προέλευσης, τις διοικητικές διαδικασίες, την πληροφόρηση και την κατάρτιση και την πρόσβαση στο δίκτυο ηλεκτρικής ενέργειας για ενέργεια από ανανεώσιμες πηγές. Καθιερώνει κριτήρια αειφορίας του περιβάλλοντος για τα βιοκαύσιμα και τα βιορευστά" (ΟΔΗΓΙΑ 2009/28/EK).

Όσον αφορά τον τομέα των βιοκαυσίμων στη συγκεκριμένη οδηγία αναφέρεται πως κάθε κράτος μέλος μεριμνά ώστε το μερίδιο της ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές σε όλες τις μορφές μεταφορών να αντιπροσωπεύει, το 2020, ποσοστό τουλάχιστον 10% της τελικής κατανάλωσης ενέργειας στις μεταφορές στο εν λόγω κράτος μέλος.

2.1.3 Στατιστικά στοιχεία

Στην Ελλάδα έως και το έτος 2009, σύμφωνα με την 6^η εθνική έκθεση, δεν υπήρχε παραγωγή ή εισαγωγή βιοαιθανόλης για χρήση ως καυσίμου μεταφορών, παρά μόνο για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών και φαρμάκων.

Όσον αφορά τον ευρωπαϊκό ισολογισμό για το έτος 2012 η παραγωγή άγγιξε τα 4.836 χιλιάδες λίτρα καύσιμης βιοαιθανόλης, με κυρίαρχη αιθανολοπαραγωγό χώρα την Γαλλία με 1.200 χιλιάδες λίτρα. Από το προηγούμενο έτος (2011) παρατηρήθηκε αύξηση της τάξης του 10%. Η αναλυτική παραγωγή κάθε χώρας για τα έτη 2011 και 2012 παρουσιάζεται στον Πίνακα Πίνακας I-1 του παραρτήματος.

Ακόμα παρουσιάζεται στο παράρτημα και η κατανάλωση βιοαιθανόλης ανά χώρα της ευρωπαϊκής ένωσης (Πίνακας I-2) για το έτος 2012. Ενδεικτικά αναφέρονται πως η Γερμανία κατανάλωσε 805.460 toe και η Γαλλία 417.600 toe βιοαιθανόλης, σύμφωνα με τις στατιστικές υπηρεσίες κάθε χώρας (AGEEstat και SOeS αντίστοιχα).

2.1.4 Μελλοντικές προοπτικές

I. Διεθνείς τάσεις

Κοιτάζοντας στο μέλλον, η US Energy Information Administration (EIA) έχει προβλέψει πως τα ανανεώσιμα καύσιμα μέχρι το 2030 είναι πιθανό να επαρκούν για το 8,5% της παγκόσμιας ενεργειακής κατανάλωσης. Παρόλα αυτά, η αυξημένη παραγωγή από αμυλούχες και σακχαρούχες πρώτες ύλες δεν είναι βιώσιμη λόγω κοινωνικο-οικονομικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων της αύξησης της τιμής των δημητριακών καθώς και της μείωσης της βιοποικιλότητας.

Απαιτείται επομένως, να ερευνηθεί περαιτέρω η επεξεργασία της μη βρώσιμης βιομάζας (κυρίως λιγνοκυτταρινούχα και βιολογικά απόβλητα) ώστε να καλύψει τη συνεχώς ανερχόμενη διεθνή απαίτηση σε υγρά καύσιμα (Somerville et al., 2010) (Pilgrim & Wright, 2009).

II. Μελλοντικές προκλήσεις

Διάφορες προκλήσεις οι οποίες ανέρχονται στο προσκήνιο ώστε να επιτευχθεί ο στόχος του 20% ανανεώσιμα υγρά καύσιμα μέχρι το 2030 αρχίζουν να ξεπερνιούνται και η αναμενόμενη εξελιγμένες τεχνολογίες μετατροπής λιγνοκυτταρινούχων υλικών σε αιθανόλη θα παρέχουν την δυνατότητα χρήσης διαφορετικών πρώτων υλών από τις σημερινές καλλιέργειες με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται η αγροτική γη σε βάρος των βρώσιμων προϊόντων. Στον Πίνακα Πίνακας II-1 του παραρτήματος παρουσιάζονται διάφορες 2ης γενιάς προκλήσεις, καθώς και οι πιθανές λύσεις τους.

III. Ραγδαίες εξελίξεις στον τομέα των βιοκαυσίμων γενικότερα

Σημαντικές πρόοδοι έχουν παρατηρηθεί τα τελευταία χρόνια στην παραγωγή βιοκαυσίμων όπως:

- Βιοντίζελ από μικροφύκη και μικρόβια.
- Χημικές οδοί για την παραγωγή μονοοξυγονωμένου C6 υγρού καυσίμου από υδρογονάνθρακες.
- Βιοϋδρογόνο
- Μικροβιακά κελιά καυσίμου: κατάργηση των μεσαζόντων φορέων ενέργειας.

2.2 Μελάσα

Ως "μελάσα" ορίζεται η τελική εκροή λαμβανόμενη κατά την παραγωγή ζάχαρης μετά από επανειλημμένη κρυσταλλοποίηση. Το ποσό της λαμβανόμενης μελάσας καθώς και η ποιότητα της, παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη φύση των τεύτλων (τοπικές συνθήκες ανάπτυξης και επιρροή από τις καιρικές συνθήκες) και την διαδικασία παραγωγής το εργοστάσιο ζάχαρης, όπως την αποτελεσματικότητα της διαύγασης, τη μέθοδο κρυσταλλοποίησης κατά τη διάρκεια του βρασμού και τον διαχωρισμό των κρυστάλλων ζάχαρης από το χαμηλής ποιότητας μίγμα (Olbrich, 1963).

2.2.1 Γενικές παρατηρήσεις

Λαμβάνοντας υπόψη την πρώτη ύλη, είναι σημαντικό να γίνει διαχωρισμός μεταξύ:

- της μελάσας από ζαχαρότευτλα και
- της μελάσας από ζαχαροκάλαμα.

η μέση σύνθεση των οποίων παρουσιάζεται στον Πίνακα Πίνακας III-2 του παραρτήματος.

Μπορούν να διακριθούν 4 είδη μελάσας προερχόμενης από ζαχαρότευτλα, τρία εκ των οποίων παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

- *ακατέργαστη ή πράσινη μελάσα*: σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της παραγωγής της ακατέργαστης ζάχαρης.
- *λευκή μελάσα*: λαμβάνεται από τα εργοστάσια τα οποία ξεπλένουν τους κίτρινους ακατέργαστους κρυστάλλους ζάχαρης με ατμό σε φυγοκεντρητές και παράγουν λευκή ζάχαρη.
- *εξευγενισμένη μελάσα*: είναι το αποτέλεσμα από την επαναραίωση και κρυσταλλοποίηση της ακατέργαστης ζάχαρης κατά την παραγωγή της ραφιναρισμένης ζάχαρης.
- *απορρίπτουσα Steffen ή αποσακχαροποιημένη μελάσα*: παράγεται κατά την αποσακχάρωση της μελάσας και αποτελεί μειωμένης εμπορικής σημασίας προϊόν.

Όσον αφορά τη χημική σύσταση των τριών κυρίων τύπων μελάσας από ζαχαρότευτλα, δεν παρουσιάζουν ουσιαστικές διαφορές, λαμβάνοντας υπόψη τις φυσικές μεταβολές στη σύνθεση.

2.2.2 Βασικά συστατικά

I. Νερό

Το νερό στη μελάσα είναι ως συνήθως μη δεσμευμένο, αλλά μέρος του παραμένει ως ενυδατωμένο ή ένυδρο νερό. Η εμπορική μελάσα έχει μία μέση περιεκτικότητα σε νερό της τάξης του 20%, ενώ τα πραγματικά τελικά προϊόντα του εργοστασίου περιέχουν 12 -17% νερού.

II. Υδρογονάνθρακες

Τα σάκχαρα στην μελάσα αποτελούνται κυρίως από σακχαρόζη, όμως εμφανίζονται και κάποια ιμβερτοσάκχαρα καθώς και ραφινόζη.

III. Μη σακχαρούχα συστατικά

Σε αυστηρή ορολογία, σύμφωνα με την τεχνολογία ζάχαρης, η κατηγορία των μη σακχαρούχων συστατικών περιλαμβάνει όλα τα συστατικά της μελάσας εκτός από την σακχαρόζη.

i. οργανικά

Αζωτούχες ουσίες. Κατά την εξαγωγή των σακχάρων από τις φέτες τεύτλων, τα αζωτούχα συστατικά μεταφέρονται στο διάλυμα - περίπου το ήμισυ του αζώτου από το διάλυμα διάχυσης βρίσκεται στην μελάσα. Το αζωτούχο τμήμα των τεύτλων αποτελεί περίπου το 1% ή περισσότερο του κύριου κορμού, που αντιστοιχεί σε άζωτο της τάξης 0,15 - 0,2%, αποτελούμενο από περίπου 20% αζωτούχα αμινοξέα, το μισό των οποίων αποτελείται από γλουταμινικό οξύ. Η περιεκτικότητα σε άζωτο της μελάσας τεύτλων κυμαίνεται από 1,2 έως 2,2%. Στον Πίνακα Πίνακας III-3 του παραρτήματος παρουσιάζεται σύμφωνα με έρευνα που έχει γίνει η αζωτούχος κατανομή της μελάσας (Olbrich, 1956).

Μη αζωτούχες ουσίες. Μεταξύ των μη αζωτούχων ουσιών, μαζί με τις πηκτίνες τεύτλων, είναι οι ημικυτταρίνες (αραβάνες και γαλακτάνες), καθώς και τα προϊόντα διάσπασης τους (αραβινόζη και γαλακτόζη). Σε αντίθεση με την πηκτίνη, τα υλικά αυτά δεν καθιζάνουν κατά τη διάρκεια της ενανθράκωσης και συνεπώς παρευρίσκονται στην μελάσα. Τα δικαρβοξυλικά οξέα που υπάρχουν στα τεύτλα καθώς και τα υδροκαρβοξυλικά οξέα, απομακρύνονται σε μεγάλο βαθμό κατά τη διάρκεια του καθαρισμού του χυμού, ενώ τα διάφορα πτητικά (μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό) βρίσκονται στη μελάσα, συνήθως σε πολύ μικρό βαθμό.

Οι *χρωστικές ουσίες* πρέπει να συμπεριληφθούν μεταξύ των μη σακχαρούχων οργανικών συστατικών της μελάσας. Παρόλο το γεγονός πως τα ζαχαρότευτλα δεν περιέχουν χρωστικές

ύλες, περιέχουν συστατικά τα οποία αντιδρώντας μπορούν να προσδώσουν χρώμα στη μελάσα. Ο βαθμός αποχρωματισμού, σχετίζεται κατά κύριο λόγο με το pH και τη θερμοκρασία. Ο αποχρωματισμός σακχαρούχων διαλυμάτων αυξάνεται με τριπλάσιο βαθμό για κάθε αύξηση θερμοκρασίας 10 °C. Οι χρωστικές ύλες που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της παραγωγής ζάχαρης μπορούν να διαχωριστούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Καραμελώδη υλικά
- Συμπλέγματα πολυφαινόλων-σιδήρου
- Μελανοϊδίνες
- Μελανίνες

ii. Ανόργανα

Η μελάσα περιέχει μεγάλη ποικιλία αλάτων. Τα ανόργανα αυτά υλικά αυξάνουν τη διαλυτότητα της μελάσας και είναι σημαντικά για τα παραγωγικά χαρακτηριστικά της.

Κολλοειδή. Αποτελούν ένα σύστημα διασποράς, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 0,1 έως 0,001 μ. Τα κολλοειδή σωματίδια στη μελάσα βρίσκονται μεταξύ των διηθήσιμων στερεών, της σκόνης και των αιωρούμενων στερεών και είναι πολύ δύσκολο να μετρηθούν και να προσδιοριστούν καθώς διαφέρουν πολύ σε μέγεθος και τύπο. Σύμφωνα με τον (Von Brodowski, 1929) τα κολλοειδή στη μελάσα ανέρχονται σε 1,07% κατά βάρος. Επιπρόσθετα μιας μικρής ποσότητας ανώτερων λιπαρών οξέων, δύο κλάσματα κολλοειδών τα οποία έχουν βρεθεί είναι:

- *τα μη αναστρέψιμα* (αδιάλυτα στο νερό), που χαρακτηρίζονται από οξέα ή έχουν επαμφοτερίζουσα φύση, έχουν έντονο σκούρο καφέ χρώμα και υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο.
- *και τα αναστρέψιμα* (διαλυτά στο νερό), με ουδέτερο χημικό χαρακτήρα, ανοικτό καφέ χρώμα και χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως το βάρος των αναστρέψιμων κολλοειδών υπερβαίνει εκείνο των μη αναστρέψιμων.

Αιωρούμενα σωματίδια. Υπάρχει μία ομαλή μετάβαση από την κολλοειδή φάση στο διασπαρμένο διάλυμα. Όσο καλύτερη είναι η φίλτρανση του διαλύματος στο εργοστάσιο ζάχαρης, τόσο μικρότερη και η περιεκτικότητα της μελάσας σε αιωρούμενα στερεά. Σε γενικές γραμμές η περιεκτικότητα σε στερεά για την μελάσα προερχόμενη από τεύτλα κυμαίνεται μεταξύ 0,3 - 0,5%. Για ολοκληρωτική απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων χρειάζεται αραίωση του αρχικού διαλύματος μελάσας 3 φορές του αρχικού όγκου καθώς και φίλτρανση.

2.2.3 Άλλες ιδιότητες της μελάσας

I. Ιξώδες

Το ιξώδες προσδιορίζεται ως η αντίσταση που προσφέρεται από ένα υγρό κατά την κίνηση του ή όταν ένα στερεό σώμα κινείται μέσα σε αυτό (Olbrich, 1956). Το μέσο απόλυτο ιξώδες της μελάσας από τεύτλα για πυκνότητα 75 - 82 brix σε θερμοκρασία 18 °C κυμαίνεται μεταξύ 40 - 600 poise (Πίνακας III-4 παραρτήματος) (Olbrich, 1956). Σε θερμοκρασία 10 °C, το ιξώδες της εργοστασιακής μελάσας είναι πιθανό να είναι τόσο μεγάλο ώστε να μην μπορεί πλέον να προσδιοριστεί με ιξωδόμετρα εκροής ή άλλα παρόμοια όργανα μέτρησης (Winkeler, 1954).

II. Ειδική θερμότητα

Η ειδική θερμότητα μιας ουσίας δίνει τον αριθμό των μονάδων θερμότητας που απαιτούνται ώστε να αυξηθεί η θερμοκρασία σώματος μάζας 1 kg κατά 1 °C υπό ατμοσφαιρική πίεση. Η συνήθης τιμή της ειδικής θερμότητας που δίνεται για την μελάσα είναι 0,5 (Olbrich, 1956). Στα σακχαρούχα διαλύματα η ειδική θερμότητα εξαρτάται από την θερμοκρασία, τη συγκέντρωση και τη σύνθεση(καθαρότητα) τους. Έχει διαπιστωθεί πως η ειδική θερμότητα μειώνεται, με αντίστοιχη αύξησης της συγκέντρωσης ακάθαρτων σακχαρούχων διαλυμάτων (Taegener, 1936).

III. Αύξηση του σημείου βρασμού

Έχει σημειωθεί πως η συμπεριφορά της μελάσας συνήθως διαφέρει σημαντικά από το διάλυμα καθαρής ζάχαρης. Αυτό συμβαίνει λόγω της σύστασης της μελάσας και ειδικότερα λόγω της περιεκτικότητας της σε μη σακχαρούχες ουσίες.

IV. Αλλαγές στο pH λόγω μεταβολής της θερμοκρασίας

Το pH της μελάσας αλλάζει σημαντικά με τη αλλαγή θερμοκρασίας, όπως και του νερού. Στην περίπτωση του νερού είναι γνωστό ότι η μεταβολή στο pH οφείλεται στη μεταβολή της σταθεράς διαστάσεως με την αλλαγή θερμοκρασίας. Το φυσικό νερό έχει ουδέτερο pH στους 22 °C, με την αύξηση της θερμοκρασίας όμως το ουδέτερο σημείο πέφτει, με αποτέλεσμα στους 100 °C να είναι 6,16 και στους 200 °C να είναι 5,7.

2.2.4 Αξιοποίηση της μελάσας

I. Γενική έρευνα

Η αξιοποίηση της μελάσας πάντοτε αποτελούσε μία επιθυμία των εργοστασίων παραγωγής ζάχαρης, λόγω του μεγάλου της ιξώδους όμως η επεξεργασία της γίνεται εξαιρετικά δύσκολη.

i. Ανάκτηση των σακχάρων

Πολλές είναι οι τεχνικές οι οποίες αναπτύχθηκαν κατά καιρούς για την ανάκτηση των σακχάρων που περιέχει η μελάσα, σήμερα όμως δεν εκδηλώνεται κανένα ενδιαφέρον για τις συγκεκριμένες τεχνικές. Νέες προτάσεις για την ανάκτηση ζάχαρης από μελάσα έχουν έρθει πρόσφατα από το Frellstedt. Ενδεικτικά αναφέρονται διάφορες τεχνικές οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς. (Olbrich, 1963)

- Saccharate process
- STEFFEN lime process
- Διαδικασία με χρήση ιονανταλλάκτη
- Διαδικασία με χρήση διαλυτή

ii. Χημική μετατροπή της ζάχαρης προερχόμενης από τη μελάσα

Μεταξύ όλων των άλλων διεργασιών για παραγωγή ζάχαρης από τη μελάσα, τεχνική σημασία έχει και η παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η ζάχαρη στη μελάσα μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ παρουσία περίσσειας ασβεστίου και υποβάλλοντας το διάλυμα σε υψηλή θερμοκρασία για επαρκές χρονικό διάστημα, κατά προτίμηση υπό πίεση.

iii. Βιοχημική χρήση της ζάχαρης από τη μελάσα

Οι βιοχημικές διεργασίες από τη χρήση της μελάσας είναι υψηλής τεχνικής και οικονομικής σημασίας. Στον Πίνακα Πίνακας III-5 του παραρτήματος παρουσιάζονται συνοπτικά διάφορα προϊόντα τα οποία μπορούν να εξαχθούν από τη μελάσα.

II. Ζύμωση της μελάσας

iv. Παραγωγή αιθανόλης

Μέχρι περίπου το 1880, η παρασκευή αλκοόλ ήταν η μοναδική βιομηχανική χρήση της μελάσας, μια διαδικασία που πραγματοποιείται σε αποστακτήρια. Οι διαδικασία ζύμωσης της μελάσας έχει υποστεί διάφορες αλλαγές με το πέρασμα των ετών. Οι πιο πρόσφατες εξελίξεις έχουν χαρακτηριστεί από τις προσπάθειες προς την κατεύθυνση:

- της αύξησης της απόδοσης της αλκοόλης
- της συνεχούς ζύμωσης
- τη χρησιμοποίηση και την ανάκτηση των παραπροϊόντων.

Η πείρα έχει αποδείξει πως μελάσα η οποία αποστειρώνεται για καθαρή ζύμωση, δίνει μικρότερη απόδοση αλκοόλ και ζύμης, ανάλογα με το χρόνο βρασμού και pH. Είναι πιθανό το πρόβλημα της αργής ζύμωσης της μελάσας να μην έχει λάβει τη δέουσα προσοχή σε διάφορες έρευνες. Σε παλαιότερες εποχές, παρεμβολές κατά τη διαδικασία, αποδίδονταν στην αντίσταση της μελάσας στη ζύμωση, συνήθως όμως η αστοχία οφειλόταν σε κακή διαχείριση της μαγιάς ή ανεπαρκείς συνθήκες καθαριότητας.

i. Παραγωγή γλυκερίνης

Στην απλή αλκοολική ζύμωση, περίπου το 3% του βάρους του σακχάρου μετατρέπεται σε γλυκερίνη, η οποία αντιπροσωπεύει θεωρητικά, ένα υποπροϊόν. Σε ασθενές αλκαλικό διάλυμα η ζύμωση μπορεί να οδηγείται με τέτοιο τρόπο ώστε η γλυκερίνη και η ακεταλδεΐδη να είναι τα κυρίαρχα προϊόντα, σε συνδυασμό με την αλκοόλη και το διοξείδιο του άνθρακα.

III. Βιομηχανία της ζύμης από τη μελάσα

Η εισαγωγή, περίπου 40 χρόνια πριν, της μελάσας ως πρωταρχικό υλικό για την παραγωγή ζύμης οδήγησε σε μια θεμελιώδη αλλαγή στον κλάδο αυτό, που κατέληξε σε κάποια τυποποίηση των διαδικασιών παραγωγής. Η μελάσα και κάποια φθηνότερα ανόργανα θρεπτικά συστατικά, ο αερισμός, το σύστημα τροφοδοσίας, η καλλιέργεια ζύμης, καθώς και ο διαχωρισμός σταδίων κατά τη διήθηση της ζύμης συνιστούν διακριτικά χαρακτηριστικά των σύγχρονων μεθόδων της παραγωγής ζύμης.

IV. Άλλες χρήσεις

Εκτός από τις χρήσεις της μελάσας που συζητήθηκαν στις προηγούμενες ενότητες, υπάρχουν ακόμα προτεινόμενες χρήσεις της οι οποίες μπορούν να βρουν πρακτική εφαρμογή όπως:

- χρήση μελάσας ως πρόσμιξη σε γυαλιστικά παπουτσιών.
- ως ποντικοφάρμακο
- σε κόλλες
- ως καύσιμο
- και σε υλικά πεζοδρόμησης

2.2.5 Διαφορές μεταξύ μελάσας ζαχαρότευτλων και ζαχαροκάλαμου

Τα κύρια συστατικά τα οποία βρίσκονται στην ίδια κατάσταση και στους δύο τύπους μελάσας, διαφέρουν ως προς την ποσοστιαία σχέση τους όπως φαίνονται στον Πίνακα 2.2-1. Σε γενικές γραμμές η μελάσα από τεύτλα έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε μη σακχαρούχα συστατικά. Το αντίθετο όμως συμβαίνει όσον αφορά τα σακχαρούχα όπου ανέρχονται σε περίπου 50% στην εμπορική μελάσα από ζαχαροκάλαμα.

Constituents (%)	Beet molasses ³⁷	Cane molasses ⁵
Dry substance	78–85	77–84
Total sugar as invert sugar	48–58	52–65
C	28–34	—
N	0.2–2.8	0.4–1.5
P ₂ O ₅	0.02–0.07	0.6–2.0
CaO	0.15–0.7	0.1–1.1
MgO	0.01–0.1	0.03–0.1
K ₂ O	2.2–4.5	2.6–5.0
SiO ₂	0.1–0.5	—
Al ₂ O ₃	0.005–0.06	—
Fe ₂ O ₃	0.001–0.02	—
Total ash	4–8	7–11

Πίνακας 2.2-1 Διαφορές στην σύσταση μελάσας από ζαχαροκάλαμα και τεύτλα(Olbrich, 1963)

Η μελάσα ζαχαροκάλαμων συνήθως έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε άλατα τα οποία είναι γνωστό πως επηρεάζουν θετικά την διαλυτότητα της ζάχαρης, η ολική αζωτούχος περιεκτικότητα στην μελάσα ζαχαροκάλαμων όμως είναι ιδιαίτερα χαμηλή.

2.3 Μικροοργανισμοί

2.3.1 Κύριοι αιθανολοπαραγωγικοί μικροοργανισμοί

Η βασική πρόκληση για την επιλογή ή την προσαρμογή ενός μικροοργανισμού για την παραγωγή αιθανόλης από μίγμα σακχάρων που προκύπτει από την υδρόλυση των λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών, είναι η εξής: οι καλύτεροι παραγωγοί αιθανόλης είναι δεν είναι ικανοί στην αξιοποίηση πεντοζών, ενώ τα είδη που μπορούν να μεταβολίσουν επαρκώς πεντόζες και εξόζες είναι λιγότερο παραγωγικοί στην μετατροπή σακχάρων σε αιθανόλη, εμφανίζουν χαμηλή ανοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης ή παράγουν ταυτόχρονα κατά τη ζύμωση υψηλές συγκεντρώσεις μεταβολιτών όπως οξικό και γαλακτικό οξύ, σε ποσότητες ικανές να θέσουν σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα της μετατροπής του υποστρώματος σε αιθανόλη (Lynd, 1996; Aristidou, 2007).

2.3.2 *Saccharomyces Cerevisiae*

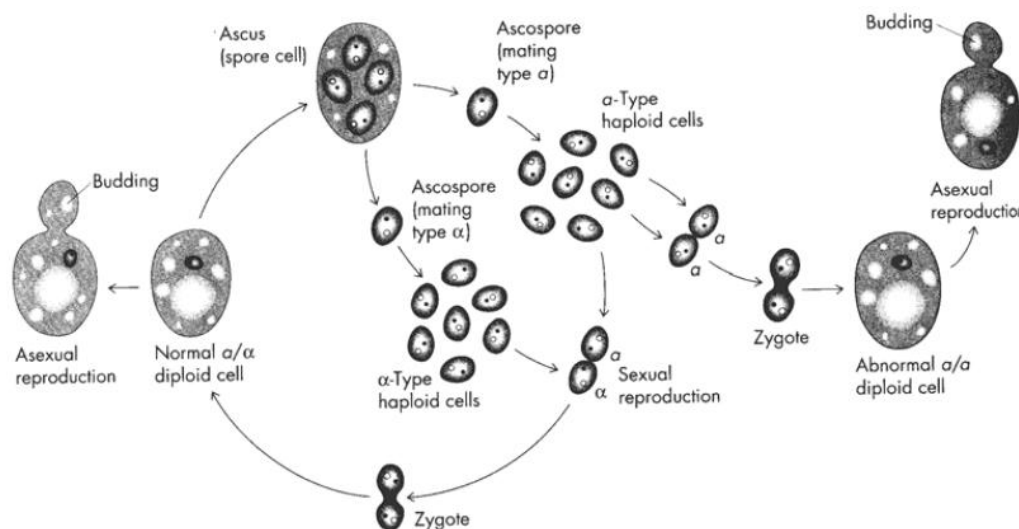
Η ονομασία "*Saccharomyces Cerevisiae*", μπορεί να διασπαστεί σε δύο λατινικές λέξεις, "*Saccharo*", που σημαίνει ζάχαρη και "*myces*", που σημαίνει μύκητας, ενώ "*Cerevisiae*", σημαίνει μπύρα, επομένως, μπορεί να μεταφραστεί ως ο "σακχαρούχος μύκητας της μπύρας" (VandenLangernberg, 2012).

Πρόκειται για την πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη, και αποτελεί τον μικροοργανισμό μελέτης στην παρούσα εργασία. Είναι μονοκύτταρος και μονοπύρηνος οργανισμός, με μήκος κυττάρου από 5-10μm.

Η συστηματική κατάταξη του *Saccharomyces Cerevisiae* (Παπανικολάου, 2006) είναι:

Βασίλειο:	Μύκητες
Φύλλο:	Μυκόφυτα
Κλάση:	Ασκομύκητες
Οικογένεια:	<i>Saccharomycetaceae</i>
Είδος:	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>

Ο βιολογικός κύκλος του *S. Cerevisiae* (Σχήμα 2.3-1), αποτελείται από δύο φάσεις: την απλοειδή και τη διπλοειδή.



Σχήμα 2.3-1 Ο βιολογικός κύκλος του *S. Cerevisiae* (Glazer & Nikaido, 1995)

Η καμπύλη αύξησης της ζύμης η οποία λαμβάνεται από την καλλιέργεια μιας παρτίδας περιλαμβάνει τις εξής φάσεις ανάπτυξης (Walker, 1998):

- *Λανθάνουσα φάση αύξησης:* Είναι μία περίοδος μηδενικής αύξησης και λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τον εμβολιασμό. Η φάση αυτή αντανakλά το χρόνο προσαρμογής των κυττάρων στο νέο περιβάλλον.
- *Επιταχυντική φάση αύξησης*
- *Εκθετική φάση αύξησης:* Ο ρυθμός αύξησης στη φάση αυτή είναι ο μέγιστος. Σε ζυμώσεις μιας παρτίδας η φάση αυτή είναι σχετικά μικρής διάρκειας λόγω εξάντλησης των θρεπτικών στοιχείων, υπερβολικής συσσωμάτωσης κυττάρων ή συσσώρευσης ανασταλτικών μεταβολιτών.
- *Επιβραδυντική φάση αύξησης*
- *Στατική φάση αύξησης:* Στη φάση αυτή, η μάζα της ζύμης παραμένει σχετικά σταθερή και υπάρχει η πιθανότητα μετά από μεγάλο σχετικά χρονικό διάστημα τα κύτταρα να νεκρωθούν και να αυτολυθούν.
- *Φάση θανάτου:* Όταν τα ενεργειακά αποθέματα εξαντλούνται, λαμβάνει χώρα η φάση θανάτου η οποία είναι εκθετική με αντίθετη κλίση προς τη λογαριθμική αύξηση.

Ο *S. Cerevisiae*, έχει την ικανότητα να ζυμώσει πληθώρα κοινών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων και των δισακχαριτών σουκρόζη και μαλτόζη. Τα υποστρώματα επεξεργάζονται με έναν από του δύο ακόλουθους πιθανούς μηχανισμούς. Οι δισακχαρίτες, είτε υδρολύονται από εξωκυτταρικά ένζυμα και οι μονοσακχαρίτες μεταφέρονται εντός του

κυττάρου, είτε οι δισακχαρίτες μεταφέρονται εξίσου εντός του κυττάρου και υδρολύονται από ενδοκυτταρικά ένζυμα.

Για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους οι ζύμες λαμβάνουν τα απαιτούμενα θρεπτικά συστατικά από το θρεπτικό τους μέσο το οποίο πρέπει να περιλαμβάνει νερό (τουλάχιστον σε ποσοστό 30%), πηγή άνθρακα και αζώτου, στοιχεία απαραίτητα για τη σύνθεση των κυτταρικών συστατικών όπως οξυγόνο, υδρογόνο, φώσφορος, μαγνήσιο και θείο, ιχνοστοιχεία, καθώς και βιταμίνες και αυξητικούς παράγοντες (Παπανικολάου, 2006).

2.3.3 Άλλοι μικροοργανισμοί για την παραγωγή βιοαιθανόλης

Τα βακτήρια είναι παραδοσιακά ανεπιθύμητα στην παραγωγή κρασιού καθώς αποτελούν παράγοντες αλλοίωσης. ενώ στην παραγωγή καύσιμης αιθανόλης θεωρούνται συχνά ως ρύποι σε μη αποστειρωμένα μίγματα όπου παράγουν γαλακτικά, τα οποία, σε υψηλές συγκεντρώσεις, αναστέλλουν την ανάπτυξη και παραγωγή αιθανόλης από τις ζύμες (Narendranath et al., 2001; Graves et al., 2006).

Παρόλο που τα βακτήρια είναι λιγότερο γνωστά ως αιθανολοπαραγωγοί, συγκριτικά με τις ζύμες, είδη όπως η *Escherichia*, *Klebsiella*, *Erwinia*, και *Zymomonas* βρίσκονται υπό μελέτη για βιομηχανική χρήση και έχουν υποστεί σε τεχνολογίες ανασυνδυασμένου DNA στο διάστημα των τελευταίων 25 χρόνων. Ακόμα μπορούν να δεχτούν και να μεταβολίσουν πεντόζες, καθώς και μία πληθώρα άλλων πηγών άνθρακα για την παραγωγή αιθανόλης (Mousdale, 2008).

2.4 Διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης

Η διαδικασία παραγωγής αιθανόλης περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια:

- Απομόνωση των περιεχόμενων σακχάρων από τις πρώτες ύλες με φυσικές, χημικές ή ενζυμικές μεθόδους.

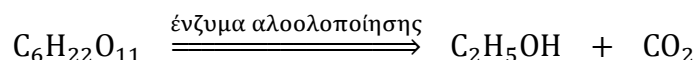
Αρχικά, απαιτείται μείωση του όγκου της διαθέσιμης βιομάζας για εύκολο και αποδοτικό χειρισμό της υδρόλυσης της. Ακολουθεί η διάσπαση της ημικυτταρίνης σε απλά σάκχαρα, καθώς και η υδρόλυση της κυτταρίνης. Το τελικό στάδιο, περιλαμβάνει τη ζύμωση των παραχθέντων πεντοζών. Η ξυλόζη είναι η κύρια πεντόζη που παράγεται από τη διάσπαση της ημικυτταρίνης.

Για λιγνοκυτταρινούχες και αμυλούχες πρώτες ύλες έχει προταθεί η ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση τους, για μειωμένο κόστος παραγωγής (Wyman, 1999). Το χαρτί, καθώς και άλλες πηγές λιγνοκυτταρίνης, είναι εν δυνάμει πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης και αποτελούν πάνω από το 50% της μάζας των αστικών στερεών απορριμμάτων (Παπανικολάου, 2006).

- Μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη, μέσω της αλκοολικής ζύμωσης

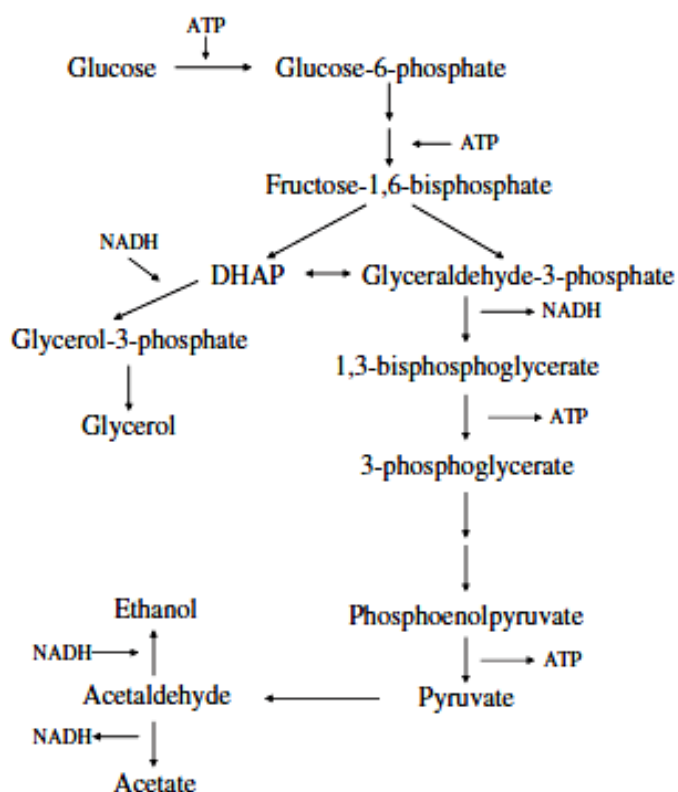
Στο στάδιο αυτό, οι δισακχαρίτες και τα απλά σάκχαρα που απελευθερώθηκαν κατά την κατεργασία που προηγήθηκε, χρησιμοποιούνται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς για την παραγωγή αιθανόλης και CO₂ με τη βοήθεια ενζύμων.

Οι δισακχαρίτες, όπως η σουκρόζη, διασπώνται αρχικά σε απλά σάκχαρα με τη βοήθεια του ενζύμου ιμπερτάση. Στη συνέχεια μετατρέπονται σε αιθανόλη και CO₂ σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση.



Η ζύμωση είναι μια μεταβολική διεργασία όπου πραγματοποιείται απουσία οξυγόνου και το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν είναι οργανικές ενώσεις. Στην αλκοολική ζύμωση το προτιμώμενο υπόστρωμα είναι η γλυκόζη και το προϊόν η αιθανόλη. Τα κύτταρα του *Saccharomyces Cerevisiae* όμως, προτιμούν να ζυμώνουν ακόμα και παρουσία οξυγόνου (Παπανικολάου, 2006).

Η θεωρητική απόδοση της αιθανόλης προσδιορίζεται περίπου στο 50%, όμως πρακτικά το ποσοστό είναι σημαντικά μικρότερο. Η αλκοολική ζύμωση γίνεται με έναν πολύπλοκο μηχανισμό, τα διάφορα στάδια του οποίου καταλύονται από μια σειρά ενζύμων. Τα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.4-1 Σχηματική απεικόνιση της μετατροπής της γλυκόζης σε αιθανόλη κατά τη διάρκεια μιας αλκοολικής ζύμωσης από τον *S. Cerevisiae* (Norberck & Blomberg, 1997)

- Ανάκτηση της αιθανόλης

Η συνήθης μέθοδος ανάκτησης της αιθανόλης είναι η απόσταξη. Η αιθανόλη διαχωρίζεται από το νερό με τη μέθοδο της κλασματικής απόσταξης καθώς το σημείο βρασμού της αιθανόλης (78,5°C) είναι αρκετά χαμηλότερο από εκείνο του νερού. Παράγεται όμως, αζεοτροπικό μίγμα περιεκτικότητας περίπου 95% σε αιθανόλη και 5% σε νερό, του οποίου ο διαχωρισμός απαιτεί χρήση άλλων τεχνικών. Άνυδρη αιθανόλη προκύπτει από το διάλυμα αιθανόλης μετά από σχηματισμό ενός άλλου, τριαδικού αζεοτροπικού μίγματος με βενζίνη.

2.5 Παράγοντες επίδρασης κατά τη διαδικασία της ζύμωσης

Εκτός από τα θρεπτικά συστατικά υπάρχει ακόμα και ένα σύνολο παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά την ανάπτυξη και δραστηριότητα των μικροοργανισμών γενικότερα και κατ' επέκταση των ζυμών (Παπανικολάου, 2006):

- Φυσιολογικοί παράγοντες

Σημαντικοί φυσιολογικοί παράγοντες οι οποίοι έχουν βρεθεί να επηρεάζουν την απόδοση της ζύμης στη ζύμωση είναι το οξυγόνο, το αφομοιώσιμο άζωτο, τα ιόντα μαγνησίου, καθώς και οι ενώσεις λιπιδίων.

- Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στρεσογόνοι παράγοντες ονομάζονται αυτοί που με την παρουσία τους επιδρούν αρνητικά στη λειτουργικότητα των κυττάρων των ζυμών. Υπάρχει πληθώρα στρεσογόνων παραγόντων, διακρίνονται όμως σε τρεις βασικές κατηγορίες, τους φυσικούς παράγοντες (θερμοκρασία, υψηλή οσμωτική πίεση, έλλειψη νερού), τους χημικούς παράγοντες (αιθανόλη, περιορισμένα θρεπτικά, οξειδωτικό στρες, pH) και τους βιολογικούς παράγοντες (γήρανση των κυττάρων, γονοτυπικές αλλαγές, ανταγωνισμός από άλλους μικροοργανισμούς).

Στην παρούσα εργασία θα αναλυθούν οι παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται και ενδιαφέρουν την βιομηχανία παραγωγής αιθανόλης, η θερμοκρασία, η οσμωτική πίεση και η αιθανόλη.

- *Επίδραση της θερμοκρασίας*

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι ζύμες αναπτύσσονται σε ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών, έξω από το οποίο είναι πιθανό να προκληθεί κυτταρικός θάνατος. Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι σχετικά σταθερή μέσα στο είδος. Όσον αφορά την *S. Cerevisiae* η μέγιστη θερμοκρασία κυμαίνεται από 35 - 43 °C. Παράγοντες όπως η πηγή άνθρακα, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, το δυναμικό του νερού του θρεπτικού μέσου και η παρουσία αιθανόλης και αυξητικών παραγόντων παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της μέγιστης θερμοκρασίας (Παπανικολάου, 2006).

Ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων της ζύμης επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία της ζύμωσης και ιδιαίτερα κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης. Για παράδειγμα, η κυτταρική διαίρεση έχει βρεθεί να συμβαίνει κάθε 12 h στους 10°C, ενώ μειώνεται σε κάθε 3 h σε θερμοκρασία 30°C. Ο ρυθμός κυτταρικής διαίρεσης επηρεάζεται επίσης από το pH και από τη συγκέντρωση του σακχάρου στον θρεπτικό μέσο (Jackson, 2008).

- *Ωσμωτική πίεση*

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων η επίδραση της οσμωτικής πίεσης καθυστερεί και είναι πιθανό ακόμα και να σταματήσει τη διαδικασία της ζύμωσης. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί πως υψηλό οσμωτικό δυναμικό αυξάνει την τοξικότητα της αιθανόλης (Jackson, 2008). Αναφερόμενοι στο υπερωσμωτικό στρες, ο *S. Cerevisiae* επανέρχεται με γλυκερόλη, η οποία αποτελεί και το κύριο συμβατικό ωσμωλυτικό μέσο στις ζύμες (Aranda et al., 2011).

- *Επίδραση της αιθανόλης:*

Η αιθανόλη όπως και άλλες αλκοόλες όταν συγκεντρώνονται στο θρεπτικό υλικό δρουν ως χημικοί στρεσογόνοι παράγοντες για τους μικροοργανισμούς. Η αιθανόλη μπορεί να αποβεί τοξική για τα κύτταρα των ζυμών σε συγκεντρώσεις 8 - 18% κ.β., γεγονός που εξαρτάται από το στέλεχος της ζύμης και τη μεταβολική κατάσταση της καλλιέργειας (Παπανικολάου, 2006). Η ζύμωση αναστέλλεται συνήθως πλήρως σε συγκεντρώσεις αιθανόλης περίπου 11% κ.ο. (Glazer & Nikaido, 1995).

Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διαφόρων στελεχών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη (You et al., 2003). Οι σημαντικότερες επιπτώσεις της αιθανόλης στη φυσιολογία του κυττάρου του *S. Cerevisiae* παρουσιάζονται στον Πίνακα IV-1. του παραρτήματος.

Η αιθανόλη κάποιες φορές προστίθεται στο ζυμώσιμο μέσο ή το κρασί, συνήθως στη μορφή αποσταγμένου οиноπνεύματος, για τον περιορισμό της δραστηριότητας της ζύμης ή οποιαδήποτε άλλης μικροβιακής δραστηριότητας.

Η συσσώρευση των αλκοολών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη διάλυση των ενώσεων φαινόλης. Η εκχύλιση των φαινολικών ενισχύεται ακόμα περισσότερο παρουσία θειικού οξέος.

Διάφορες πτητικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένης και της αιθανόλης, απομακρύνονται από το διάλυμα με το διοξείδιο του άνθρακα. Η απώλεια αιθανόλης κυμαίνεται περίπου από 1-1.5% της παραγόμενης (Williams & Boulton, 1983) αλλά μεταβάλλεται με τα σάκχαρα και τη θερμοκρασία (Jackson, 2008).

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Μικροοργανισμοί

Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Chardonnay MV95203 του μικροοργανισμού *Saccharomyces Cerevisiae*, το οποίο παραχωρήθηκε από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και Βιομηχανικών Ζυμώσεων, Τμήμα του Τμήματος Οινολογίας και Τεχν. Ποτών του ΤΕΙ Αθήνας.

Για τη συντήρηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σταθεροποίηση και διατήρηση σε ξηρό μέρος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, για την ανάπτυξη και σταθεροποίηση τους ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.1, "Ανάπτυξη ζυμωτικού μικροοργανισμού". Υπό τη μορφή αυτή είναι δυνατή η φύλαξη του, απουσία υγρασίας, για διάστημα έως και 4 έτη.

3.2 Πρώτες ύλες και χημικά Αντιδραστήρια

Η μελάσα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι παραπροϊόν από την παραγωγή ζάχαρης της Ελληνικής Βιομηχανίας Ζάχαρης (EBZ). Για τα πλαίσια της ερευνητικής εργασίας ποσότητα μελάσας παραχωρήθηκε από εισαγωγέα ζωοτροφών στο Ρέθυμνο.

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μελάσας από τη Διεύθυνση Τεχνικών Υπηρεσιών της EBZ είναι τα ακόλουθα:

Bx	78 - 80 %
Pol	44 - 48 %
Ολικά σάκχαρα %	48 - 52 %
Ιμβερτοσάκχαρο	0.150 - 0.500 %
pH	7.2 - 8.5
Τέφρα	12 - 14 %
Πυκνότητα	1.38 - 1.42 g/cm ³

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προϊόντα των εταιριών Sigma-aldrich και Fluka (ΗΠΑ).

3.3 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

Στα πλαίσια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα εργαστηριακά όργανα:

- Γυάλινες φιάλες Schott - Duran χωρητικότητας 500 και 250mL
- Γυάλινες κωνικές φιάλες
- Ογκομετρικοί σωλήνες, πιπέτες αυτόματες και μη
- Αποστειρωτήρας / αυτόκαυστο Stericlav - 75
- Ηλεκτρονικούς ζυγούς ακριβείας
- Φασματοφωτόμετρο
- pH-μετρο
- Επωαστήρα της εταιρείας HERAUS
- Υδατόλουτρο MEMMENT WB/OB 7 - 45 WBU

3.4 Αναλυτικές Μέθοδοι

3.4.1 Μέτρηση pH

Το pH των δειγμάτων μετράται με αδιάβροχο πεχάμετρο χειρός (HI 98127) της εταιρείας Hanna.

Οι τεχνικές του προδιαγραφές είναι:

Εύρος	-2.0 έως 16 pH
Ακρίβεια (@20°C)	0.1 pH
Τυπική απόκλιση EMC	±0.1pH, 0.5°C
Αντιστάθμιση θερμοκρασίας	Αυτόματη
Περιβάλλον λειτουργίας	-5 έως 50°C
Καλιμπράρισμα	Ενός ή δύο σημείων
Ηλεκτρόδιο	HI 73127

3.4.2 Εκτίμηση μικροβιακής ανάπτυξης

Για την αύξηση μάζας του χρησιμοποιούμενου μικροοργανισμού μετράται η προσρόφηση αραιωμένου διαλύματος σε μήκος κύματος 600nm και στη συνέχεια ανάγεται σε κύτταρα ανά mL (Cfu/mL) σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της ναφοράς δεν βρέθηκε.** του παραρτήματος).

3.4.3 Μέτρηση ολικών σακχάρων

Μέθοδος φαινόλης-θειικού οξέος (Dubois, et al., 1956)

Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός πως τα απλά ή σύνθετα σάκχαρα, καθώς και τα παράγωγά τους, συμπεριλαμβανομένων των μεθυλεστέρων με ελεύθερες αναγωγικές ομάδες ή δυνητικά ελεύθερες, όταν επεξεργάζονται με φαινόλη και πυκνό θειικό οξύ δημιουργούν ένα κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι αρκετά ευαίσθητη και το χρώμα σταθερό (Toledo et al., 2012).

Η αλλαγή του χρώματος του διαλύματος μετράται στο ορατό φάσμα και είναι ανάλογη με την ποσότητα των σακχάρων στο δείγμα.

Η συγκέντρωση των ολικών σακχάρων προσδιορίζεται με φασματοφωτομετρικό τρόπο σε μήκος κύματος 490nm. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται από 10 έως και 100μg ολικών σακχάρων και η ποσοτικοποίηση(αναφορά στην αντίστοιχη συγκέντρωση) γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης(Διάγραμμα V-2 του παραρτήματος), η οποία κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας γλυκόζη ως πρότυπο.

Αντιδραστήριο:

- Διάλυμα φαινόλης 5% w/v
- Πυκνό θειικό οξύ (95%, p/v)

Μεθοδολογία:

Σε δείγμα συγκέντρωσης 100μg/mL, προσθέτονται 0,5mL διαλύματος φαινόλης 5%, ανακινείται καλά και στη συνέχεια προσθέτονται 2.5mL πυκνού θειικού οξέος. Το δείγμα ανακινείται ξανά και αφήνεται σε υδατόλουτρο στους 25°C για 15 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης μετράται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 490nm (Toledo et al., 2012).

3.4.4 Μέτρηση αναγωγικών σακχάρων

Μέθοδος 3,5 Δινιτροσαλικυλικού οξέος (Miller, 1959)

Η συγκεκριμένη μέθοδος αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Summer and Sisler (1944) και στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τον Miller (1959).

Τα σάκχαρα δρουν ως χημικοί αναγωγείς λόγω παρουσίας ελεύθερων ομάδων αλδεΐδης ή κετόνης στο μόριο τους. Σε αλκαλικό περιβάλλον, τα αναγωγικά σάκχαρα έχουν την δυνατότητα να μειώσουν το 3,5 δινιτροσαλικυλικό οξύ σε 3-άμινο-5 νιτροσαλικυλικό οξύ(πορτοκαλί χρώμα), του οποίου η χρωματική ένταση εξαρτάται από τη συγκέντρωση σε αναγωγικά σάκχαρα.

Το υδροξείδιο του νατρίου που προστίθεται προσαρμόζει το περιβάλλον ώστε να γίνει η απαραίτητη αντίδραση της γλυκόζης με το 3,5 δινιτροσαλικυλικό οξύ.

Η ευαισθησία της μεθόδου είναι από 100 έως 500μg/mL των αναγωγικών σακχάρων. Ως πρότυπο χρησιμοποιείται η γλυκόζη ή η φρουκτόζη για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης (Toledo et al., 2012).

Αντιδραστήριο (Α):

- 1% δινιτροσαλικυλικό οξύ (dinitrosalicylic acid)
- 0,05% θειούχο νάτριο (sodium sulfite)
- 1% υδροξείδιο του νατρίου (sodium hydroxide)

Αντιδραστήριο (Β):

- τρυγικό κάλιο νάτριο (potassium sodium tartrate) 40%(Rochelle salt)

Μεθοδολογία:

Σε 3mL δείγματος προσθέτονται 3mL του αντιδραστηρίου (Α). Το μίγμα θερμαίνεται επί 15 λεπτά σε λουτρό ζέοντος ύδατος. Μετά το χρόνο επώασης προστίθεται το αντιδραστήριο (Β) και στη συνέχεια ψύχεται με νερό βρύσης έως ότου επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που προκύπτει φασματοφωτομετράται στα 575 nm.

Παρατηρήσεις:

Όσον αφορά την αποθήκευση του αντιδραστηρίου χρειάζεται προσοχή, καθώς τείνει σταδιακά να μειώνεται η αποτελεσματικότητα του λόγω της ατμοσφαιρικής οξειδωσης του θειικού νατρίου. Η δράση αυτή μπορεί να αποφευχθεί παρασκευάζοντας το αντιδραστήριο σε μεγάλη ποσότητα χωρίς όμως το θειικό και προσθέτοντας το στην απαιτούμενη ποσότητα του αντιδραστηρίου, ακριβώς πριν τη χρήση του.

3.4.5 Μέτρηση παραγόμενης αιθανόλης

Η μέθοδος προσδιορισμού της παραγόμενης αιθανόλης συνιστάται από μία χρωματική αντίδραση, μεταξύ της αιθανόλης και του χρωμιούχου νατρίου. Ο χρωματομετρικός αυτός προσδιορισμός βασίζεται στο σχηματισμό του πράσινου χρώματος των ιόντων χρωμίου που προκύπτουν από την επεξεργασία της αιθανόλης και του διχρωμικού νατρίου ως περιοριστική αντιδρούσα ουσία, παρουσία θειικού οξέος και ρυθμιστικού οξικού διαλύματος με pH 4,3.

Η μέθοδος μέτρησης της αιθανόλης έχει βασιστεί σε αποτελέσματα του (Sandip et al., 2012), μετά όμως από πειραματικές δοκιμές έχουν γίνει κάποιες τροποποιήσεις στα αρχικά αντιδραστήρια καθώς και στον απαιτούμενο χρόνο επώασης.

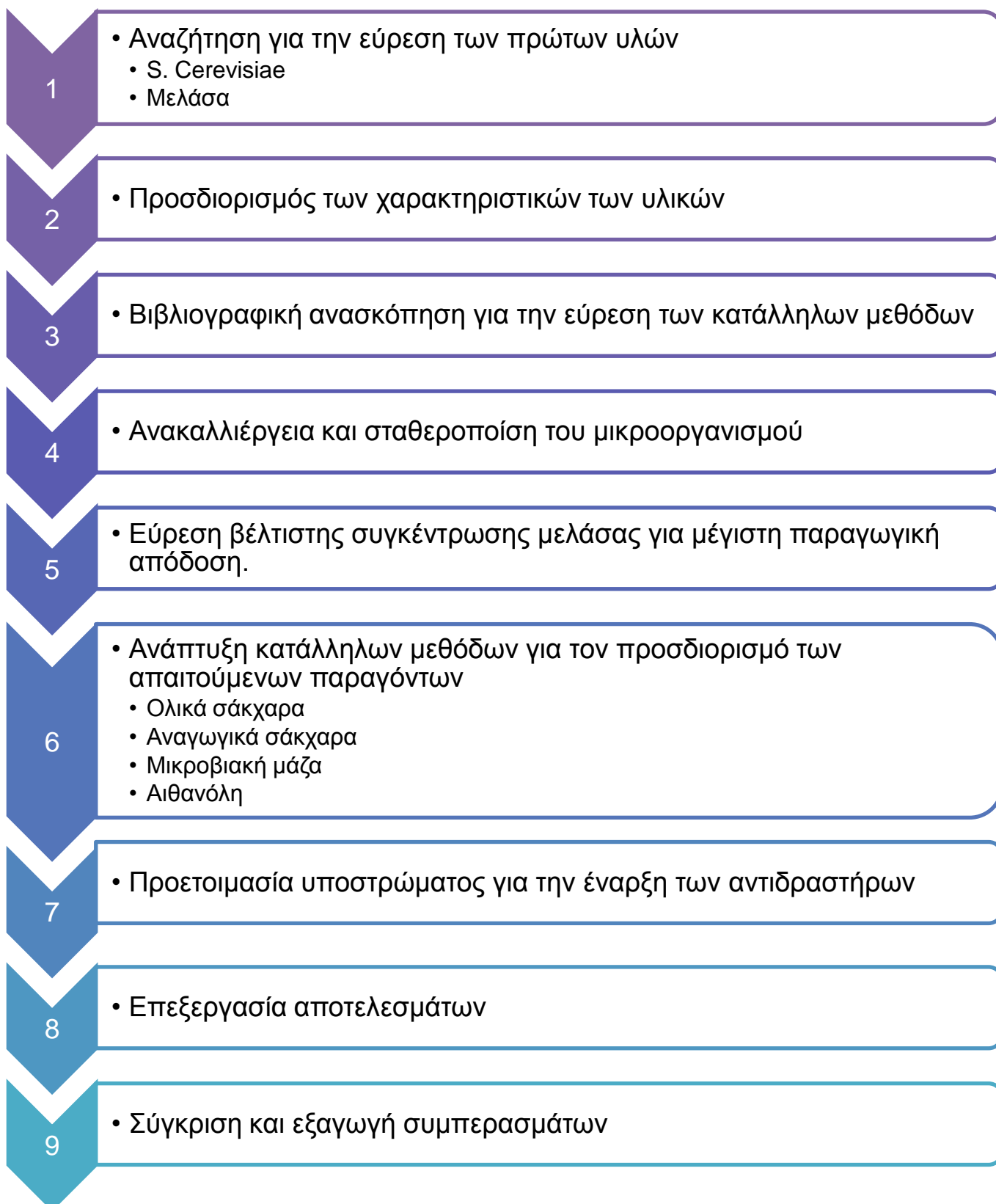
Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *Διχρωμικό Νάτριο* $C=40 \text{ mg/mL}$. Περίπου 4 g διχρωμικού νατρίου τα οποία έχουν προηγουμένως αποξηρανθεί στους 120°C για 3 h διαλύονται σε 100 mL απιονισμένου νερού ώστε να επιτευχθεί η τελική συγκέντρωση.
- *Οξικό ρυθμιστικό διάλυμα* ($\text{pH}=4,3$). Το ρυθμιστικό διάλυμα παρασκευάζεται σύμφωνα με τις "US pharmacopoeia specifications".
- *Διάλυμα πυκνού θειικού οξέος*

Για την εφαρμογή της μεθόδου, σε ένα δείγμα συγκέντρωσης αιθανόλης από 0,6 - 1,9 mg/mL προστίθενται 1 mL διαλύματος διχρωμικού νατρίου, 1 mL ρυθμιστικού οξικού διαλύματος, και 4 mL πυκνού θειικού οξέος. Το μίγμα ανακινείται ελαφρώς για περίπου 1 λεπτό και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για διάστημα 90 λεπτών. Ακολούθως, φασματοφωτομετράται σε μήκος κύματος 578nm.

Η απορρόφηση που μετράται μετατρέπεται σε συγκέντρωση αιθανόλης σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη (Διάγραμμα V-3 του παραρτήματος)

3.5 Πειραματική Διαδικασία



3.5.1 Ανάπτυξη ζυμωτικού μικροοργανισμού

Η ανάπτυξη του *S. Cerevisiae*, πραγματοποιήθηκε σε υγρή καλλιέργεια και στη συνέχεια απομονώθηκαν τα κύτταρα του από την υγρή φάση μέσω της διαδικασίας της λυοφιλοποίησης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

- Αερόβια καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό με σύσταση: εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) 4 g/L, Πεπτόνη 5 g/L, Γλυκόζη 20 g/L. Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C και πίεση 1,1-1,2 atm για διάρκεια 30 min και έπειτα εμβολιάστηκε με κυτταρικό αιώρημα ζύμης και επωάστηκε για 24 h στους 30 °C.
- Στη συνέχεια αφού το δείγμα μοιράστηκε εξίσου σε δοκιμαστικούς σωλήνες (Falcon) των 50 mL, φυγοκεντρήθηκε σε ταχύτητα 8.000 rpm για 5 min.
- Μετά την απόρριψη του επιφανειακού υγρού, οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το φυγοκεντρημένο στερεό δείγμα εναποτίθεται για 24 h σε βαθιά κατάψυξη στους -80 °C.
- Τέλος πραγματοποιείται εξάχνωση του στερεοποιημένου υγρού μέσω της διαδικασίας της λυοφυλοποίησης, υπό συνθήκες κενού αέρος στους -54 °C για τουλάχιστον 24 h.

Το εναπομείναν στερεό υλικό αποτελεί τα μικροβιακά κύτταρα τα οποία συλλέγονται και φυλάσσονται σε γυάλινο μπουκαλάκι σε ξηρό περιβάλλον.

Για τις απαιτήσεις του πειράματος πραγματοποιήθηκαν συνολικά 12,7 L υγρής καλλιέργειας για την παραγωγή 12,24 g σκόνης μικροοργανισμού.

3.5.2 Στάδιο διερεύνησης

Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει τον αρχικό προσδιορισμό των χαρακτηριστικών του υποστρώματος (μελάσα), την ανάπτυξη των μεθόδων μέτρησης των διαφόρων παραγόντων, καθώς και την πραγματοποίηση δοκιμαστικού πειράματος για τον προσδιορισμό των επιθυμητών συνθηκών ζύμωσης.

I. Βαθμονόμηση πειραματικών μεθόδων

Όσον αφορά τον προσδιορισμό των διαφόρων παραγόντων της μελάσας, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που αναλύθηκαν παραπάνω (παράγραφος 3.4, Αναλυτικές Μέθοδοι) και καθώς ήταν άγνωστη η συγκέντρωση στο διάλυμα, διερευνήθηκε η απαιτούμενη αραίωση, ώστε η κάθε παράμετρος να βρίσκεται εντός των ορίων της μεθόδου.

Συγκεκριμένα οι αραιώσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρουσιάζονται παρακάτω.

- Αναγωγικά σάκχαρα (1:100)
- Ολικά σάκχαρα (1:500)
- Ανάπτυξη μικροβιακής μάζας (1:100)
- Αιθανόλη (1:100)

II. Διερεύνηση βέλτιστης συγκέντρωσης υποστρώματος

Στο στάδιο αυτό μελετάται η συγκέντρωση υποστρώματος, στην οποία ο δεδομένος μικροοργανισμός (*S. Cerevisiae*), παρουσιάζει τις βέλτιστες ζυμωτικές αποδόσεις. Για το λόγο αυτό διεξάχθηκε μία σειρά δοκιμαστικού πειράματος σε θερμοκρασία 30°C, στις οποίες, ο μοναδικός μεταβλητός παράγοντας ήταν η συγκέντρωση της μελάσας. Στον **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.** παρουσιάζονται αναλυτικά 1 πειραματικές συνθήκες.

Αντιδραστήρας	Συγκέντρωση Μελάσας (%)	Μάζα Μικροοργανισμών (g/L)
1	0	1
2	10	1
3	20	1
4	30	1
5	40	1
6	50	1

Πίνακας 3.5-1 Πειραματικές συνθήκες δοκιμαστικής ζύμωσης

Μεθοδολογία:

Κατάλληλη ποσότητα μελάσας ογκομετρείται και τοποθετείται σε γυάλινο μπουκαλάκι με πώμα των 250mL. Στη συνέχεια πληρώνεται με απιονισμένο νερό έως τα 200mL. Ακολουθεί η ρύθμιση του pH στο 4,5 με αραιό υδροχλωρικό οξύ (HCl) 9,25% και η αποστείρωση του διαλύματος πριν τον εμβολιασμό των μικροοργανισμών. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως κατά την αποστείρωση, λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας, μεταβάλλεται το pH κατά 2 περίπου βαθμούς.

Μετά τον εμβολιασμό, τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, με σταθερή θερμοκρασία στους 30°C και ανακίνηση του διαλύματος προς αποφυγή φαινομένων καθίζησης. Η λήψη δείγματος γίνεται κάθε 12 h, σε διάστημα 4 ημερών (96 h), για μέτρηση των παραμέτρων: ολικών και αναγωγικών σακχάρων και μικροβιακής ανάπτυξης, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 3.4, Αναλυτικές Μέθοδοι. Επίσης γίνεται εκτίμηση του pH

και ρύθμιση του στο 4,5 όποτε είναι αναγκαίο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Παράγραφο 4.2.

3.5.3 Ζύμωση σε ημιαερόβιες συνθήκες, απουσία θρεπτικών

Η διαδικασία της ζύμωσης, πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο σε αναερόβιες συνθήκες. Έχει παρατηρηθεί όμως, πως τα κύτταρα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (*Saccharomyces Cerevisiae*) προτιμούν να ζυμώνουν ακόμα και παρουσία οξυγόνου (Παπανικολάου, 2006). Για το λόγο αυτό η πρώτη σειρά πειραμάτων επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί σε ημιαερόβιες συνθήκες και απουσία επιπρόσθετων θρεπτικών συστατικών. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούταν αποκλειστικά από μελάσα και απιονισμένο νερό.

Μεθοδολογία:

Ακολουθώντας την διαδικασία η οποία αναλύθηκε παραπάνω (παράγραφο 3.5.2, Στάδιο διερεύνησης), παρασκευάζονται υποστρώματα μελάσας συγκέντρωσης από 0 έως 30%, όπως φαίνονται στον Πίνακας 3.5-1 Πειραματικές συνθήκες 1ου πειράματος. Το διάλυμα συγκέντρωσης 0%, αποτελείται από απιονισμένο νερό και χρησιμοποιείται ως τυφλό δείγμα. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως υπήρχε ένα τυφλό δείγμα για κάθε συγκέντρωση μικροοργανισμού, όπου στη συγκεκριμένη σειρά ο εμβολιασμός έγινε σε 3 διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκε η ζύμωση ήταν 25°C, ενώ το pH διατηρήθηκε σταθερό στο 4,5.

Αντιδραστήρας	Συγκέντρωση Μελάσας (%)	Αρχική Συγκέντρωση Μικροοργανισμών (g/L)
1	0	0.5
2	10	0.5
3	20	0.5
4	30	0.5
5	0	1
6	10	1
7	20	1
8	30	1
9	0	2
10	10	2
11	20	2
12	30	2

Πίνακας 3.5-1 Πειραματικές συνθήκες 1ου πειράματος

Η λήψη δείγματος γίνεται κάθε 12 h, για διάστημα 3 ημερών (72 h), για μέτρηση των παραμέτρων: ολικών και αναγωγικών σακχάρων, μικροβιακής ανάπτυξης και pH, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 3.4, Αναλυτικές Μέθοδοι. Τα αποτελέσματα αναλύονται στην Παράγραφο 3.5.3.

3.5.4 Ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες, παρουσία θρεπτικών

Υπό αναερόβιες συνθήκες επαναλήφθηκε το πρώτο πείραμα τροποποιώντας σε μικρό βαθμό κάποιες παραμέτρους.

- Παρασκευάστηκε ένα μόνο τυφλό δείγμα (αντιδραστήρας 1), με τη μέση αρχική συγκέντρωση ζυμωτικού μικροοργανισμού.
- Υπήρχε ένα συγκριτικό τεχνητό διάλυμα γλυκόζης (αντιδραστήρας 2) συγκέντρωσης 18%, το οποίο προσομοιάζει τις βέλτιστες συνθήκες φυσικού υποστρώματος μελάσας (30%) και μικροοργανισμού (2g/L).
- Παρασκευάστηκε επαναληπτικό διάλυμα (αντιδραστήρας 8) το οποίο αντιστοιχούσε τη μέση κατάσταση, δηλαδή είχε τα ίδια χαρακτηριστικά με τον αντιδραστήρα 7, με 20% συγκέντρωση μελάσας και 1g/L αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού.

Ακόμα, έγινε προσθήκη θρεπτικών συστατικών, οι οποίες βοηθούν στην καλύτερη και ταχύτερη προσαρμογή του μικροοργανισμού στο δεδομένο υπόστρωμα. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του κάθε διαλύματος/αντιδραστήρα φαίνονται στον Πίνακα 3.5-1.

Αντιδραστήρας	Συγκέντρωση Μελάσας (%)	Γλυκόζη (%)	Αρχική Συγκέντρωση Μικροοργανισμών (g/L)	Πεπτόνη (g/L)	Yeast extract (g/L)
1	0	-	1	5	4
2	-	18	2	5	4
3	10	-	0.5	5	4
4	20	-	0.5	5	4
5	30	-	0.5	5	4
6	10	-	1	5	4
7	20	-	1	5	4
8	20	-	1	5	4
9	30	-	1	5	4
10	10	-	2	5	4
11	20	-	2	5	4
12	30	-	2	5	4


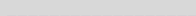


Πίνακας 3.5-1 Πειραματικές συνθήκες 2ου πειράματος

4 Αποτελέσματα & Συζήτηση

4.1 Κωδικοποίηση αποτελεσμάτων

Για την κωδικοποίηση των διαγραμμάτων που παρατίθενται στην συγκεκριμένη παράγραφο των αποτελεσμάτων, γίνεται αναφορά, με χρήση πινάκων στην παράγραφο 3.5, Πειραματική Διαδικασία.

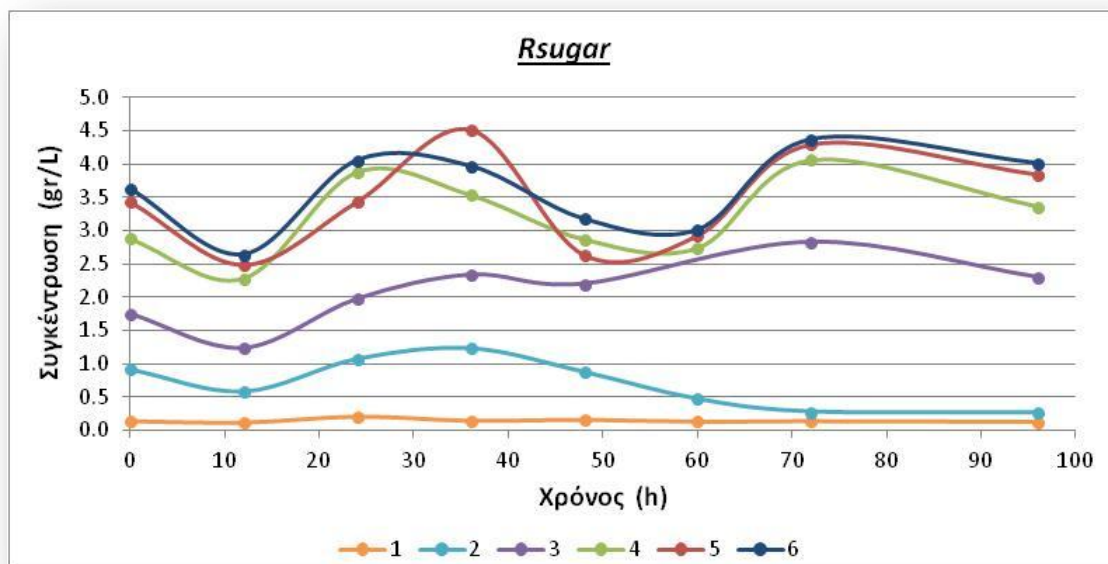
Προς διευκόλυνση του αναγνώστη έχει χρησιμοποιηθεί ενιαία μορφή κατά την παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα η συγκέντρωση της μελάσας εκφράζεται με τα χρώματα όπως εμφανίζονται στον Πίνακας 4.1-1, ενώ η διαφορετική αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών με χρήση διαφορετικού τόνου του συγκεκριμένου χρώματος.

Συγκέντρωση μελάσας (%)	Χρώμα
0	
10	
20	
30	
40	
50	

Πίνακας 4.1-1 Χρωματική κωδικοποίηση διαγραμμάτων

4.2 Στάδιο διερεύνησης

Τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στο σημείο αυτό αποτελούν επεξεργασία των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του εύρους συγκέντρωσης της υποστρώματος (μελάσας), όπου το συγκεκριμένο στέλεχος μικροοργανισμού (*Saccharomyces Cerevisiae*, Chardonne MV95203) εμφανίζει τη μέγιστη παραγωγικότητα.

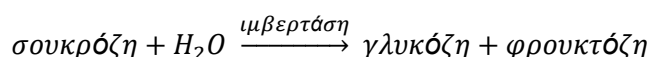


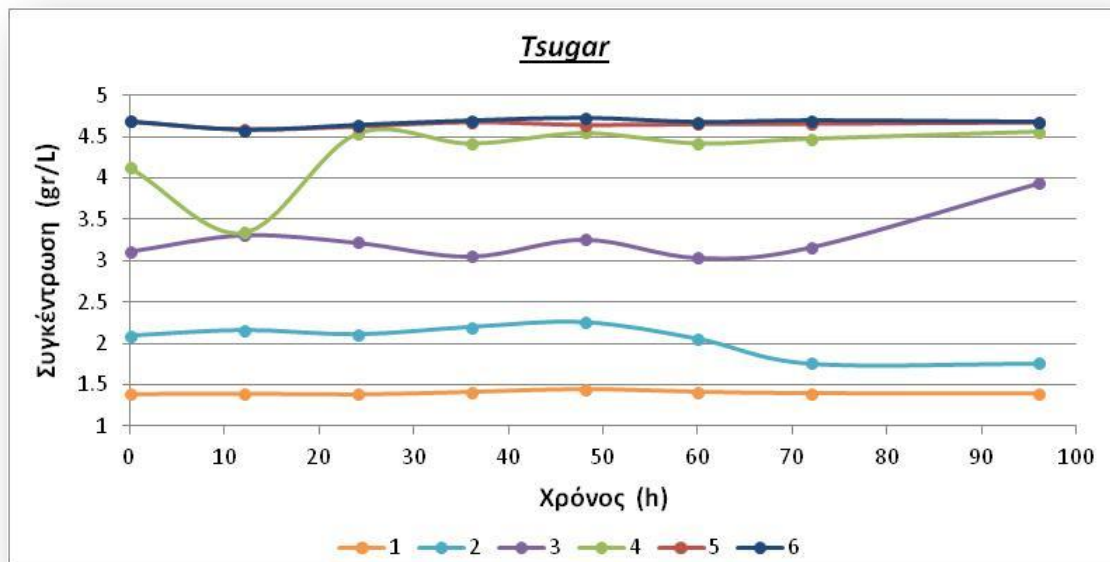
Διάγραμμα 4.2-1 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο (Διερευνητικό Πείραμα)

Έχοντας ως δεδομένο πως η αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού παραμένει ίδια σε όλα τα διαλύματα (αντιδραστήρες), φαίνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος να επηρεάζει σημαντικά την προσαρμοστικότητα του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, για συγκέντρωση 10% (γαλάζια γραμμή, 2) παρουσιάζεται έναρξη της ζυμωτικής διαδικασίας από τις 36 h και έπειτα, ενώ στα υπόλοιπα αντιδραστήρια καθυστερεί έως και τις 72 h. Ο μεγάλος αυτός χρόνος προσαρμογής είναι πιθανό να οφείλεται στην υψηλή πυκνότητα του διαλύματος.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, πως τόσο η συμπεριφορά όσο και η συγκέντρωση των αναγωγικών σακχάρων σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη από 30% σε μελάσα, μεταβάλλεται σε πολύ μικρό βαθμό.

Ακόμα παρατηρείται μία γενική τάση αύξησης των αναγωγικών σακχάρων κατά το αρχικό στάδιο της ζύμωσης, το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς η σουκρόζη (δισακχαρίτης, μη ανάγων σάκχαρο) η οποία περιέχεται στη μελάσα, υδρολύεται σταδιακά, με τη βοήθεια του ενζύμου ιμβερτάση, σε γλυκόζη και φρουκτόζη σύμφωνα με την αντίδραση:

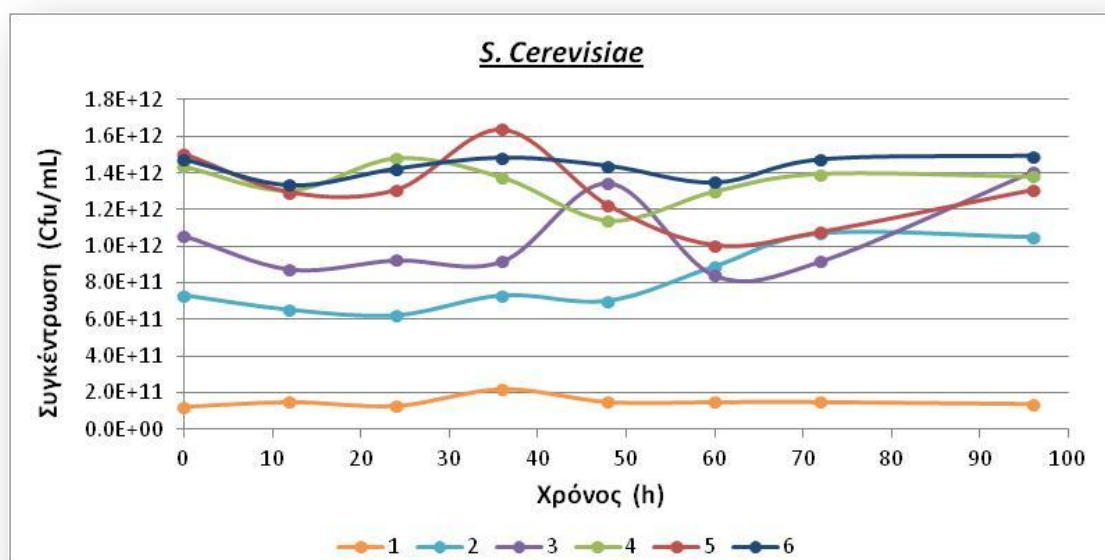




Διάγραμμα 4.2-2 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο(Διερευνητικό Πείραμα)

Για την ορθότερη εκτίμηση όμως της συμπεριφοράς του μικροοργανισμού, κυρίως στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μελάσας, απαιτείται ο συνυπολογισμός και των παραμέτρων, ολικά σάκχαρα και ανάπτυξη μικροβιακής μάζας.

Όσον αφορά τη μεταβολή των ολικών σακχάρων, παρατηρείται μία ανάλογη συμπεριφορά με αυτής των αναγωγικών, με τα αντιδραστήρια συγκέντρωσης μελάσας 30-50% να εμφανίζουν σχεδόν μηδενική μεταβολή.



Διάγραμμα 4.2-3 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο (Διερευνητικό Πείραμα)

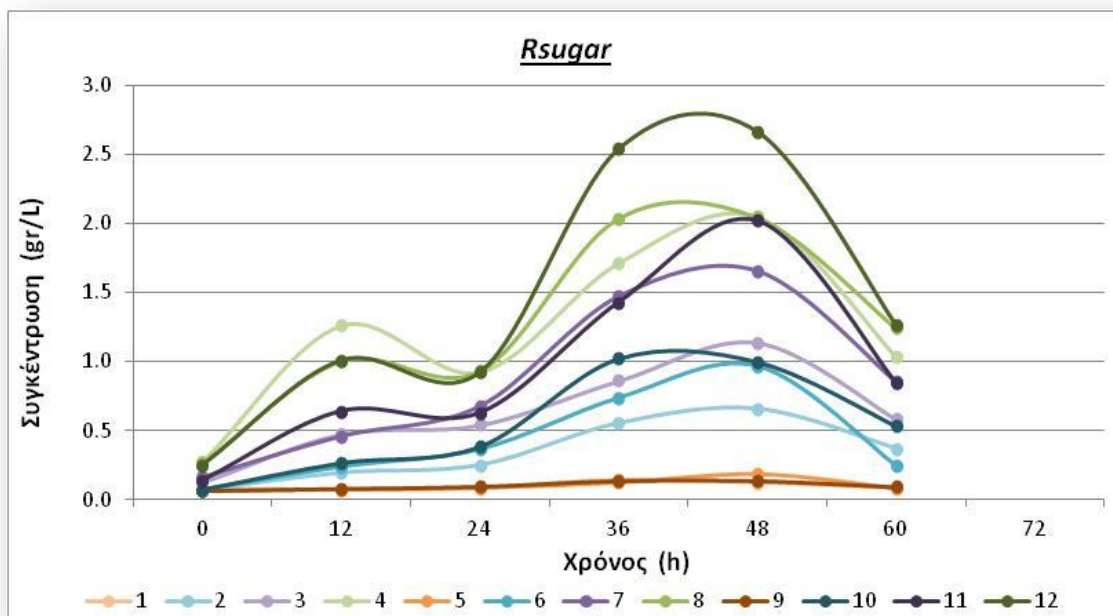
Τέλος, αυξητική τάση ανάπτυξης παρουσιάζουν κυρίως τα διαλύματα συγκέντρωσης μελάσας 10 20 και 50% (γαλάζια μοβ και κόκκινη γραμμή), ενώ τα υπόλοιπα, όπως και προηγουμένως δεν μεταβάλλονται σημαντικά.

Για τους λόγους που αναλύθηκαν στη συγκεκριμένη παράγραφο, ο σχεδιασμός των κυρίως πειραμάτων έγινε με συγκεντρώσεις μελάσας 10, 20 και 30%. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως οι τιμές αυτές επαληθεύτηκαν και με άλλες πειραματικές μελέτες που έχουν δημοσιευτεί.

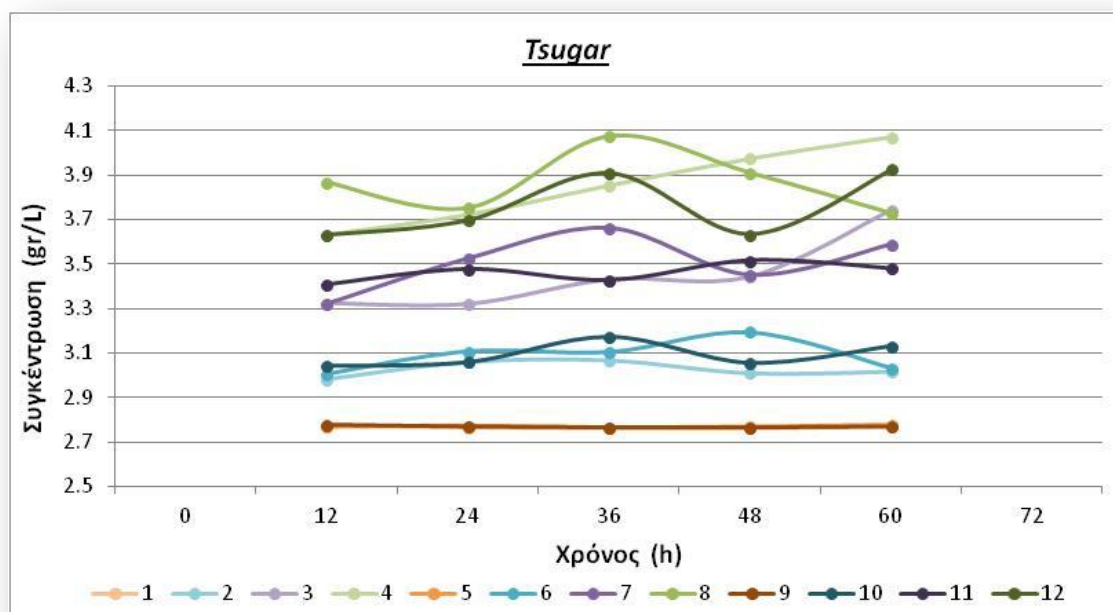
Η αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκε στο δοκιμαστικό πείραμα ήταν 1g/L και συνεπώς ο σχεδιασμός των ακόλουθων πειραμάτων, βασιζόμενος σε αυτό, έγινε επιλέγοντας συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 2g/L αρχικής συγκέντρωσης μικροοργανισμού.

4.3 Ζύμωση σε ημιαερόβιες συνθήκες, απουσία θρεπτικών

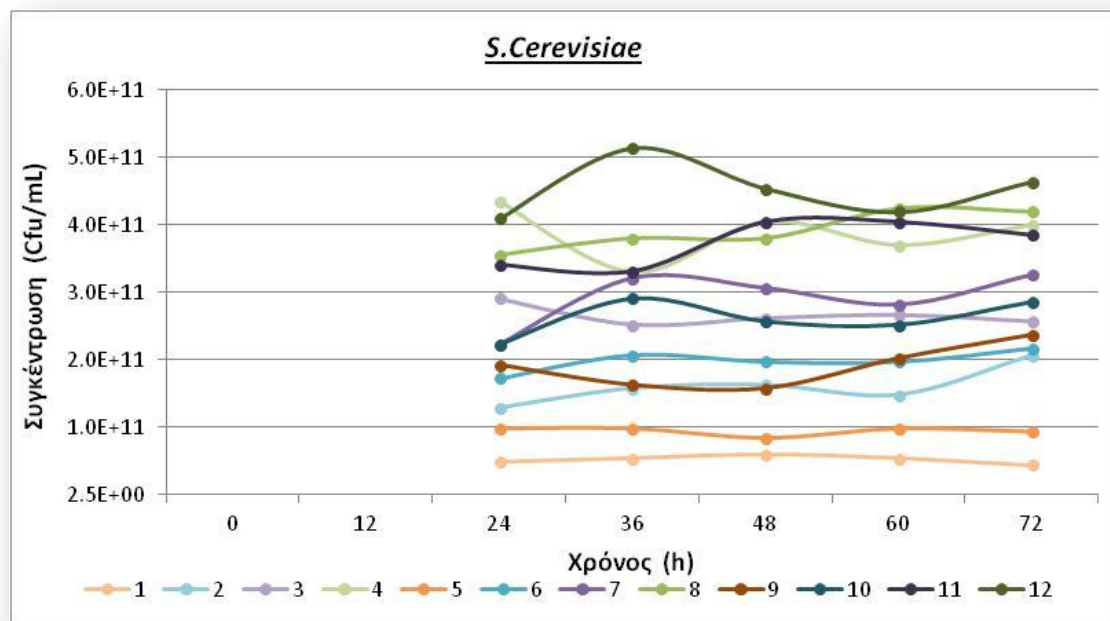
Η ζύμωση σε ημιαερόβιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως μοναδικό υπόστρωμα τη μελάσα σε θερμοκρασία 25°C. Παρόλο που η ζύμωση, γίνεται κατά βάση σε αναερόβιες συνθήκες, έχει διαπιστωθεί πως ο μικροοργανισμός *Saccharomyces Cerevisiae*, προτιμάει να ζυμώνει ακόμα και παρουσία οξυγόνου.



Διάγραμμα 4.3-1 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο (Πείραμα 1)



Διάγραμμα 4.3-2 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο (Πείραμα 1)



Διάγραμμα 4.3-3 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας
σε συνάρτηση με το χρόνο (Πείραμα 1)

Τα αποτελέσματα είναι αρκετά ενθαρρυντικά, καθώς παρουσιάζεται μία ενιαία συμπεριφορά στο σύνολο των αντιδραστών, με απότομη μείωση των αναγωγικών σακχάρων μετά τις πρώτες 48 ώρες. Η αρχική αυξητική τάση όπως προαναφέρθηκε (παράγραφος 4.2, Στάδιο διερεύνησης) είναι αναμενόμενη, ενώ ο αρχικός χρόνος προσαρμογής συμπίπτει σε γενικές γραμμές με αυτόν του προηγούμενου πειράματος.

Δυστυχώς όμως, τα διαγράμματα των ολικών σακχάρων και της ανάπτυξης του μικροοργανισμού, δεν δικαιολογούν την απότομη μείωση των αναγωγικών σακχάρων, η οποία θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα.

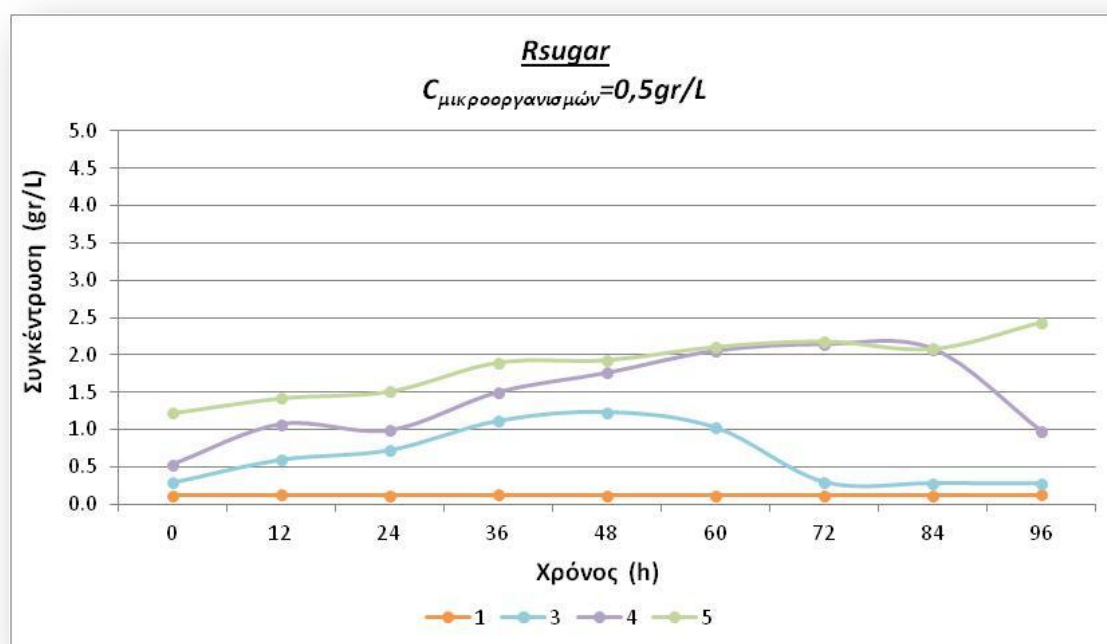
Τέτοια δραστηριότητα θα έπρεπε να ακολουθείται από αντίστοιχη εκθετική αύξηση της μικροβιακής μάζας, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στο Διάγραμμα 4.3-3. Παρόλα αυτά, παρατηρείται μία ενδεικτική μικροβιακή αύξηση. Το γεγονός πως δεν υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση των δύο μεταβλητών, είναι πιθανό να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα.

4.4 Ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες, παρουσία θρεπτικών

Καθώς τα αποτελέσματα του 1ου πειράματος, αν και ενθαρρυντικά, δεν επιβεβαιώνονται από τη διεθνή βιβλιογραφία, εξετάστηκε η διαδικασία της ζύμωσης σε θερμοκρασία 30°C υπό αναερόβιες συνθήκες. Προστέθηκαν ακόμα και θρεπτικά συστατικά (αναφέρονται στην παράγραφο 3.5.4), με σκοπό τη μείωση της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης του μικροοργανισμού και την αύξηση της παραγωγικής απόδοσης.

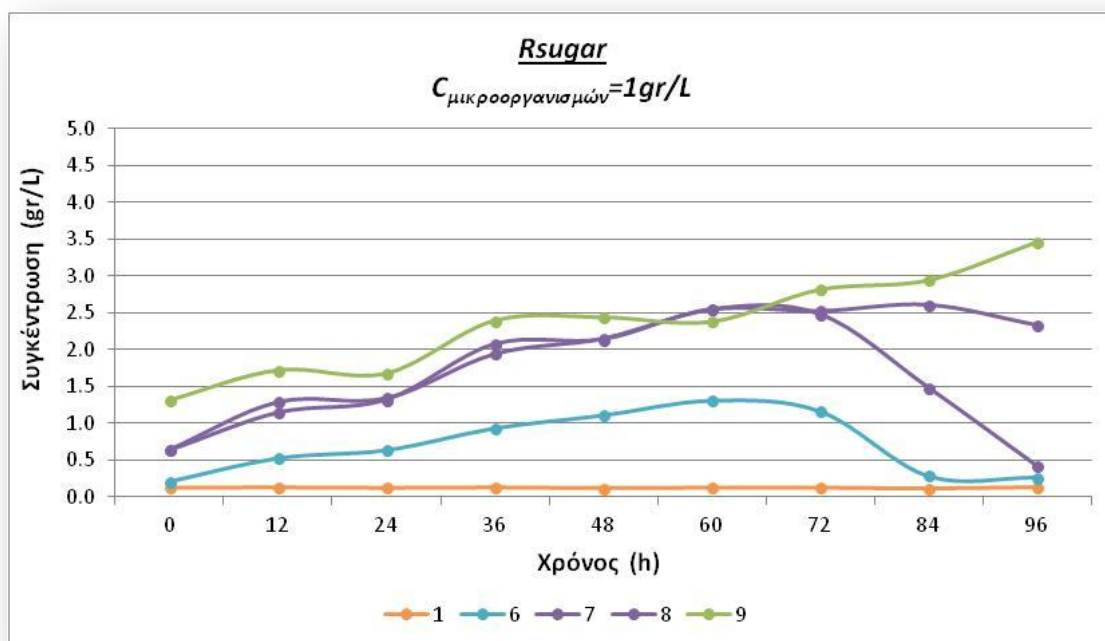
Για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων, έχει γίνει διαχωρισμός με βάση τόσο την αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού, όσο και τη συγκέντρωση της μελάσας στο διάλυμα, προς αποφυγή δημιουργίας δυσνόητων διαγραμμάτων.

- i. Παρουσίαση αποτελεσμάτων με βάση την αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού
- Διαγράμματα αναγωγικών σακχάρων

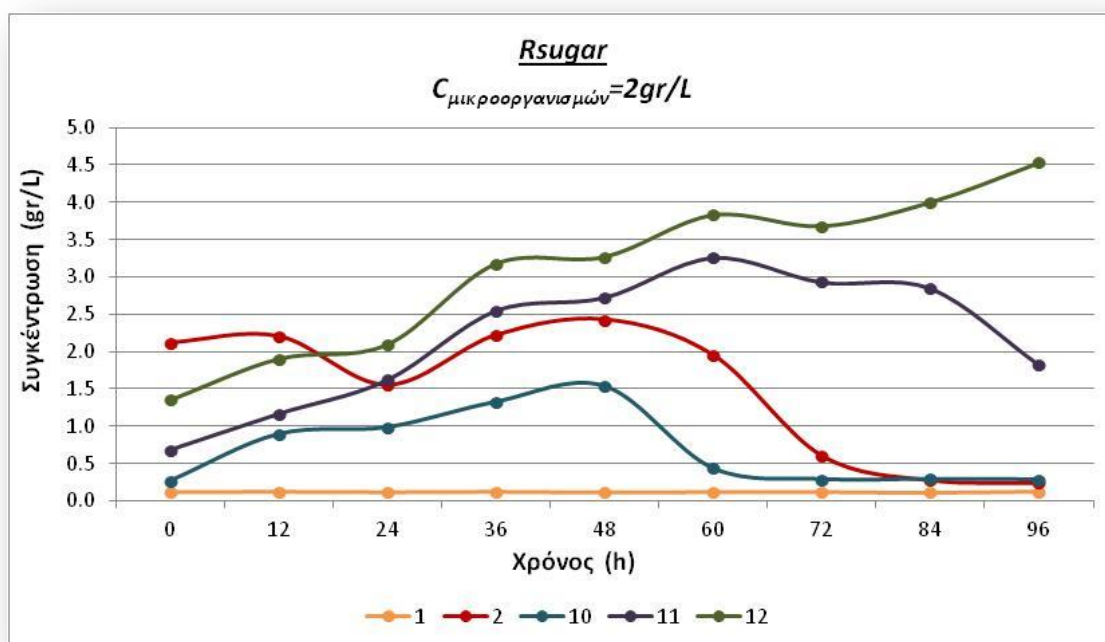


Διάγραμμα 4.4-1 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού 0,5g/L (Πείραμα 2)

Όπως διαπιστώθηκε και στα προηγούμενα πειράματα, δεδομένης της αρχικής συγκέντρωσης του ζυμωτικού μικροοργανισμού, υπάρχει διαφορετική απόκριση, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της μελάσας. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ανάλογη αύξηση της διάρκειας της λανθάνουσας φάσης με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



Διάγραμμα 4.4-2 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού 1g/L (Πείραμα 2)

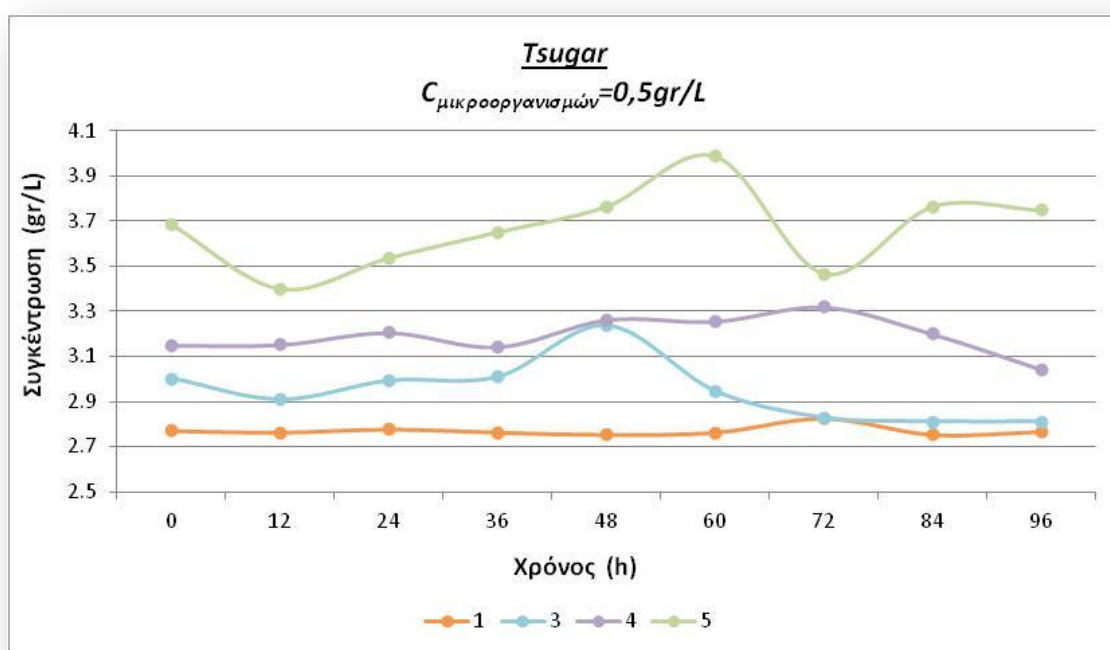


Διάγραμμα 4.4-3 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού 2g/L (Πείραμα 2)

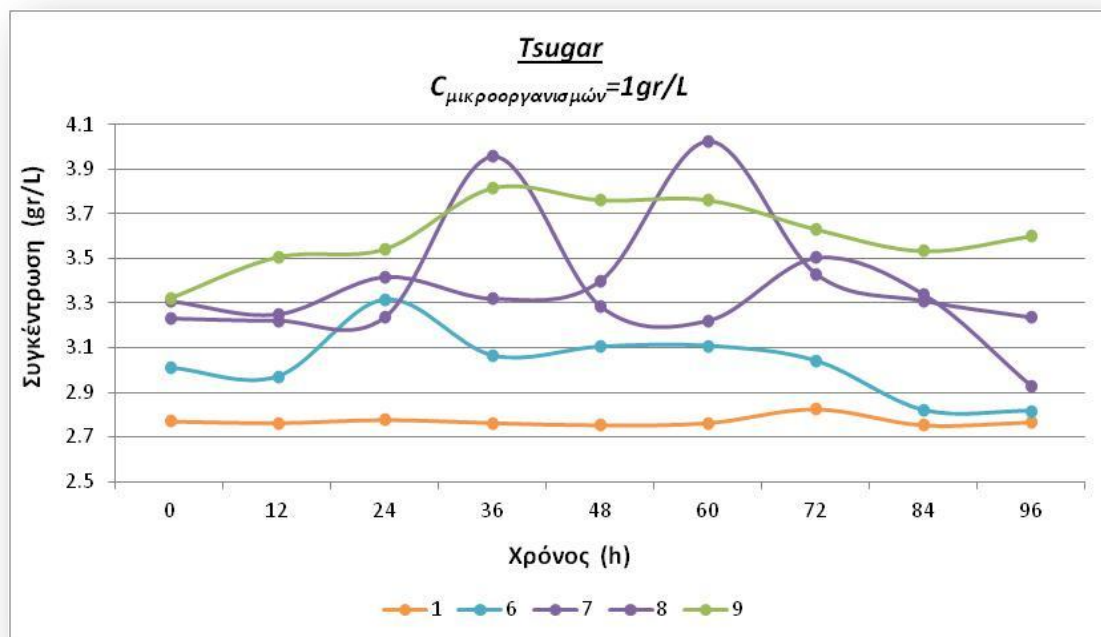
Από τα Διάγραμμα 4.4-1, Διάγραμμα 4.4-2 και Διάγραμμα 4.4-3, παρατηρείται, μία ανάλογη αύξηση της παραγόμενης συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων συναρτήσει της αρχικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού. Αυτό, οφείλεται στο γεγονός πως ο *Saccharomyces Cerevisiae*, είναι πηγή του ένζυμου ιμβερτάση, το οποίο είναι υπεύθυνο για την υδρόλυση της σουκρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη (αναγωγικά σάκχαρα).

Τα επαναληπτικά αντιδραστήρια 7 και 8 του Διάγραμμα 4.4-2 παρουσιάζουν τη μέση κατάσταση του πειράματος. Ενώ συμπίπτουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, το σημείο έναρξης της απότομης μεταβολικής δραστηριότητας διαφέρει. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε επιμόλυνση του διαλύματος κατά τη λήψη του δείγματος, η οποία προκάλεσε προσωρινή αναστολή της ανάπτυξης της ζύμης.

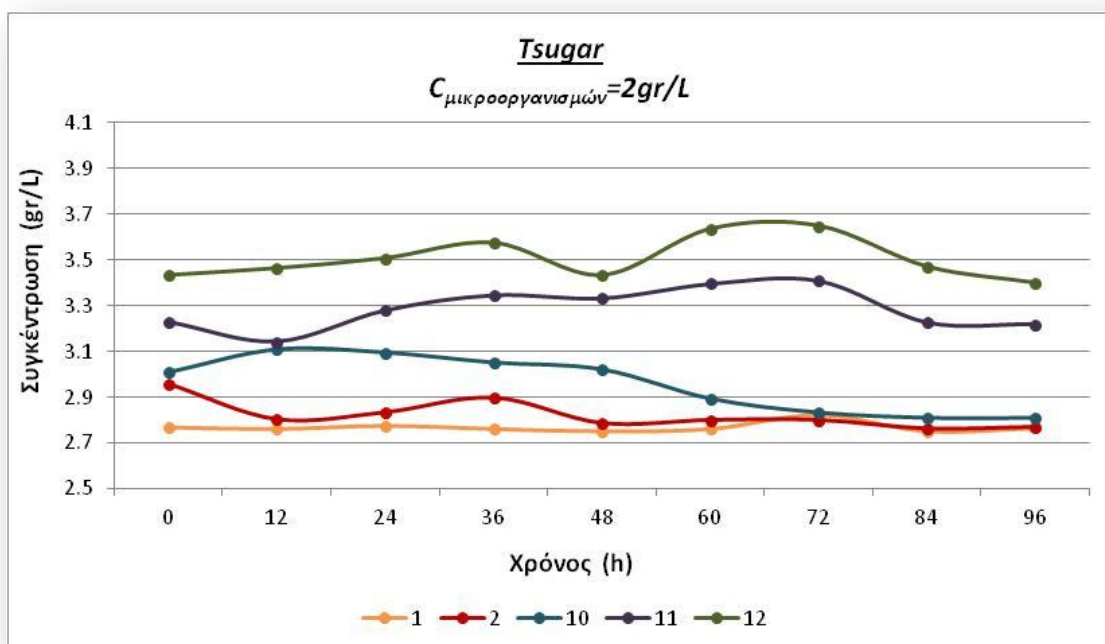
- Διαγράμματα ολικών σακχάρων



Διάγραμμα 4.4-4 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού 0,5g/L (Πείραμα 2)



Διάγραμμα 4.4-5 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού 1g/L (Πείραμα 2)



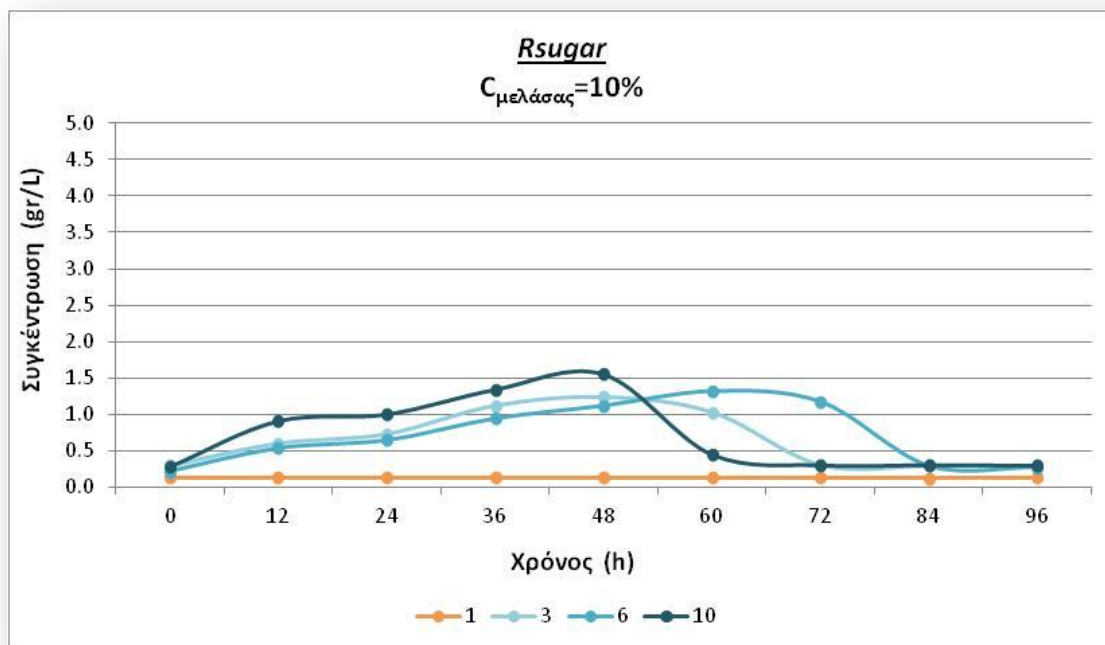
Διάγραμμα 4.4-6 Μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού 2g/L (Πείραμα 2)

Οι καμπύλες των ολικών σακχάρων φαίνονται να επαληθεύουν την παρουσία ζυμωτικής δραστηριότητας που παρουσιάζεται στα αντίστοιχα διαγράμματα των αναγωγικών, οι μεταβολές της συγκέντρωσής τους όμως δεν είναι τόσο διακριτές. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει η συνεχής υδρόλυση της φρουκτόζης. Καθώς από ένα μόριο

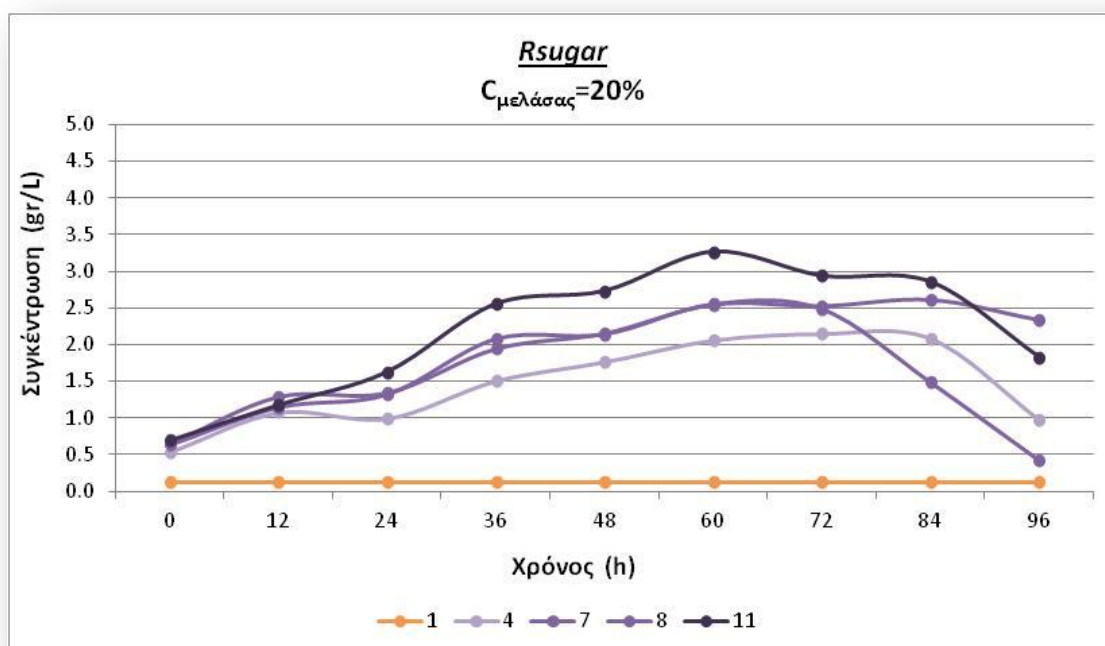
σουκρόζης παράγονται ένα μόριο γλυκόζης και ένα φρουκτόζης (2 μόρια), κατά την χρωματομετρική μέθοδο προσδιορισμού των ολικών σακχάρων θα μπορούσε να υφίσταται το συγκεκριμένο αποτέλεσμα.

ii. Παρουσίαση διαγραμμάτων με βάση τη συγκέντρωση της μελάσας

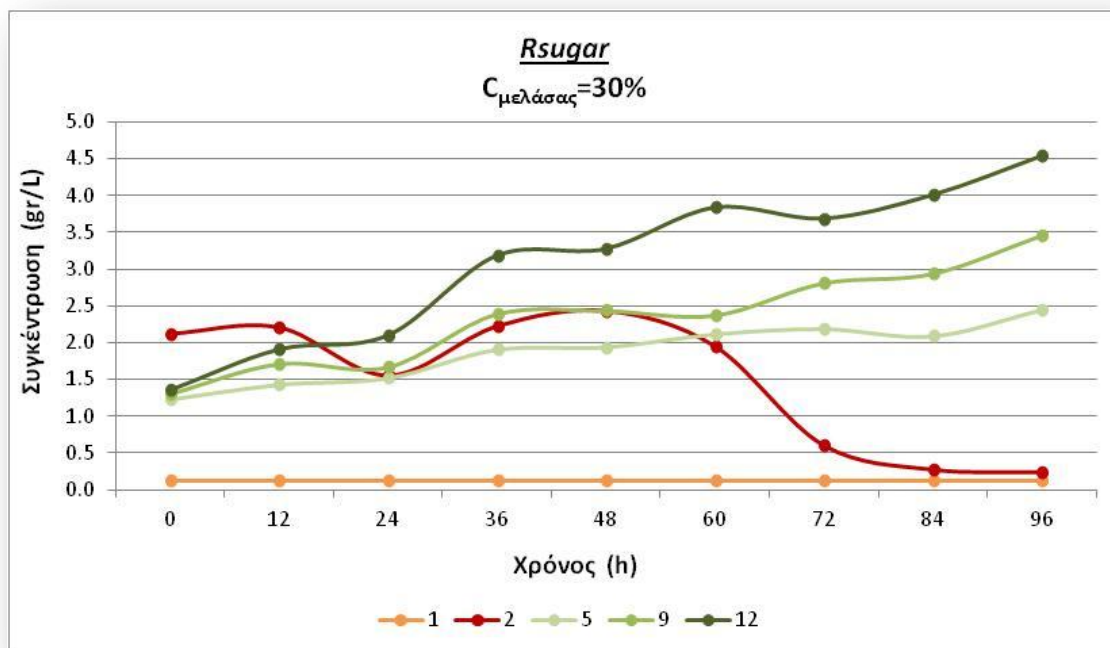
- Διαγράμματα αναγωγικών σακχάρων



Διάγραμμα 4.4-7 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 10% (Πείραμα 2)



Διάγραμμα 4.4-8 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 20% (Πείραμα 2)

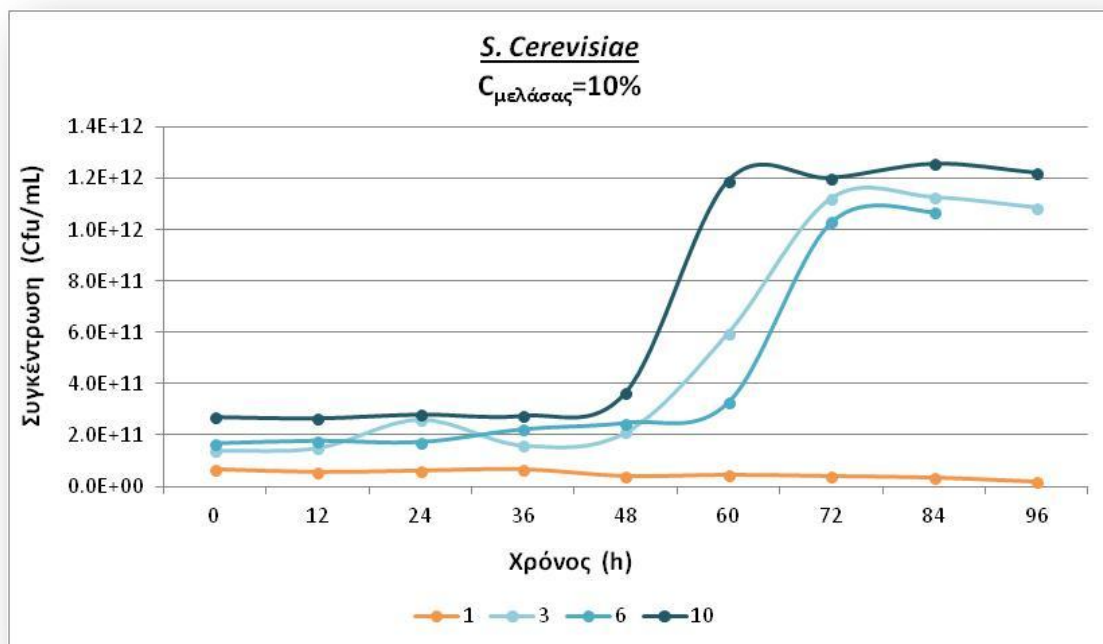


Διάγραμμα 4.4-9 Μεταβολή της συγκέντρωσης των αναγωγικών σακχάρων σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 30% (Πείραμα 2)

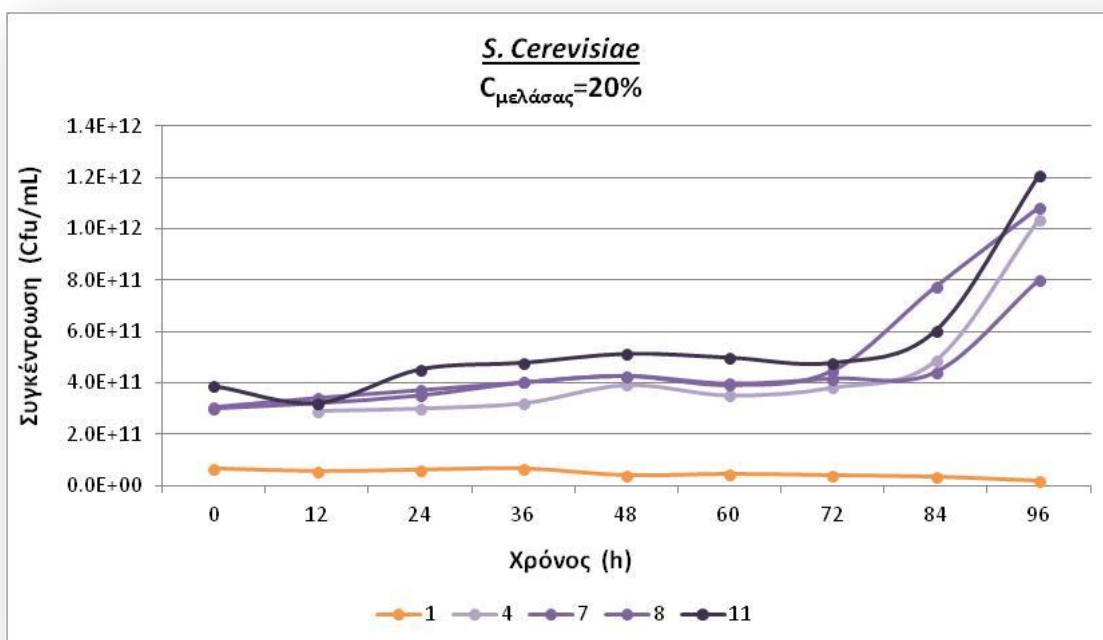
Στο σημείο αυτό, διαπιστώνεται εύκολα η επιρροή της συγκέντρωσης του υποστρώματος στη ζυμωτική διαδικασία. Συγκεκριμένα, αναφερόμενοι σε χρόνο $t=84\text{h}$, για συγκέντρωση μελάσας 10% η ζύμωση έχει ήδη ολοκληρωθεί, καθώς έχουν καταναλωθεί τα αναγωγικά σάκχαρα στο σύνολο τους, για 20% συγκέντρωση μελάσας η διαδικασία βρίσκεται σε εξέλιξη, ενώ για συγκέντρωση μελάσας 30% δεν έχει καν αρχίσει.

Στο Διάγραμμα 4.4-9 εκτός από τα διαλύματα μελάσας 30%, απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα και ένα τεχνητό διάλυμα αντίστοιχης συγκέντρωσης γλυκόζης το οποίο εμφανίζει όμως διαφορετική συμπεριφορά. Αυτό οφείλεται στην τόσο στην καθαρότητα του διαλύματος, όσο και στο γεγονός πως η γλυκόζη κατατάσσεται στα αναγωγικά σάκχαρα και επομένως μπορεί να μεταβολιστεί απευθείας.

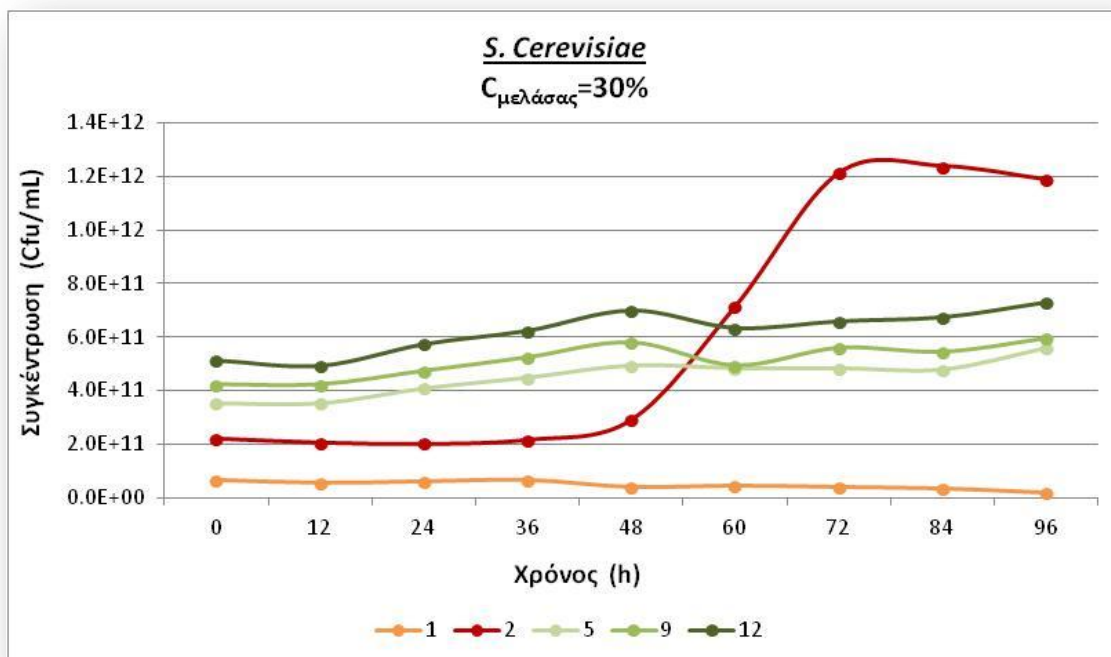
- Διαγράμματα ανάπτυξης μικροοργανισμού



Διάγραμμα 4.4-10 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 10% (Πείραμα 1)



Διάγραμμα 4.4-11 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 20% (Πείραμα 1)



Διάγραμμα 4.4-12 Ανάπτυξη της μικροβιακής μάζας σε συνάρτηση με το χρόνο για συγκέντρωση μελάσας 30% (Πείραμα 1)

Η χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη του μικροοργανισμού, διακρίνεται στα αποτελέσματα των αντιδραστηρίων 3, 6 και 10, όπου αποτελούνται από συγκέντρωση μελάσας 10%, καθώς και στο αντιδραστήριο 2 το οποίο είναι τεχνητό διάλυμα γλυκόζης με προσθήκη θρεπτικών.

Το γενικότερο πρόβλημα που διαπιστώθηκε, σε όλα τα πειράματα, είναι ο μεγάλος χρόνος προσαρμογής που απαιτείται για τη ζύμωση της μελάσας. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δύο παράγοντες:

- Την απαίτηση αναγωγικών σακχάρων για την έναρξη της διαδικασίας της ζύμωσης τα οποία παράγονται σταδιακά και
- Την αύξηση της ωσμωτικότητας κατά την υδρόλυση της σουκρόζης, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της παραγωγικής δραστηριότητας της ζύμης.

Ακόμα παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση μικροοργανισμών να είναι περίπου στα $1,2 \times 10^{12}$ κύτταρα/mL, με τα διαλύματα συγκέντρωσης μελάσας 30% να παρουσιάζουν αρκετά μικρότερη ανάπτυξη.

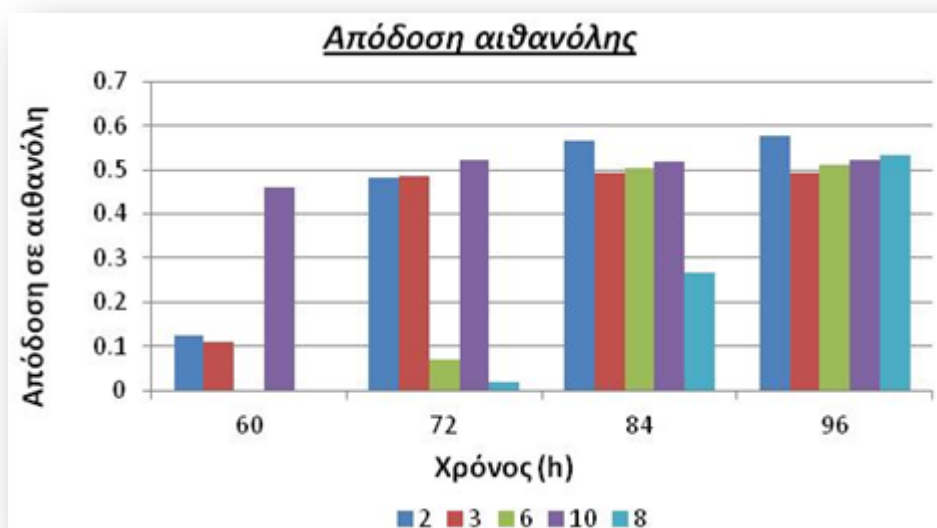
4.5 Παραγόμενη αιθανόλη

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της παραγόμενης αιθανόλης, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 3.4, Αναλυτικές Μέθοδοι. Δυστυχώς, η μέθοδος δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Πιθανώς η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης να ήταν εκτός των ορίων της φασματοφωτομετρικής μεθόδου.

Υπολογίζεται όμως, η θεωρητικά παραγόμενη αιθανόλη, για τα βέλτιστα αντιδραστήρια του Πειράματος 2 (Παράγραφος 3.5.4, Ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες, παρουσία θρεπτικών). Συγκεκριμένα, γίνεται υπολογισμός για τις συγκεντρώσεις μελάσσας 10%, καθώς και για το τεχνητό διάλυμα γλυκόζης:

- (Sedha et al., 1984)

$$\text{Theoretical Ethanol Content} = \text{Total fermentable sugar} \times 0.64$$



Διάγραμμα 4.5-1 Διάγραμμα Θεωρητικής Απόδοσης Αιθανόλης

Η απόδοση αιθανόλης γίνεται βάση των αναγωγικών σακχάρων. Για τον υπολογισμό της έχει θεωρηθεί ως αρχική συγκέντρωση η μέγιστη που παρατηρείται σε κάθε αντίστοιχη καμπύλη των αναγωγικών σακχάρων. Μέγιστο παρουσιάζει το τεχνητό διάλυμα γλυκόζης (αντιδραστήρας 2) με συνολική απόδοση 57,7%, ενώ από τα αντιδραστήρια φυσικού υποστρώματος την μέγιστη απόδοσή δίνει το διάλυμα 8 με παραγωγή αιθανόλης 53,7% επί των σακχάρων.

5 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η διαδικασία και οι παράμετροι διεξαγωγής της αλκοολικής ζύμωσης. Οι παράμετροι αυτοί αφορούσαν περιβαλλοντικές συνθήκες όπως τη θερμοκρασία και το pH αλλά και άλλες παραμέτρους όπως η συγκέντρωση του υποστρώματος και η αρχική συγκέντρωση της ζύμης. Ως πηγή άνθρακα (υπόστρωμα) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μελάσας, ενός φθηνού και ευρέως διαθέσιμου παραπροϊόντος, ενώ ο ζυμωτικός μικροοργανισμός ήταν ο *Saccharomyces Cerevisiae*.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, ανάγονται τα εξής:

- Η συγκέντρωση του υποστρώματος (μελάσας), παίζει καταλυτικό ρόλο στον χρόνο και το αποτέλεσμα της ζύμωσης. Μεγαλύτερη συγκέντρωση σακχάρων δε σημαίνει απαραίτητα και περισσότερη παραγωγή αιθανόλης.
- Η μελάσα περιέχει κατά κύριο λόγο σουκρόζη (δισακχαρίτης, μη ανάγων σάκχαρο) και επομένως απαιτείται αρχικώς υδρόλυση της σε γλυκόζη και φρουκτόζη, γεγονός που καθυστερεί τη συνολική διαδικασία.
- Η οσμωτική πίεση που δημιουργείται κατά την υδρόλυση της σουκρόζης αναστέλλει την παραγωγική ικανότητα του μικροοργανισμού.
- Τα τεχνητά διαλύματα παρουσιάζουν καλύτερες αποδόσεις από τα αντίστοιχα φυσικά, καθώς δεν εμπεριέχονται ανασταλτικοί παράγοντες.
- Σε συγκέντρωση μελάσας 10%, παρουσιάζεται ο μικρότερος χρόνος έναρξης της ζυμωτικής διαδικασίας, καθώς και η μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη
- Μέγιστη παραγωγική απόδοση παρουσιάζει η συγκέντρωση μικροοργανισμού 1g/L, ενώ περεταίρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα.
- Οι μέθοδοι των αναγωγικών και ολικών σακχάρων είναι ιδιαίτερα ακριβείς όσον αφορά το χημικό μέρος, απαιτείται όμως περεταίρω έρευνα για το συγκεκριμένο υπόστρωμα (μελάσα), καθώς τα αιωρούμενα σωματίδια και το χρώμα του διαλύματος αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό το πειραματικό σφάλμα.
- Απαιτείται βαθμονόμηση της χρωματομετρικής μεθόδου της αιθανόλης και προσδιορισμός των ορίων της για περεταίρω χρήση.

Τέλος οι βέλτιστες τιμές παρατηρήθηκαν για τις ακόλουθες περιβαλλοντικές παραμέτρους:

- συγκέντρωση υποστρώματος μελάσας 20%
- αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού 1g/L
- θερμοκρασία 30°C
- pH = 4,5

6 Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Παρόλο το γεγονός πως η μελάσα αποτελεί ένα συνηθισμένο υπόστρωμα για ζυμωτικές διαδικασίες, καθώς και πως οι δυνατότητες του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό, υπάρχει ακόμη περιθώριο περεταίρω έρευνας. Αν και στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εξετάστηκαν συγκεκριμένες παράμετροι, μελλοντικές πειραματικές προσπάθειες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν στα εξής:

- Βελτιστοποίηση της παρούσας εργασίας, λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση και άλλων παραγόντων.
- Χρήση κατάλληλων μεθόδων για ακριβή προσδιορισμό της παραγόμενης αιθανόλης.
- Μελέτη κατάλληλης προεπεξεργασίας της μελάσας, όπως διήθηση, με σκοπό τη δημιουργία φιλικότερου περιβάλλοντος προς τους μικροοργανισμούς για ταχύτερη προσαρμοστικότητα.
- Έρευνα σχετικά με την σταδιακή προσαρμογή του μικροοργανισμού, πριν από τον εμβολιασμό του στο τελικό διάλυμα.
- Λεπτομερή ανάλυση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών της μελάσας, για χρήση κατάλληλων θρεπτικών μέσων
- Μελέτη συνεχούς ζύμωσης, με τροφοδοσία θρεπτικών, καθώς και παράλληλη προσομοίωση βιομηχανικής κλίμακας.
- Γενετική τροποποίηση του μικροοργανισμού ώστε να είναι πιο ανθεκτικός σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Αναζήτηση άλλων ζυμωτικών μικροοργανισμών, όπως είναι το βακτήριο *Zymomonas mobilis*.
- Εξέταση του θέματος, τόσο από τεχνική όσο και από οικονομική άποψη για τον καλύτερο προσδιορισμό του βέλτιστου χρόνου ζύμωσης.

7 Βιβλιογραφία

- Aranda, A., Matallana, E. & Olmo, M. I. d., 2011. *Saccharomyces Yeasts I: Primary Fermentation*. In: A. V. Carrascosa, R. Muñoz & R. González, eds. *Molecular Wine Microbiology*. s.l.:Academic Press, an imprint of Elsevier, pp. 4 - 34.
- Aristidou, A. A., 2007. Application of metabolic engineering to the conversion of renewable resources to fuels and fine chemicals: current advances and future prospects, in El-Mansi. In: *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. s.l.:CRC Press.
- Budavari, S., 1989. *The Merk Index*, p. 594.
- Dubois, M. et al., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), pp. 350 - 356.
- Ecofys, International, W. & Policy(IEEP), I. f. E. E., 2013. *Mandatory requirements in relation to air, soil or water protection: analysis of need and feasibility*, s.l.: s.n.
- Eurobserv'er, 2013. *Biofuels Barometer*, s.l.: s.n.
- Glazer, A. N. & Nikaido, H., 1995. *MICROBIAL BIOTECHNOLOGY: Fundamentals of Applied Microbiology*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman and Company.
- Graves, T., Narenganath, N. V., Dawson, K. & Power, R., 2006. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*, Volume 33, pp. 469 - 474.
- Horn, S. J., Aasen, I. M. & Ostgaard, K., 2000a. Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Volume 24, pp. 51 - 57.
- Horn, S. J., Aasen, I. M. & Ostgaard, K., 2000b. Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, pp. 249 - 254.
- ICM, 2012. *ICM INC the energy of innovation*. [Online] Available at: <http://www.icminc.com/innovation/ethanol/ethanol-timeline.html> [Accessed 05 09 2013].
- Jackson, R. S., 2008. *Wine Science. Principles and Applications..* 3d ed. New York: Academic Press an imprint of Elsevier.

- Lynd, L. R., 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol production from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. *Ann. Rev. Energy Environ.*, 21(403).
- McGovern, P. E., 2003. Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture. In: NJ: Princeton University Press.
- Miller, G. L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426 - 428.
- Mousdale, D. M., 2008. *BIOFUELS: Biotechnology, Chemistry, and Sustainable Development*. NW: CRC Press.
- Narendranath, N., Thomas, K. & Ingledew, 2001. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*.
- Norberck, J. & Blomberg, A., 1997. Metabolic and Regulatory Changes Associated with Growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(9), pp. 5544 - 5554.
- Olbrich, H., 1956. *Die Melasse*. Berlin: s.n.
- Olbrich, H., 1963. *THE MOLASSES*. Berlin: Biotechnologie-Kempe GmbH.
- Pilgrim, C. & Wright, S., 2009. Perspectives and future of alcohol production. In: I. WM, K. DR, A. GD & K. C, eds. *The Alcohol Textbook*. 5th ed. UK: Nottingham University Press, pp. 507 - 530.
- Rose, A. H., 1977. *History and scientific basis of alcoholic beverage production*. Economic Microbiology ed. London: Academic Press.
- Sanchez, O. J. & Cardona, C. A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, Volume 99, pp. 5270 - 5295.
- Sandip, S. et al., 2012. Colorimetric Method for the Estimation of Ethanol in Alcoholic-Drinks. *Journal of Analytical Techniques*, Volume 1, pp. 1 - 6.
- Sedha, R., Veram, G., Gupta, R. & Tewari, H., 1984. Ethanol production from molasses using cell recycling of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment Technol.*, Issue 62, pp. 471-476.
- Somerville, C., Youngs, H., Davis, S. & Long, S., 2010. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science*, Τόμος 329, pp. 790 - 792.
- Taegener, W., 1936. Deut. Zuckerind. Τόμος 61, pp. 681, 706.

Toledo, V. A. A. και συν., 2012. Spectrophotometry as a Tool for Dosage Sugars in Nectar of Crops Pollinated by Honeybees. *Macro to Nano Spectroscopy*, pp. 271 - 290.

VandenLangernberg, B., 2012. *Baker's and Brewer's Yeast*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2012/vandenla_beth/contact.htm
[Πρόσβαση 17 09 2013].

VÖGEL, H., 1949. *Die Rohstoffe der Gärungsindustrie*. Basel: s.n.

Von Brodowski, A., 1929. *Kolloidchem.* Τόμος 29, p. 261.

Walker, G. M., 1998. *Yeast Physiology and Biotechnology*. New York: John Wiley and Sons Ltd.

Williams, L. A. & Boulton, R., 1983. Modeling and Prediction of Evaporative Ethanol Loss During Wine Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34(4), pp. 234 - 242.

Winkeler, B., 1954. *Landtechn. Forsch*, 4(4).

Wyman, C. E., 1999. BIOMASS ETHANOL: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. *Annu Rev. Energy Environ.*, Τόμος 24, pp. 189 - 226.

You, K., Rosenfield, C. & Knipple, D. C., 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Enviromental Microbiology*, Τόμος 69, pp. 1499 - 1503.

ΟΔΗΓΙΑ 2003/30/ΕΚ (2003) ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ.

ΟΔΗΓΙΑ 2009/28/ΕΚ (2009) ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ.

Παπανικολάου, Β., 2006. *Μέθοδοι και Υλικά Ακίνητοποίησης Βιοκαταλυτών για την παραγωγή καύσιμης Βιομηχανικής Αλκοόλης σε Βιοαντιδραστήρα Διαλείποντος έργου*. Πάτρα: s.n.

.

I. Στατιστικά στοιχεία

Country	2011	2012*
France	1 007	1 200
Germany	770	773
Belgium	400	450
Netherlands	275	450
Spain	463	381
Sweden	200	230
Hungary	173	220
Austria	195	216
Poland	167	212
United Kingdom	320	167
Italy	60	150
Czech Republic	110	130
Slovakia	130	130
Bulgaria	10	40
Lithuania	18	27
Romania	65	20
Latvia	5	15
Finland	10	10
Ireland	10	10
Denmark	5	5
Cyprus	0	0
Estonia	0	0
Greece	0	0
Luxembourg	0	0
Malta	0	0
Slovenia	0	0
Portugal	0	0
TOTAL Biofuels EU 27	4 393	4 836

Πίνακας I-1 Παραγωγή καύσιμης βιοαιθανόλης σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα έτη 2011 και 2012 σε εκατομμύρια λίτρα(Eurobserv'er, 2013).

Country	Bioethanol
Germany	805 460
France	417 600
Spain	208 675
Italy	98 667
Poland	144 635
United Kingdom	388 722
Sweden	207 564
Austria	57 124
Belgium	48 366
Netherlands	123 818
Portugal	2 833
Czech Republic	59 965
Finland	85 268
Denmark	70 528
Romania***	47 721
Greece	0
Slovakia	23 789
Ireland	28 710
Hungary	27 236
Lithuania	8 707
Slovenia	5 290
Luxembourg	1 286
Latvia	6 703
Cyprus	0
Bulgaria	0
Estonia	0
Malta	0
Total EU 27	2 868 669

Πίνακας I-2 Κατανάλωση βιοαιθανόλης για τον τομέα των μεταφορών σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση για το έτος 2012 (toe) (Eurobserv'er, 2013)

II. Μελλοντικές προοπτικές

Area presenting scientific challenges	Potential solutions (some examples)
Geo-political	Fostering production in developing countries and enhancing international ethanol trade
Biomass - high lignin composition - cellulose depolymerisation - enzyme expression - stress-tolerance	Genetic engineering to reduce lignin content. Ultrastructural and molecular-level understanding of plant cell walls Basic understanding of cellulolysis (and role of cellulosomes). Novel low-energy pretreatments (eg. ultrasonics) and novel cellulase and arabinoxylanase enzymes eg. GM maize expressing thermostable enzymes (eg. α -amylase genes from <i>Thermococcales</i> bacteria) Genetic engineering for drought-resistance in crops etc [See Padgett (2008); Moeller & Wang (2008) and Torney <i>et al</i> (2007) for further information]
Fermentation - incomplete conversion of available sugars - new, robust yeasts	Xylose fermenting yeasts or bacteria Novel SSF (e.g. using <i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>) Modelling and omics analysis (strain/pathway engineering – see Nevoigt, 2008) Yeast metabolic engineering (see below)* Alcohol fermentations of high-gravity mashes to consistently >20% v/v
Distillation (lowering energy input)	Improved membrane pervaporation technologies
Efficient biorefineries	Flexible lignocellulosic biofuel refineries (ethanol and butanol, together with high-value chemical commodities)

Πίνακας II-1 Παραδείγματα 2ης γενιάς προκλήσεων σχετικά με τη βιοαιθανόλη (Mousdale, 2008)

III. Χαρακτηριστικά Μελάσας

Viscosity coefficient (poise)	Absolute (at 18°C)	Relative (at 20°C)
Ethyl ether	0.00238	~ 0.1
Water	0.015	1
Glycerin	10.7	~ 1000
Beet molasses (75 to 82 brix)	~ 40-600	~ 4000-60,000

Πίνακας III-1 Συντελεστής ιξώδους μελάσας τεύτλων
και άλλων υλικών (Olbrich, 1956)

Constituent	Beet molasses (%)	Cane molasses %
Water	16.5	20.0
<i>Organic constituents</i>		
Sugars: Saccharose	51.0	32.0
Glucose	—	14.0
Fructose	—	16.0
or Invert sugar	1.0	—
Raffinose	1.0	—
Nonsugars: Nitrogenous materials, free and bound acids, soluble gummy substances	19.0	10.0
<i>Inorganic constituents (ash)</i>		
SiO ₂	0.1	0.5
K ₂ O	3.9	3.5
CaO	0.26	1.5
MgO	0.16	0.1
P ₂ O ₅	0.06	0.2
Na ₂ O	1.3	—
Fe ₂ O ₃	0.02	0.2
Al ₂ O ₃	0.07	—
Soda and carbonate residue (as CO ₂)	3.5	—
Sulfate residue (as SO ₃)	0.55	1.6
Chlorides	1.6	0.4
	100.0	100.0

Πίνακας III-2 Μέση σύνθεση μελάσας από ζαχαρότευτλα
και ζαχαροκάλαμα (Olbrich, 1956)

	Average of 16 molasses (%)	% in original molasses	% in molasses dry substance
Ammonium salts	2.61	0.0383	0.0485
Amides	1.62	0.0246	0.0313
Amino acids	30.91	0.4583	0.5768
Betaine (and protein)	64.84	0.9839	1.2520
N content	~ 100	1.5051	1.9086

Πίνακας III-3 Κατανομή του ολικού αζωτούχου περιεχομένου της μελάσας (Olbrich, 1956)

Viscosity coefficient (poise)	Absolute (at 18°C)	Relative (at 20°C)
Ethyl ether	0.00238	~ 0.1
Water	0.015	1
Glycerin	10.7	~ 1000
Beet molasses (75 to 82 brix)	~ 40-600	~ 4000-60,000

Πίνακας III-4 Συντελεστής ιξώδους μελάσσας τεύτλων και άλλων υλικών

Organisms	Fermentation products from molasses (*1 mol, **2 mol, ***3 mol hexose)	Chief products
<i>Anoxxidative fermentations</i>		
Yeasts	$\left\{ \begin{array}{l} (*) 2C_2H_6O + 2CO_2 \\ (*) C_3H_8O_3 + C_2H_4O + CO_2 \\ (**) C_4H_{10}O + C_3H_8O + 5CO_2 + 4H_2 \\ (*) C_4H_8O_2 + 2CO_2 + 2H_2 \\ (*) 2 C_3H_8O_3 \\ (**) C_4H_{10}O_2 + 2C_2H_6O + 4CO_2 + H_2 \\ (***) 4C_3H_8O_2 + 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 2H_2O \end{array} \right.$	Ethyl alcohol Glycerine Butanol, acetone Butyric acid Lactic acid 2, 3-Butyleneglycol (2, 3-butanediol) and ethyl alcohol Propionic acid
Bacteria		
<i>Oxidative fermentations</i>		
Yeasts	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Feed yeasts} \\ \text{Nutrient yeasts} \\ \text{Fat yeasts} \\ \text{Bakers yeasts} \end{array} \right\} \left\{ \begin{array}{l} \text{not defined} \\ \text{stoichiometrically} \end{array} \right.$	Yeast cellular substance
Bacteria	$\left\{ \begin{array}{l} (* + 2O_2) 2C_2H_4O_2 + 2CO_2 + 2H_2O \\ (** + O_2) 2C_6H_{12}O_7 \\ (** + O_2) 2C_3H_8O_3 + 2C_2H_4O + 2CO_2 + 2H_2O \end{array} \right.$	Acetic acid Gluconic acid Dioxycetone
Molds	$\left\{ \begin{array}{l} (** + 3O_2) 2C_6H_8O_7 + 4H_2O \\ (** + O_2) 2C_6H_{12}O_7 \\ (* - 3O_2) C_4H_4O_4 + 2CO_2 + 4H_2O \\ (** - 9O_2) C_2H_2O_4 + 6H_2O \end{array} \right.$	Citric acid Gluconic acid Fumaric acid Oxalic acid

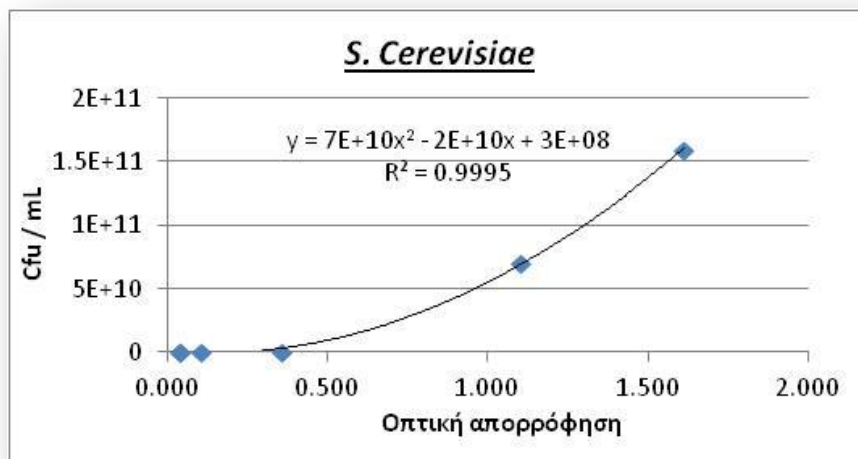
Πίνακας III-5 Έρευνα σχετικά με τις βιοχημικές διεργασίες αξιοποίησης της μελάσσας (Olbrich, 1956)

IV. Διαδικασία της ζύμωσης

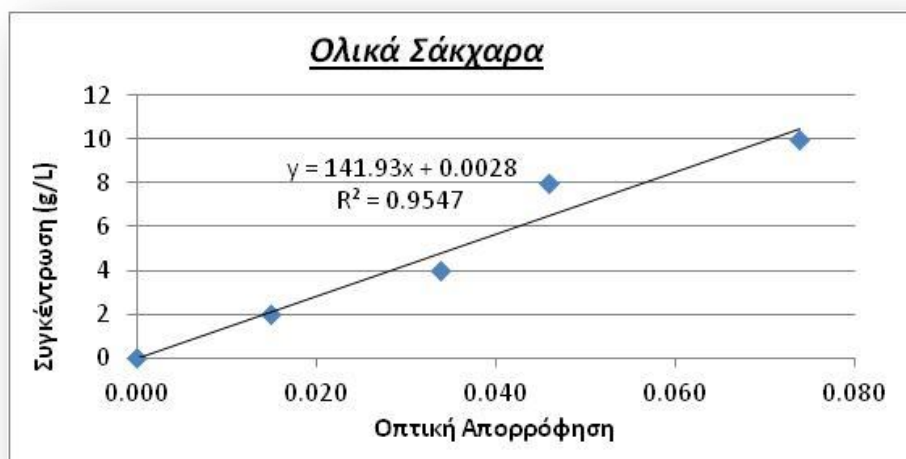
Φυσιολογική λειτουργία	Επίδραση αιθανόλης
Βιωσιμότητα και αύξηση κυττάρων	<ul style="list-style-type: none"> • Αναστολή αύξησης, διαίρεσης και βιωσιμότητας κυττάρων • Μείωση κυτταρικού όγκου • Επαγωγή μορφολογικών μεταβολών • Ενίσχυση θερμικού θανάτου
Ενδιάμεσος μεταβολισμός και βιοσύνθεση Μακρομορίων	<ul style="list-style-type: none"> • Μετουσίωση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και γλυκολυτικών ενζύμων • Μείωση ρυθμού συσσώρευσης RNA και πρωτεϊνών • Μείωση της V_{max} των κυριότερων γλυκολυτικών ενζύμων • Ενίσχυση σημειακών μεταλλάξεων • Επαγωγή της σύνθεσης των heat shock πρωτεϊνών και απόκτηση θερμοανθεκτικότητας • Αύξηση ελεύθερων ριζών οξυγόνου • Επαγωγή σύνθεσης κυτοχρώματος P_{450} • Αύξηση της ενεργότητας της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου
Μεμβρανική δομή και λειτουργία	<ul style="list-style-type: none"> • Αλλαγή της σύστασης της μεμβράνης σε λιπαρά οξέα και στερόλες • Ελάττωση του μήκους της αλυσίδας των μεμβρανικών κορεσμένων λιπαρών οξέων • Αύξηση μεμβρανικών ακόρεστων λιπαρών οξέων • Επαγωγή της λιπόλυσης των κυτταρικών φωσφολιπιδίων • Αυξημένη ιοντική διαπερατότητα • Αναστολή της λήψης των θρεπτικών ουσιών • Υπερπόλωση της πλασματικής μεμβράνης

Πίνακας IV-1 Σημαντικές επιπτώσεις της αιθανόλης στη φυσιολογία των ζυμών (Walker, 1998)

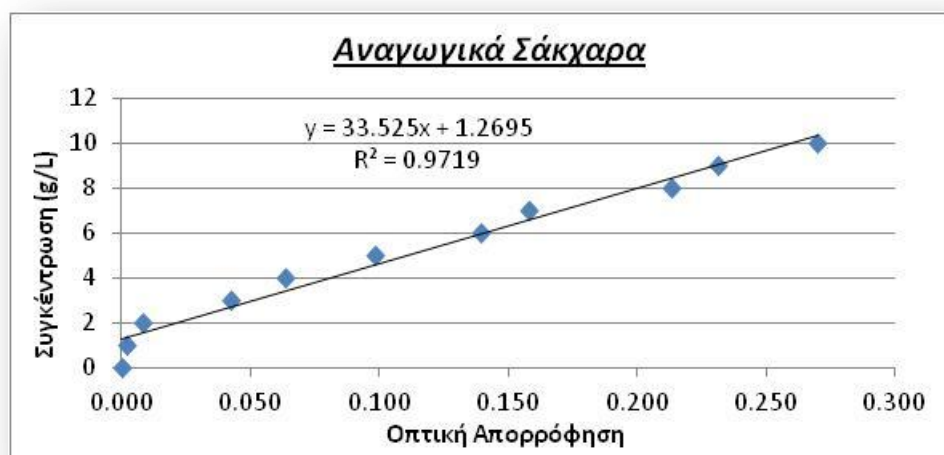
V. Πρότυπες καμπύλες



Διάγραμμα V-1 Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης, *S. Cerevisiae*



Διάγραμμα V-2 Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης ολικών σακχάρων



Διάγραμμα V-3 Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης αναγωγικών σακχάρων

VI. Αρχείο εικόνων

- Μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν



Εικόνα VI-1 Επωαστήρας



Εικόνα VI-2 Φασματοφωτόμετρο



Εικόνα VI-3 Φυγοκεντρητής



Εικόνα VI-4 Λυοφιλοποιητής

- Πρώτες ύλες



Εικόνα VI-5 Μελάσα

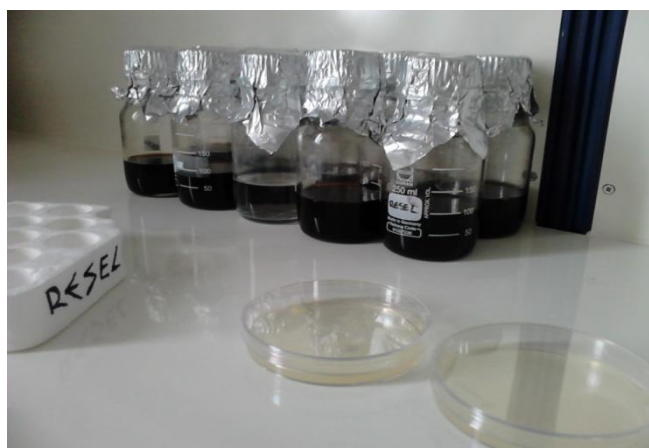
- Πειραματική διαδικασία



Εικόνα VI-6 Αντιδραστήριο DNS



Εικόνα VI-7 Διαδικασία ρύθμισης pH



Εικόνα VI-8 Αντιδραστήρια προς ζύμωση