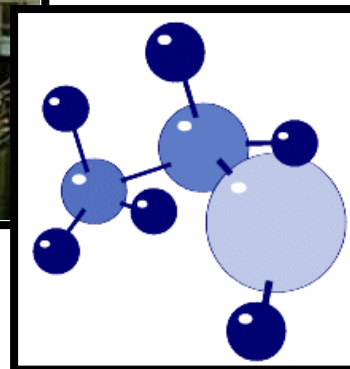
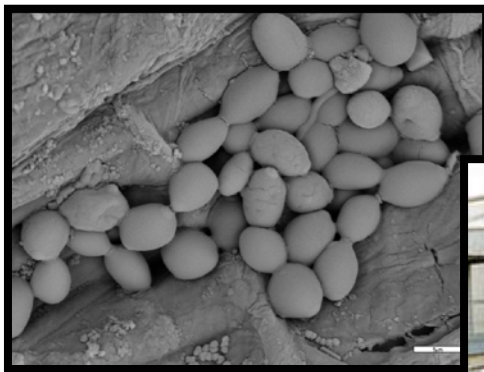


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Τομέας Γενετικής, Βιολογίας Κυττάρου Και Ανάπτυξης

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**

**«ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΥΣΙΜΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΣΕ
ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ»**



Ερευνητική Εργασία Μεταπτυχιακού Διπλώματος
Ειδίκευσης

**Παπανικολάου Βασιλική
Βιολόγος**

Πάτρα 2006

Τριμελής επιτροπή

Καλιάφας Α., Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας, ως επιβλέπων

Δημητριάδης Γ., Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας

Χρυσάνθης Γ., Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος για την απόκτηση διπλώματος ειδίκευσης στην Βιολογική Τεχνολογία.

Ολοκληρώθηκε υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Αργύρη Καλιάφα, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση του θέματος, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια του και την άψογη συνεργασία που είχαμε τα τελευταία τέσσερα χρόνια.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του τμήματος Βιολογίας κ. Δημητριάδη Γεώργιο για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή, καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Βιολογίας κ. Χρυσάνθη Γεώργιο τόσο για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή, όσο και για την βοήθεια που μου προσέφερε.

Δεν θα ήθελα να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών για την υλικοτεχνική βοήθεια που μου προσέφεραν στα πειράματα με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης, καθώς επίσης και στον κ. Β. Κοτσόπουλο για τη φωτογράφιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Ιδιαίτερως σημαντική ήταν και η συμβολή των συναδέλφων μου στο εργαστήριο με τους οποίους είχα άψογη συνεργασία, καθώς και των φίλων μου οι οποίοι με βοήθησαν με τον τρόπο τους.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου για την στήριξη, την κατανόηση και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Παπανικολάου Βασιλική,

Ιούλιος 2006.

| | |
|---|----|
| A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| 1. Η αιθανόλη | 2 |
| 1.1. Κατηγορίες αιθανόλης | 2 |
| 1.2. Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης | 4 |
| 1.3. Η αιθανόλη ως καύσιμο | 5 |
| 1.3.1. Πλεονεκτήματα της χρήσης καύσιμης αιθανόλης | 7 |
| 1.3.2. Μειονεκτήματα της χρήσης της καύσιμης αιθανόλης | 9 |
| 1.4. Διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης | 9 |
| 1.4.1. Στάδιο I: Μετατροπή βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα | 10 |
| 1.4.2. Στάδιο II: Αλκοολική ζύμωση | 15 |
| 1.4.2.1. Γενικά | 15 |
| 1.4.2.2. Παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης | 17 |
| 1.4.2.3. Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης | 18 |
| 1.4.2.4. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις παραγωγή βιοαιθανόλης | 18 |
| 1.4.2.4.1. Σύγκριση της καταλληλότητας ζυμών και βακτηρίων για την παραγωγή βιοαιθανόλης | 20 |
| 1.4.3. Στάδιο III: Ανάκτηση αιθανόλης | 21 |
| 2. Οι ζύμες | 22 |
| 2.1. Γενικά χαρακτηριστικά των ζυμών | 22 |
| 2.2. Η ζύμη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 23 |
| 2.2.1. Ο βιολογικός κύκλος του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 25 |
| 2.3. Θρέψη και αύξηση των ζυμών | 26 |
| 2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των ζυμών | 29 |
| 2.4.1. Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες | 29 |
| 2.4.1.1. Επίδραση της αιθανόλης | 29 |
| 2.4.1.2. Επίδραση της θερμοκρασίας | 31 |
| 2.4.1.3. Επίδραση των υπεροσμωτικών συνθηκών | 33 |
| 2.5. Εφαρμογές των ζυμών | 34 |
| 3. Ζυμώσεις και βιοαντιδραστήρες | 34 |
| 3.1. Κατηγορίες ζυμώσεων | 34 |
| 3.2. Βιοαντιδραστήρες (ζυμωτήρες) | 36 |
| 4. Παραγωγή αιθανόλης με τη χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων | 40 |
| 4.1. Φορείς και τεχνικές ακινητοποίησης | 41 |
| 4.1.1. Ακινητοποίηση σε επιφάνεια στερεού φορέα | 42 |
| 4.1.2. Εγκλωβισμός σε πολυμερή δικτυωτά | 43 |
| 4.1.3. Συσσωμάτωση με κροκύδωση (φυσική) ή με τη βοήθεια διαφόρων συνδετικών παραγόντων (τεχνητή) | 43 |
| 4.1.4. Μηχανική συγκράτηση βιοκαταλυτών σε έναν φορέα | 44 |
| 4.2. Κριτήρια επιλογής μεθόδων ακινητοποίησης | 44 |
| 4.3. Προϋποθέσεις χρήσης φορέων κυτταρικής ακινητοποίησης | 45 |
| 4.4. Επίδραση της ακινητοποίησης στα κύτταρα της ζύμης | 47 |
| 4.5. Πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων κυτταρικών συστημάτων | 47 |
| 4.6. Μειονεκτήματα των ακινητοποιημένων κυτταρικών συστημάτων | 48 |
| B. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 49 |
| 1. Σκοπός της εργασίας | 50 |
| Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 51 |
| 1. Μικροοργανισμός | 52 |
| 2. Θρεπτικά υποστρώματα | 52 |
| 2.1. Διάλυμα μελάσας | 52 |
| 2.2. Διάλυμα γλυκόζης | 53 |
| 2.3. Διάλυμα σακχαρόζης | 53 |
| 2.4. Εκχύλισμα σόργου | 53 |
| 2.5. Εκχύλισμα σταφίδας | 53 |

| | |
|--|------------|
| 3. Φορείς κυτταρικής ακινητοποίησης..... | 54 |
| 4. Μεθοδολογία ζυμώσεων και ακινητοποίησης..... | 57 |
| 4.1. Ζυμώσεις σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, απουσία φορέα..... | 57 |
| 4.2. Ζυμώσεις σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, παρουσία φορέα..... | 57 |
| 4.3. Επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με αναγέννηση των φορέων..... | 58 |
| 4.4. Επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με χρήση του ίδιου φορέα και των ακινητοποιημένων σ' αυτόν κύτταρων..... | 58 |
| 5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης σακχάρων..... | 58 |
| 6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης αιθανόλης..... | 60 |
| 7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης βιομάζας..... | 61 |
| 8. Τεχνικές παρατήρησης..... | 61 |
| 9. Ανάλυση αποτελεσμάτων..... | 62 |
| Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 63 |
| 1. Ελίφη..... | 64 |
| 1.1. Η παρουσία της ελίφης σε ζυμώσεις πρότυπων διαλυμάτων σακχάρων..... | 64 |
| 1.1.1. Διαλύματα γλυκόζης..... | 64 |
| 1.1.2. Διαλύματα σακχαρόζης..... | 68 |
| 1.2. Η παρουσία της ελίφης σε ζυμώσεις διαλυμάτων μελάσας..... | 71 |
| 1.3. Η επίδραση της θερμοκρασίας..... | 76 |
| 1.4. Ζυμώσεις παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων ελίφης..... | 79 |
| 1.5. Ζυμώσεις παρουσία ελίφης με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων κυττάρων..... | 82 |
| 1.6. Ζυμώσεις σε σόργο και σταφίδα, απουσία και παρουσία ελίφης..... | 84 |
| 1.7. Συγκριτική μελέτη της δράσης της ελίφης σχετικά με άλλους φορείς ακινητοποίησης..... | 87 |
| 1.8. Βιωσιμότητα του φορέα..... | 90 |
| 1.8.1. Επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις με τη χρήση του ίδιου φορέα και την προσθήκη βιομάζας..... | 90 |
| 1.8.2. Επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις με τη χρήση του ίδιου φορέα και των ακινητοποιημένων σε αυτόν κύτταρων χωρίς προσθήκη νέας βιομάζας..... | 93 |
| 2. Παραγωγή αλκοόλης με φορέα ακινητοποίησης βλαστό καλαμιού..... | 96 |
| 2.1. Η παρουσία του καλαμιού ως ακινητοποιητή κυττάρων σε ζυμώσεις διαλυμάτων μελάσας..... | 97 |
| 2.2. Συγκριτική μελέτη φορέων ακινητοποίησης καλαμιού και ξύλου..... | 101 |
| 2.3. Βιωσιμότητα του φορέα..... | 104 |
| 3. Μελέτη ακινητοποιημένων κυττάρων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)..... | 107 |
| Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 110 |
| 1. Συμπεράσματα..... | 111 |
| ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 113 |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ΑΙΘΑΝΟΛΗ

Η αιθανόλη, με χημικό τύπο C₂H₅OH, είναι το δεύτερο μέλος της σειράς των αλειφατικών αλκοολών. Είναι ένα εύφλεκτο, άχρωμο υγρό, με χαρακτηριστική οσμή, διαλυτό στο νερό και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Ο οξυγονωμένος αυτός υδρογονάνθρακας έχει μοριακό βάρος 46.07, σημείο βρασμού τους 78,5 °C, σημείο πήξης τους -112 °C και πυκνότητα 0,789 g/ml στους 20°C. Δεν εμφανίζει ούτε όξινες, ούτε βασικές ιδιότητες. Κατά την καύση της αιθανόλης παράγεται μπλε φλόγα χωρίς υπολείμματα και με σημαντική απόδοση ενέργειας [<http://www.ucc.ie/ucc/depts./chem./ddchem/html/comp/ethanol.html#Ethanol>].

1.1. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Η αλκοόλη μπορεί να καταταχθεί σε διάφορες κατηγορίες αναλόγως του τρόπου παραγωγής της (προερχόμενη από ζύμωση ή συνθετική), της σύστασής της (άνυδρη ή ένυδρη, μετουσιωμένη ή μη) και της χρήσης της (βιομηχανική, καύσιμη ή πόσιμη) [<http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>].

⇒ Διάκριση με βάση τον τρόπο παραγωγής

Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι βιομηχανικής παραγωγής της αιθανόλης και ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής της διακρίνεται σε συνθετική και σε βιοαιθανόλη. Η συνθετική αιθανόλη παράγεται με αντίδραση προσθήκης του αιθυλενίου (ενυδάτωση σε υψηλή θερμοκρασία παρουσία κατάλληλου καταλύτη) και προορίζεται μόνο για βιομηχανική χρήση.



Η βιοαιθανόλη παράγεται από την αλκοολική ζύμωση σακχαρούχων, αμυλούχων και κυτταρινούχων πρώτων υλών. Ο όρος ζύμωση αναφέρεται σε μια αλληλουχία αντιδράσεων, που απελευθερώνουν ενέργεια από οργανικά μόρια, απουσία οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα στην αλκοολική ζύμωση, η ενέργεια παράγεται από την μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Η πόσιμη αιθανόλη και ένα μεγάλο μέρος της βιομηχανικής παράγεται με την διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης. Το 2003, μόλις το 5 % της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης ήταν συνθετική. Η βιοαιθανόλη και η συνθετική αιθανόλη είναι χημικά ταυτόσημες.

⇒ Διάκριση με βάση την σύσταση

Η αιθανόλη ανάλογα της περιεκτικότητας της σε νερό, μπορεί επίσης να διακριθεί σε άνυδρη και ένυδρη. Η άνυδρη ή απόλυτη αιθανόλη είναι τουλάχιστον 99% καθαρή και δεν περιέχει σχεδόν καθόλου νερό. Η άνυδρη αιθανόλη είναι πιο ακριβή και χρησιμοποιείται μόνο όταν είναι απαραίτητο. Η αιθανόλη που συναντάται στο εμπόριο χαρακτηρίζεται ως «ένυδρη» γιατί περιέχει περίπου 5% νερό.

Η προς κατανάλωση αιθανόλη φορολογείται συνήθως αυστηρά ενώ η «μετουσιωμένη» αιθανόλη πωλείται και χωρίς να φορολογηθεί. Η τελευταία είναι ακατάλληλη για πόση λόγω του ότι περιέχει τα παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης και άλλες επιπρόσθετες τοξικές για τον άνθρωπο ουσίες (9% μεθανόλη και μικρές ποσότητες βενζολίου, πυριδίνης και χρώματος) [<http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol>].

⇒ Διάκριση με βάση την τελική της χρήση

Μια άλλη διάκριση της αιθανόλης μπορεί να γίνει με βάση τη χρήση της. Η πιο παλιά χρήση της αιθανόλης αφορά στην πόσιμη μορφή της, στην παρασκευή δηλαδή αλκοολούχων ποτών. Η κύρια χρήση της σε βιομηχανική κλίμακα είναι σαν διαλύτης. Σημαντική και πολλά υποσχόμενη είναι η χρήση της αιθανόλης ως καύσιμο. Συνοπτικά η αιθανόλη χρησιμοποιείται [<http://www.ucc.ie/ucc/depts/chem/ddchem/html/comp/ethanol.html#Ethanol>]:

- Στην παρασκευή αλκοολούχων ποτών π.χ. Vodka
- Ως διαλύτης και ως συστατικό για την παρασκευή βαφών, αρωμάτων, φαρμάκων, καλλυντικών, εκρηκτικών κ.α.
- Στην παρασκευή ακεταλδεΐδης και οξικού οξέος.
- Εξαιτίας του χαμηλού σημείου πήξεως της (-112 °C) χρησιμοποιείται ως υγρό σε θερμομέτρα κάτω των -40°C (σημείο πήξεως του υδραργύρου) [<http://scifun.chem.wisc.edu/chemweek/ethanol/ethanol.html>].
- Στην διατήρηση βιολογικών παρασκευασμάτων.
- Ως απολυμαντικό.
- Ως καύσιμο που αντικαθιστά την βενζίνη στους κινητήρες εσωτερικής καύσης, στα πλαίσια της χρήσης εναλλακτικών πηγών ενέργειας (ενέργεια από βιομάζα).

1.2. ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Κύριος παραγωγός αιθανόλης σε παγκόσμιο επίπεδο μέχρι και πέρυσι ήταν η Βραζιλία, η οποία καταναλώνει ετησίως περίπου 4 δισεκατομμύρια γαλόνια αιθανόλης [<http://www.ethanolrfa.org>]. Το 2005 πρώτες σε παραγωγή ήταν οι Η.Π.Α. οι οποίες χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη κυρίως το καλαμπόκι (πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1: Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης ανά χώρα για το έτος 2005, σε εκατομμύρια γαλόνια [<http://www.ethanolrfa.org>].

| | | | |
|------------------|------|-------------|-----|
| Η.Π.Α. | 4264 | Ιταλία | 40 |
| Βραζιλία | 4227 | Αυστραλία | 33 |
| Κίνα | 1004 | Ιαπωνία | 30 |
| Ινδία | 449 | Σουηδία | 29 |
| Γαλλία | 240 | Πακιστάν | 24 |
| Ρωσία | 198 | Φιλιππίνες | 22 |
| Γερμανία | 114 | Νότια Κορέα | 17 |
| Νότια Αφρική | 103 | Γουατεμάλα | 17 |
| Ισπανία | 93 | Εκουαδór | 14 |
| Ηνωμένο Βασίλειο | 92 | Κούβα | 12 |
| Ταϊλάνδη | 79 | Μεξικό | 12 |
| Σαουδική Αραβία | 32 | Νικαράγουα | 7 |
| Ουκρανία | 65 | Ζιμπάμπουε | 5 |
| Καναδάς | 61 | Κένυα | 4 |
| Πολωνία | 58 | Μαυρίκιος | 3 |
| Ινδονησία | 45 | Ελβετία | 3 |
| Αργεντινή | 44 | Άλλες | 710 |

Σύνολο 12150

Την τελευταία δεκαετία η Ευρωπαϊκή Ένωση ενδιαφέρεται όλο και περισσότερο για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Δίδονται σημαντικά κίνητρα (π.χ. φορολογικές απαλλαγές) για τη δημιουργία και την επέκταση του ενδιαφέροντος στους τομείς παραγωγής και χρήσης της βιοαιθανόλης. Η Ευρωπαϊκή Ένωση χρηματοδότησε πάνω από 70 προγράμματα για υγρά βιοκαύσιμα την περίοδο 1985-1996. Η Ελλάδα ανέλαβε 5 προγράμματα και συμμετείχε σε άλλα 20 [http://europa.eu.int/comm/energy_transport/atlas/htmlu/lbrtdc.html]. Για θέμα καθαρά προστασίας του περιβάλλοντος έχει θεσπιστεί η οδηγία 2003/30/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

σύμφωνα με την οποία όλα τα κράτη-μέλη πρέπει να αντικαταστήσουν σταδιακά τη βενζίνη και το πετρέλαιο κίνησης με βιοκαύσιμα σε ποσοστό 5,7% έως το 2010 [Faaij, 2006].

1.3. Η ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΩΣ ΚΑΥΣΙΜΟ

Η όξυνση των περιβαλλοντικών προβλημάτων κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην χρήση των συμβατικών πηγών ενέργειας. Η καύση των ορυκτών καυσίμων, αυξάνει τις συγκεντρώσεις του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα συμβάλλοντας στο φαινόμενο του «θερμοκηπίου» και στην αύξηση του διοξειδίου του θείου που συμβάλει στο φαινόμενο της «όξινης βροχής». Η επιβάρυνση του περιβάλλοντος σε συνδυασμό με την εκτίμηση ότι τα ορυκτά ενεργειακά αποθέματα θα μειωθούν αισθητά μέχρι το 2100 και η χρήση τους θα είναι πλέον πολυτέλεια, επιβάλλουν την ανάγκη για εκμετάλλευση εναλλακτικών πηγών ενέργειας, ανανεώσιμων και πιο αξιόπιστων από τα παραδοσιακά καύσιμα.

Οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας όπως η αιολική, η ηλιακή αλλά και η βιομάζα (δηλαδή, η οργανική ύλη που αναπτύσσεται με τη φωτοσυνθετική μετατροπή της ηλιακής ενέργειας), είναι πηγές ενέργειας με μικρότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις από τις συμβατικές. Η βιομάζα μπορεί να μετατραπεί σε βιοκαύσιμα όπως βιοαέριο, βιοντήζελ και βιοαιθανόλη που καίγονται «καθαρότερα» εκπέμποντας λιγότερα καυσαέρια από τα προϊόντα πετρελαίου και επομένως αποτελούν εξαιρετικής σημασίας λύση για τη μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης [Hall *et al.*, 1998].

Ενέργεια από βιομάζα χρησιμοποιείται χιλιάδες χρόνια τώρα, από τότε που οι άνθρωποι έκαμαν ξύλα για να μαγειρέψουν ή να ζεσταθούν. Σήμερα, αξιοποιείται μόνο το 7% της παραγόμενης βιομάζας. Η συνολική παγκόσμια παραγωγή της είναι 3×10^{21} joules, ισοδύναμη ενεργειακά περίπου με τη δεκαπλάσια παγκόσμια κατανάλωση ενέργειας [Glazer *et al.*, 1995]. Η βιομάζα αποτελείται κατά μέσο όρο από 75% σάκχαρα, 25% λιγνίνη και 5% διάφορες άλλες ενώσεις [http://www.nrel.gov]. Για την παραγωγή της χρησιμοποιούνται βραχείας απόδοσης δασικές καλλιέργειες πολυετών ειδών (λεύκη, ακακία, κ.λ.π.) αλλά και γεωργικές καλλιέργειες ετήσιων ειδών (σακχαροκάλαμο, αραβόσιτος, σόργο, κ.λ.π.) όπως επίσης αγροτικά και αστικά απορρίμματα. Η παραγωγή ενέργειας από βιομάζα είναι μια διεργασία 100% ανανεώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον. Η αιθανόλη μαζί με το βιοντήζελ αποτελεί το κύριο υποκατάστατο της βενζίνης.

Η πρώτη μεγάλης κλίμακας χρήση της αιθανόλης ως καύσιμο έγινε στις αρχές του 1900. Στην Αμερική, αυτοκίνητα όπως το μοντέλο T του Henry Ford (εικόνα 1.1α) και άλλα στις αρχές του 1920, κινούνταν με αιθανόλη. Η αιθανόλη όμως δεν έμεινε για πολύ στο προσκήνιο, αφού το φθινό πετρέλαιο την αντικατέστησε πολύ γρήγορα. Η κατάσταση αυτή διατηρήθηκε ως την πετρελαϊκή κρίση της δεκαετίας του 1970. Το 1975 η κυβέρνηση της Βραζιλίας εισήγαγε το πρόγραμμα «Proalcool» που σκοπό είχε την αντικατάσταση της βενζίνης με αλκοόλη και έτσι η αιθανόλη επανήλθε στο εμπορικό προσκήνιο. Κατά την πρώτη δεκαετία παρήχθησαν πάνω από 50 δισεκατομμύρια λίτρα αιθανόλης, ενώ το 1989 το 40% των οχημάτων της Βραζιλίας χρησιμοποιούσαν αιθανόλη (95%) και το υπόλοιπο 60% μίγμα βενζίνης (78%) και αιθανόλης (22%) [http://www.nwiccc.cc.ia.us/Module1.htm].

(α)

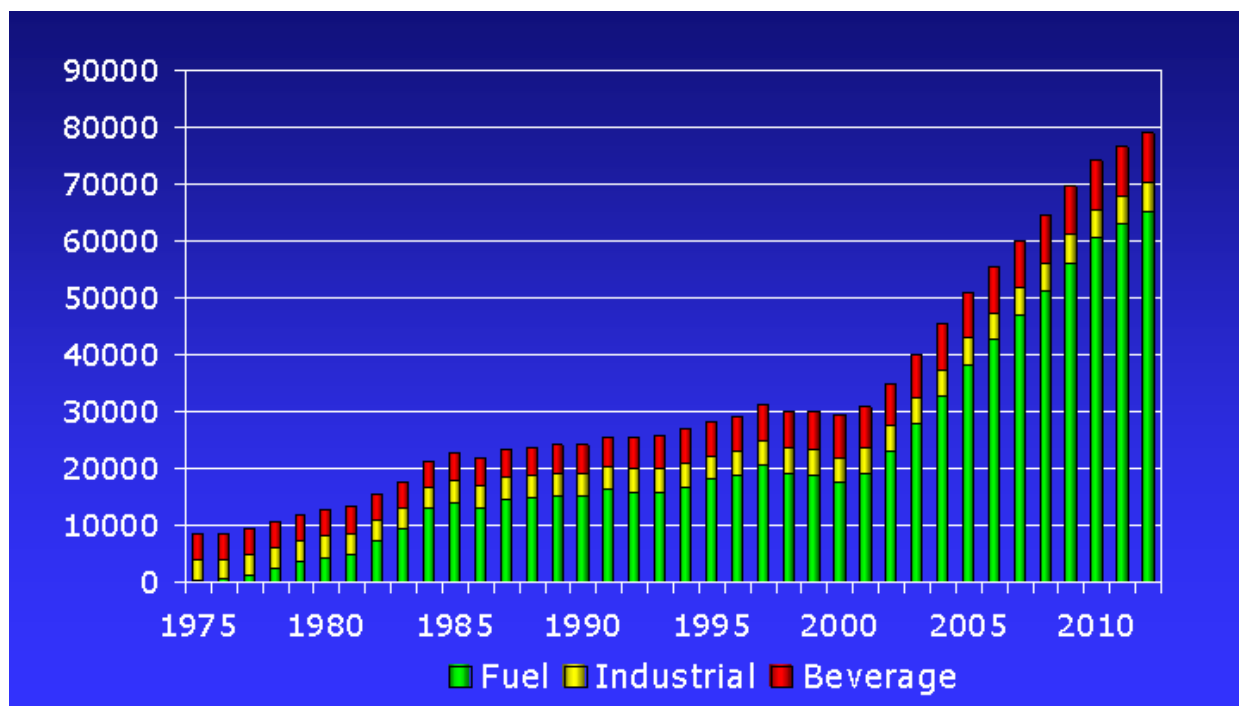


(β)



Εικόνα 1.1: (α) Ένα από τα πρώτα μοντέλα T Ford [http://journeytoforever.org/ethanol.html], (β) Το μοντέλο 2006 Taurus της Ford, που κινείται με E-85 [http://www.fleet.ford.com].

Το 2003 η καύσιμη αιθανόλη αποτέλεσε περίπου το 70 % της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1.1, το ποσοστό της καύσιμης αιθανόλης εκτιμάται πως θα ξεπεράσει το 80% ως τα τέλη της παρούσας δεκαετίας.



Διάγραμμα 1.1. Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης ανά τύπο [<http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>].

Η αιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο με τρεις τρόπους [<http://www.vogelbusch.com/technology/bioethanol.htm>]:

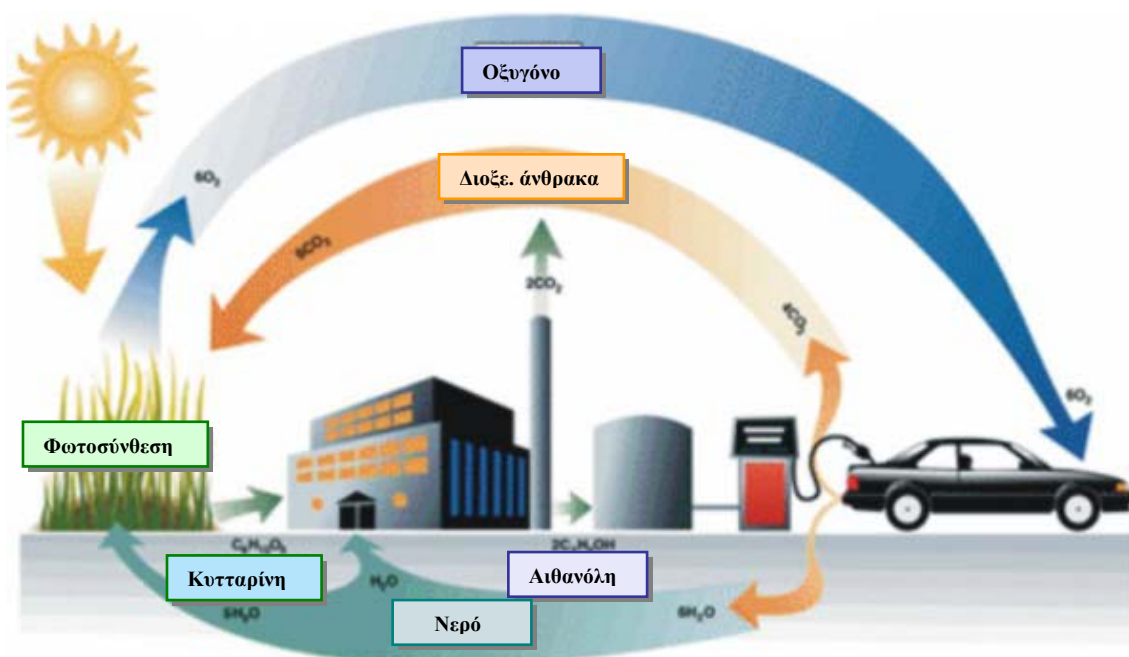
1. Ως μίγμα με την βενζίνη σε ποσοστά 5-85%. Τα μίγματα που περιέχουν μικρές συγκεντρώσεις αιθανόλης μπορούν να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα αυτοκίνητα, χωρίς καμία τροποποίηση στις μηχανές. Αντίθετα τα δείγματα με υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης χρησιμοποιούνται σε οχήματα με τροποποιημένες μηχανές που ονομάζονται flexible fuel vehicles (FFV) (εικόνα 1.1.β). Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται άνυδρη αιθανόλη. Στα μίγματα αυτά η αιθανόλη δρα σαν ενισχυτής του αριθμού των οκτανίων και αντικαθιστά διάφορα άλλα πρόσθετα όπως τον μόλυβδο. Τα πιο γνωστά μίγματα είναι το E85 (με 85% αιθανόλη και 15% βενζίνη), το E20 (με 20% αιθανόλη και 80% βενζίνη) και το E10 (με 10% αιθανόλη και 90% βενζίνη).
2. Μόνη της σε καθαρή μορφή, σε ειδικά σχεδιασμένες μηχανές. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται ένυδρη αιθανόλη.
3. Εμμέσως, με την τροποποίηση της σε τριτοταγή βουτυλαιθέρα (ethyl tertio butyl ether – ETBE), ο οποίος χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα συμβατικά καύσιμα.

1.3.1. Πλεονεκτήματα της χρήσης καύσιμης αιθανόλης

Η αιθανόλη ως καύσιμο έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών καυσίμων, με κυριότερο ίσως την μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Πιο συγκεκριμένα τα πλεονεκτήματα της είναι [<http://www.journeytoforever.org/ethanol.html>]:

- ✧ 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, με αποτέλεσμα να μην προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον σε περίπτωση διαρροής.

- ✧ Η χρήση της μπορεί να μειώσει σημαντικά τις εκπομπές CO₂, αφού η παραγωγή της μέσω της ζύμωσης της βιομάζας, αποτελεί μέρος του κύκλου του άνθρακα [Wyman, 1994]. (σχήμα 1.1)
- ✧ Η υψηλή περιεκτικότητα της σε οξυγόνο, μειώνει τα επίπεδα του μονοξειδίου του άνθρακα και μάλιστα σε μεγαλύτερο ποσοστό από οποιοδήποτε άλλον οξυγονοποιητή. Εκτιμάται πως η μείωση είναι της τάξεως του 25 – 30 %. Στην Αγγλία εκτιμάται πως η μείωση των εκπομπών των οξειδίων του άνθρακα με τη χρήση βιοαιθανόλης σε ποσοστό 5 %, ισοδυναμεί με την απομάκρυνση από την κυκλοφορία 1000000 αυτοκινήτων [http://www.britishsugar.co.uk].
- ✧ Με την χρήση μιγμάτων αιθανόλης μειώνονται δραστικά οι εκπομπές υδρογονανθράκων, οι οποίοι αποτελούν μια από τις κύριες αιτίες για την μείωση του στρώματος του όζοντος.
- ✧ Τα υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης μίγματα 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 (Volatile Organic Compounds - VOCs).
- ✧ Σαν ενισχυτής των αριθμών οκτανίων, μπορεί να μειώσει κατά 50% ή και περισσότερο, τις εκπομπές του βενζενίου και του βουταδιενίου, τα οποία είναι καρκινογόνα.
- ✧ Μειώνει επίσης σημαντικά τις εκπομπές του διοξειδίου του θείου αλλά και της σωματιδιακής ουσίας (Particulate matter).
- ✧ Σαν ενισχυτής του αριθμού οκτανίων αντικαθιστά άλλα επιβλαβή πρόσθετα, όπως τον μόλυβδο.
- ✧ Σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα των οποίων τα αποθέματα είναι πεπερασμένα, η αιθανόλη είναι ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, αφού προέρχεται από την βιομάζα.
- ✧ Αυξάνει τον αριθμό των οκτανίων της βενζίνης με μικρό κόστος.
- ✧ Μειώνεται η εξάρτηση των κρατών από το πετρέλαιο.
- ✧ Δημιουργούνται νέες προοπτικές απασχόλησης στον γεωργικό τομέα, καθώς ανοίγει ο δρόμος για τις ενεργειακές καλλιέργειες όπως του σακχαροκάλαμου, του σόργου κ.α.
- ✧ Παράγεται εύκολα ακόμα και σε οικογενειακή κλίμακα και αποδίδει 34% περισσότερη ενέργεια από αυτή που απαιτείται για την παραγωγή της.



Σχήμα 1.1: Παραγωγή καύσιμης αιθανόλης [http://www.africaoils.co.za/images/ethanol_fuel_diagrambig.jpg].

1.3.2. Μειονεκτήματα της χρήσης της καύσιμης αιθανόλης

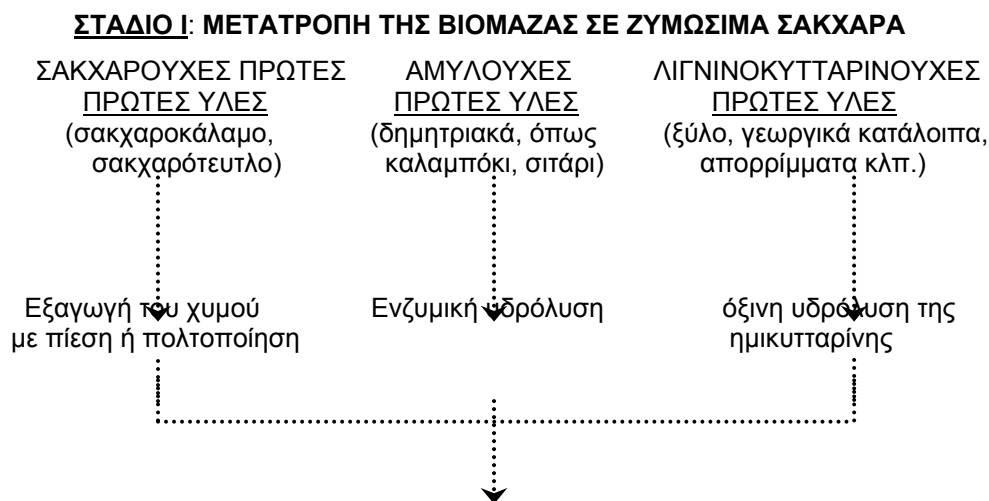
Αν και η χρήση της καύσιμης αιθανόλης συγκεντρώνει σημαντικά πλεονεκτήματα, υπάρχει και η αντίθετη άποψη που θεωρεί πως η χρήση της δεν θα λειτουργήσει θετικά. Πιο συγκεκριμένα [<http://www.nwicc.com/pages/continuing/business/ethanol/Module1.htm>]:

- ✧ Διατυπώνεται η άποψη ότι είναι πιο σημαντικό να χρησιμοποιηθεί η βιομάζα ως τροφή για να αντιμετωπιστεί η παγκόσμια πείνα, παρά να χρησιμοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης.
- ✧ Το ενεργειακό περιεχόμενο της αιθανόλης, ισοδυναμεί με τα 2/3 του αντίστοιχου της βενζίνης [Lynd, 1996]. Συνεπώς χρειάζεται περισσότερη αιθανόλη για να καλυφθεί η ίδια απόσταση [http://www.transportation.anl.gov/competitions/ethanol_challenge/ethanol.html] από ένα όχημα.
- ✧ Το κόστος παραγωγής της αιθανόλης είναι ακόμα υψηλότερο από της βενζίνης.
- ✧ Η αιθανόλη μπορεί να μπλοκάρει ή ακόμη και να καταστρέψει τμήματα του συστήματος καυσίμων σε ορισμένα οχήματα και να σταματήσει τη ροή του μίγματος καυσίμου, ειδικότερα σε ζεστές καιρικές συνθήκες.
- ✧ Πιστεύεται επίσης πως η μείωση των εκπομπών δεν είναι σημαντική και ελάχιστα συνεισφέρει στην βελτίωση της κατάστασης του περιβάλλοντος.
- ✧ Τέλος, οι παραγωγοί των υπολοίπων καυσίμων εναντιώνονται στην παροχή ιδιαίτερων κινήτρων στην βιομηχανία της βιοαιθανόλης.

1.4. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΒΙΟΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Ιστορικές αναφορές και ευρήματα στην Αρχαία Μεσοποταμία, την Κίνα και την Αίγυπτο μαρτυρούν ότι η διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης ήταν γνωστή 5000-8000 χρόνια πριν. Η τυχαία δημιουργία αλκοολούχων ποτών μετά από έκθεση χυμών από φρούτα ή εκχυλισμάτων δημητριακών στον αέρα ερμηνεύτηκε μόλις τον 19^ο αιώνα ενώ η κατανόηση του μηχανισμού βελτιώνεται με το πέρασμα του χρόνου καθώς αυξάνονται η εμπειρία και τα επιστημονικά δεδομένα. Η διαδικασία παραγωγής αιθανόλης όπως παρουσιάζεται στο πιο κάτω σχήμα 1.2, περιλαμβάνει τρία στάδια [Glazer *et al.*, 1995].

- ✧ Στάδιο I: Παραλαβή των περιεχόμενων ζυμώσιμων σακχάρων από τις πρώτες ύλες, με την βοήθεια φυσικών, χημικών ή ενζυμικών τεχνικών.
- ✧ Στάδιο II: Μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη, μέσω της αλκοολικής ζύμωσης.
- ✧ Στάδιο III: Ανάκτηση της αιθανόλης, με απόσταξη, ως μίγμα 95.6% αιθανόλης και 4.4% νερού. Για την ανάκτηση της άνυδρης αιθανόλης απαιτούνται επιπλέον διαδικασίες απόσταξης.





Σχήμα 1.2: Στάδια μετατροπής της βιομάζας σε αιθανόλη [Glazer *et al.*, 1995].

1.4.1. Στάδιο I: Μετατροπή βιομάζας σε ζυμώσιμα σάκχαρα

Η αιθανόλη μπορεί να παραχθεί από μια ποικιλία γεωργικών πρώτων υλών αλλά και άχρηστων υλικών. Η καταλληλότητα μιας πρώτης ύλης εκτιμάται με βάση την απόδοσή της σε αιθανόλη, την διαθεσιμότητα της και το κόστος παραγωγής και επεξεργασίας της. Οι κατάλληλες πρώτες ύλες γενικά χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, στις σακχαρούχες, τις αμυλούχες και τις κυτταρινούχες:

Σακχαρούχες: Σακχαρότευτλα, σακχαροκάλαμο, γλυκό σόργο, μελάσα, ώριμα φρούτα κ.α.

Αμυλούχες: Δημητριακά (κυρίως καλαμπόκι), πατάτα, αγριαγκινάρα κ.α.

Κυτταρινούχες: Ξύλο, άχυρα, άχρηστο χαρτί, απορρίμματα κ.α.

Πίνακας 1.2.: Μέση απόδοση σε 99,5 % αιθανόλη, ανά τόνο διάφορων πρώτων υλών [http://www.journeytoforever.org/biofuel_library/ethanol_motherearth/meCh3.html].

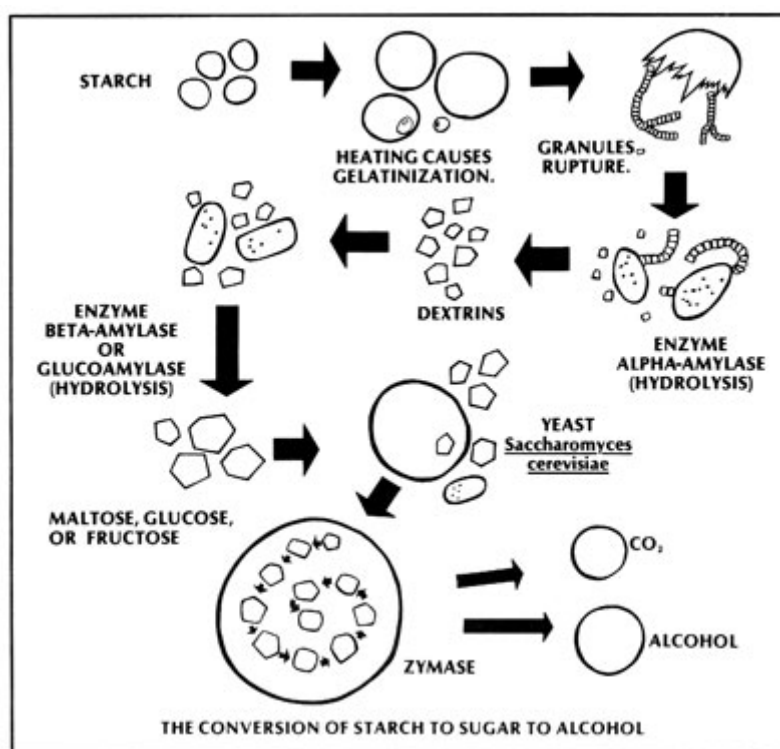
| Πρώτη ύλη | Γαλόνια | Πρώτη ύλη | Γαλόνια |
|-----------------|---------|---------------------------|---------|
| Σιτάρι | 85.0 | Γλυκοπατάτες | 34.2 |
| Καλαμπόκι | 84.0 | Yams (είδος γλυκοπατάτας) | 27.3 |
| Φαγόπυρον | 83.4 | Πατάτες | 22.9 |
| Σταφίδες | 81.4 | Σακχαρότευτλα | 22.1 |
| Σόργο κόκκος | 79.5 | Φρέσκα σύκα | 21.0 |
| Ρύζι | 79.5 | Αγκινάρες της Ιερουσαλήμ | 20.0 |
| Κριθάρι | 79.2 | Ανανάδες | 15.6 |
| Ξηροί χουρμάδες | 79.0 | Σακχαροκάλαμο | 15.2 |
| Σίκαλη | 78.8 | Σταφύλια | 15.1 |
| Δαμάσκηνα | 72.0 | Μήλα | 14.4 |
| Μελάσα | 70.4 | Βερίκοκα | 13.6 |
| Σόργο καλάμι | 70.4 | Αχλάδια | 11.5 |
| Βρώμη | 63.6 | Ροδάκινα | 11.5 |
| Ξηρά σύκα | 59.0 | Καρότα | 9.8 |

Σακχαρούχες πρώτες ύλες

Η εξαγωγή των σακχάρων από τις σακχαρούχες πρώτες ύλες είναι ιδιαίτερος απλή και γίνεται με μηχανική πίεση του υλικού όπως για παράδειγμα στα σακχαροκάλαμα ή με πολτοποίηση όπως στα σακχαρότευτλα. Τα σάκχαρα που προκύπτουν μπορούν να υδρολυθούν άμεσα από τα ένζυμα των ζυμών. Εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας τους σε σάκχαρα και νερό, οι συγκεκριμένες πρώτες ύλες μπορούν να αλλοιωθούν εύκολα και δεν είναι εύκολη η αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα σακχαροκάλαμα και τα σακχαρότευτλα προτιμώνται συνήθως λόγω της χαμηλότερης τιμής τους σε σύγκριση με άλλα προϊόντα όπως π.χ. διάφορα φρούτα. Επίσης, μια από τις φθηνότερες πηγές σακχάρων είναι η μελάσα (παραπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης) η οποία δεν χρειάζεται καμία κατεργασία και είναι πλούσια σε σάκχαρα, αζωτούχα υλικά, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Στην Ελλάδα για παραγωγή οινοπνεύματος χρησιμοποιείται κυρίως η μελάσα (από σακχαρότευτλα και σακχαροκάλαμα) και η σταφίδα.

Αμυλούχες πρώτες ύλες

Στην περίπτωση των αμυλούχων πρώτων υλών η διαδικασία είναι πιο πολύπλοκη (σχήμα), αφού πρέπει αρχικά το άμυλο να διασπαστεί σε απλά σάκχαρα ώστε να μπορούν να καταβολιστούν από τη ζύμη.



Σχήμα 1.3: Η μετατροπή του αμύλου σε αιθανόλη

[http://www.journeytoforever.org/biofuel_library/ethanol_motherearth/meCh1.html]

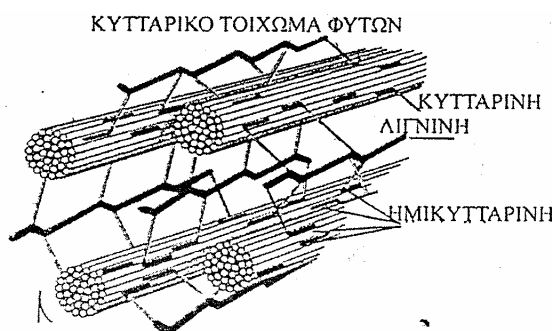
Η διάσπαση γίνεται είτε ενζυμικά, με τις αμυλάσες, είτε με τη χρήση οξέων. Οι αμυλάσες δεν παράγονται από τις ζύμες και παραλαμβάνονται από άλλους μικροοργανισμούς όπως βακτήρια (*Bacillus subtilis*) ή μυκηλιακούς μύκητες (*Aspergillus oryzae*). Για να μπορέσουν τα ένζυμα και τα οξέα να έχουν πρόσβαση στο άμυλο και να το υδρολύσουν, πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε διαλυτή μορφή με βρασμό. Η υψηλή θερμοκρασία σπάει τα κυτταρικά τοιχώματα και απελευθερώνεται το άμυλο. Το πλεονέκτημα των αμυλούχων πρώτων υλών

έναντι των σακχαρούχων, είναι η ικανότητα τους να αποθηκεύονται χωρίς σημαντική απώλεια σακχάρων.

Κυτταρινούχες πρώτες ύλες

Η αξιοποίηση των κυτταρινούχων πρώτων υλών για την παραγωγή αιθανόλης αποτελεί μια πρόκληση, αφού παγκοσμίως τεράστιες ποσότητες απορριμμάτων και άχρηστων φυτικών υλικών, θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμες. Στην παρούσα φάση όμως η παραγωγή αιθανόλης από κυτταρινούχες πρώτες ύλες, παρουσιάζει πολλές τεχνικές δυσκολίες με αποτέλεσμα το κόστος της να παραμένει υψηλό και ασύμφορο. Μεγάλο μέρος της έρευνας που γίνεται στον τομέα της βιοαιθανόλης, ασχολείται με την βελτίωση της εν λόγω διαδικασίας.

Τα κυτταρικά τοιχώματα της βιομάζας, αποτελούνται από ένα σύμπλοκο που δημιουργείται από δυο πολυσακχαρίτες (κυτταρίνη και ημικυτταρίνη) και ένα αρωματικό πολυμερές (λιγνίνη) [http://www1.eere.energy.gov/biomass/abcs_biofuels.html#feed] (σχήμα 1.4).



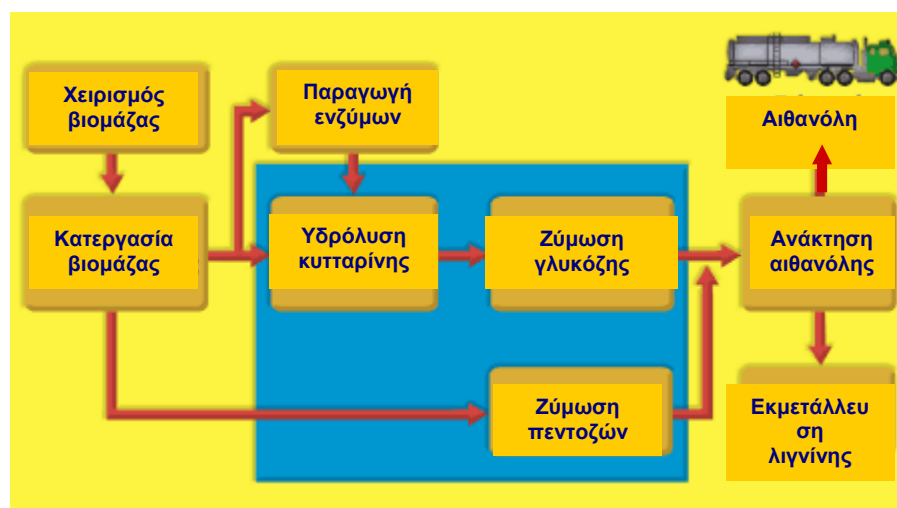
Σχήμα 1.4: Δομή λιγνινοκυτταρινούχου υλικού.

- Η **κυτταρίνη** είναι ένας πολυσακχαρίτης που συνίσταται από γλυκόζη. Ανάλογα με το είδος της βιομάζας, αποτελεί το 40%-60% του βάρους της. Η κρυσταλλική της δομή καθιστά δύσκολη την υδρόλυση της.
- Η **ημικυτταρίνη** είναι επίσης ένας πολυσακχαρίτης και συνίσταται από μια ποικιλία σακχάρων με πέντε και έξι άτομα άνθρακα. Αποτελεί το 20%-40% του βάρους της βιομάζας. Η υδρόλυση της σε απλά σάκχαρα, είναι σχετικά εύκολη, όμως οι πεντόζες είναι δύσκολο να ζυμωθούν σε αλκοόλη.
- Η **λιγνίνη** είναι ένα σύνθετο πολυμερές η οποία σταθεροποιεί το σύμπλοκο κυτταρίνης-ημικυτταρίνης και διατηρεί την δομή των φυτών. Αποτελεί το 10%-24% του βάρους της βιομάζας. Μετά την μετατροπή των σακχάρων της βιομάζας σε αιθανόλη, η λιγνίνη παραμένει ως υπόλειμμα. Περιέχει μεγάλα ποσά ενέργειας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ηλεκτρισμού.

Για να παραχθεί αιθανόλη από τη βιομάζα πρέπει πρώτα να διασπαστούν η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη σε απλά σάκχαρα, μια διαδικασία που ονομάζεται σακχαροποίηση. Η σακχαροποίηση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία για την οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν μια ποικιλία από βιολογικές, χημικές και θερμικές διεργασίες. Στα διάφορα εργαστήρια μελετώνται διάφοροι συνδυασμοί των παραπάνω διεργασιών, με σκοπό να αναπτυχθούν όσο το δυνατό πιο αποδοτικές και πιο οικονομικές παραγωγές αιθανόλης. Συνοπτικά τα στάδια της διαδικασίας είναι (σχήμα 1.5):

- ❖ **Χειρισμός βιομάζας:** Η βιομάζα επεξεργάζεται έτσι ώστε να μειωθεί ο όγκος της και να είναι πιο εύκολος και πιο αποδοτικός ο χειρισμός της.

- ✧ **Κατεργασία βιομάζας:** Στο στάδιο αυτό, η ημικυτταρίνη διασπάται σε απλά σάκχαρα. Η υδρόλυση της ημικυτταρίνης επιτυγχάνεται με την ανάμειξη της βιομάζας με θειικό οξύ. Προκύπτει ένα μίγμα διαλυτών πεντοζών (ξυλόζη και αραβινόζη) και διαλυτών εξοζών (μανόζη και γαλακτόζη). Μόλις ένα μικρό ποσοστό της ημικυτταρίνης μετατρέπεται σε γλυκόζη.
- ✧ **Παραγωγή ενζύμων:** Όπως και στην περίπτωση του αμύλου τα απαιτούμενα υδρολυτικά ένζυμα (κυτταρινάσες) που διασπούν την κυτταρίνη, δεν παράγονται από τις ζύμες και παραλαμβάνονται από άλλους μικροοργανισμούς σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες. Αν και έχει μελετηθεί μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών για την παραγωγή κυτταρινάσης, πολύ κοινά είναι είδη του γένους *Trichoderma*. Σημαντικές ποσότητες κυτταρινάσης παράγουν επίσης ορισμένα είδη των γενών *Penicillium* και *Aspergillus* [Winkelmann, 1992].
- ✧ **Υδρόλυση της κυτταρίνης:** Τα ένζυμα που παρήχθησαν στο προηγούμενο στάδιο, προστίθενται στο ζυμωτήρα μαζί με το υπόστρωμα και τη ζύμη. Η μετατροπή της κυτταρίνης σε αιθανόλη από αναερόβια βακτήρια, είναι πιο φθηνή από τη διαδικασία που συνδυάζει τη δράση μηκυτιακών κυτταρινασών και ζυμών για παραγωγή αλκοόλης. Τρία είδη κλωστριδίων, τα *Clostridium thermocellum*, *C. thermosaccharolyticum* και *C. thermohydrosulfuricum*, βακτήρια Gram-αρνητικά, θερμοφιλά και αναερόβια αναφέρεται ότι συμμετέχουν σε διαδικασίες παραγωγής ενός βήματος [Glazer *et al.*, 1995].
- ✧ **Ζύμωση των πεντοζών:** Η ξυλόζη είναι η κύρια πεντόζη που παράγεται από τη διάσπαση της ημικυτταρίνης. Στο στάδιο αυτό η ξυλόζη ζυμώνεται από το βακτήριο *Zymomonas mobilis* ή άλλα ανασυνδυασμένα στελέχη.



Σχήμα 1.5: Διαδικασία παραγωγής αιθανόλης από κυτταρινούχες πρώτες ύλες [http://www1.eere.energy.gov/biomass/abcs_biofuels.html#feed].

Στην περίπτωση λιγνινοκυτταρινούχων και αμυλούχων πρώτων υλών, προτάθηκε ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωσή τους διαδικασία η οποία μειώνει το κόστος παραγωγής [Wyman, 1999]. Ορισμένα παραδείγματα είναι η παραγωγή αιθανόλης από λιγνινοκυτταρινούχα απορρίμματα με χρησιμοποίηση κυτταρινάσης του *T. reesei* και κύτταρα ζυμών *Kluyveromyces fragilis* και *Saccharomyces cerevisiae* [Krishna *et al.*, 2001], καθώς επίσης και η παραγωγή αιθανόλης από σόργο και ρύζι, με ταυτόχρονη χρησιμοποίηση των *Aspergillus niger* και *Saccharomyces cerevisiae* [Suresh *et al.*, 1999].

Για παραγωγή αιθανόλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί χαρτί και άλλες πηγές λιγνινοκυτταρίνης, που αποτελούν πάνω από το 50% της μάζας των αστικών στερεών απορριμμάτων. Μια πρόταση για την παραγωγή αιθανόλης από απορρίμματα αναφέρει ότι η προετοιμασία του υποστρώματος περιλαμβάνει την απομάκρυνση του πλαστικού, του μετάλλου και του γυαλιού από τα στερεά απόβλητα, μετά την οποία το υπόλειμμα κομματιάζεται και

μεταφέρεται σε έναν αντιδραστήρα. Ακολούθως η λιγνινοκυτταρίνη αποικοδομείται με συμπυκνωμένο θειικό ή υδροχλωρικό οξύ σε θερμοκρασία περίπου 40 °C. Η ημικυτταρίνη και η κυτταρίνη μετατρέπονται σε μονομερή σάκχαρα με πολύ λίγα ανεπιθύμητα προϊόντα αποικοδόμησης. Στη συνέχεια, το οξύ διαχωρίζεται από τα σάκχαρα τα οποία μετατρέπονται σε αιθανόλη με τη δράση ζυμών και βακτηρίων. Η υδρόλυση με το οξύ απελευθερώνει τα σάκχαρα πιο αποδοτικά και γρήγορα από ένα υπόστρωμα το οποίο ίσως δεν είναι εύκολο να αποικοδομηθεί από ένζυμα. Όμως, είναι δύσκολη η χρήση και η ανάκτηση μεγάλων όγκων συμπυκνωμένων οξέων. Εναλλακτικά της χρήσης συμπυκνωμένων οξέων, προτάθηκε η χρήση ενζύμων αποικοδόμησης πολυσακχαριτών από θερμοφιλά βακτήρια που δρουν σε θερμοκρασίες πάνω από 100 °C [Glazer *et al.*, 1995].

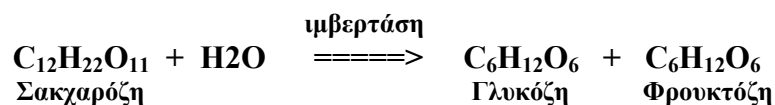
Η πρόοδος της γενετικής μηχανικής τα τελευταία χρόνια έκανε δυνατή αυτή τη διαδικασία με τη βοήθεια ανασυνδυασμένων στελεχών. Έχει για παράδειγμα κατασκευαστεί στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο φέρει το γονίδιο για την παραγωγή κυτταρινάσης από το *Trichoderma reesei*.

1.4.2. Στάδιο II: Αλκοολική ζύμωση

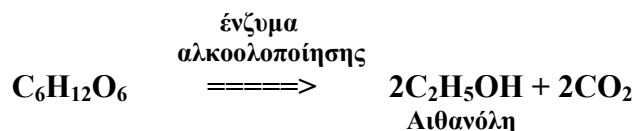
1.4.2.1. Γενικά

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

Οι δισακχαρίτες, όπως η σακχαρόζη, σε πρώτο στάδιο διασπώνται σε απλά σάκχαρα με την βοήθεια του ενζύμου, ιμπερτάση:



Στην συνέχεια τα απλά σάκχαρα μετατρέπονται σε αιθανόλη και CO₂ με τη βοήθεια ενζύμων.



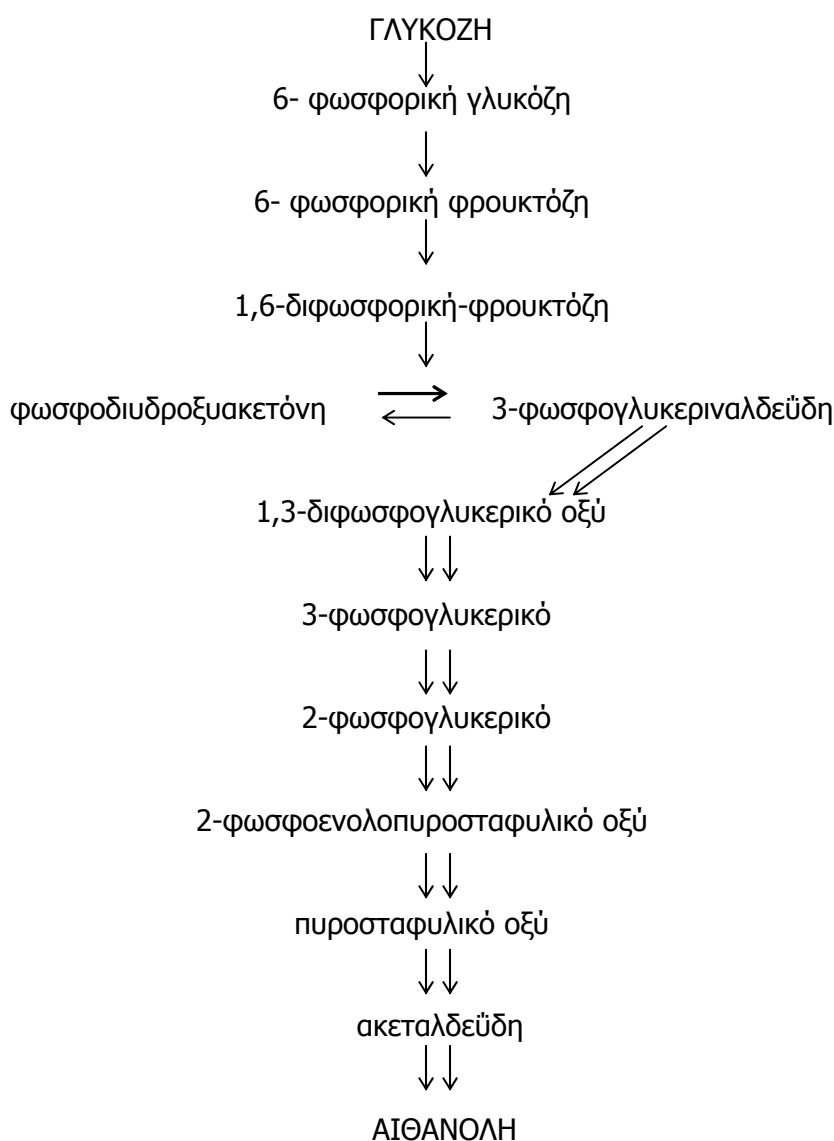
Η ζύμωση είναι μια μεταβολική διεργασία όπου δεν συμμετέχει μοριακό οξυγόνο και το υπόστρωμα (αρχικός δότης ηλεκτρονίων) και το προϊόν (τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων) είναι οργανικές ενώσεις. Στην αλκοολική ζύμωση το προτιμώμενο υπόστρωμα είναι η γλυκόζη και το προϊόν είναι η αιθανόλη. Τα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae*, προτιμούν να ζυμώνουν ακόμα και παρουσία μοριακού οξυγόνου, αν και έχουν την ικανότητα να αναπνέουν. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν σάκχαρα αλλά καταφεύγουν σ' αυτήν μόνο απουσία οξυγόνου κυρίως λόγω της τοξικής δράσης της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος.

Από την εξίσωση της αλκοολικής ζύμωσης, υπολογίζεται πως η θεωρητική απόδοση της γλυκόζης σε αιθανόλη είναι 51.1% κ. β. Όμως πρακτικά, η απόδοση είναι μικρότερη αφού η αιθανόλη είναι παραπροϊόν της ζύμωσης και ένα μέρος του υποστρώματος χρησιμοποιείται στην αύξηση των κυττάρων. Οι ζύμες παράγουν 10 γραμμάρια ξηρού βάρους κυττάρων για κάθε συντιθέμενο μόριο ATP. Με τη ζύμωση κάθε μόριο γλυκόζης παράγει 2 μόρια ATP, έτσι η θεωρητική απόδοση της γλυκόζης σε κύτταρα είναι 20 γραμμάρια ξηρού βάρους. Στα

κύτταρα ο άνθρακας αποτελεί περίπου το 50%. Η γλυκόζη είναι η μόνη πηγή άνθρακα στο υπόστρωμα της ζύμωσης και το ποσοστό άνθρακα που περιέχεται σ' αυτή αποτελεί το 40%. Επομένως απαιτούνται 25 γραμμάρια γλυκόζης για να δώσουν 10 γραμμάρια κυτταρικού άνθρακα. Άρα, επιτρεπόμενης της κυτταρικής αύξησης, η μέγιστη απόδοση της αλκοολικής ζύμωσης σε αιθανόλη, είναι περίπου 86% της θεωρητικά αναμενόμενης [Glazer *et al.*, 1995].

Η ζύμωση από τη φύση της είναι μια ανεπαρκής οδός απελευθέρωσης ενέργειας. Μόνο το 6-8% περίπου της ενέργειας των χημικών δεσμών της γλυκόζης μετατρέπεται σε άμεσα διαθέσιμη ενέργεια (ATP), ενώ η περισσότερη από την ενέργεια παραμένει δεσμευμένη στο τελικό δέκτη των ηλεκτρονίων, την αιθανόλη (Jackson, 1994).

Η αλκοολική ζύμωση γίνεται με έναν πολύπλοκο μηχανισμό, τα διάφορα στάδια του οποίου καταλύονται από μια σειρά ενζύμων. Η αλκοολική ζύμωση, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα αποτελεί συνέχεια της γλυκόλυσης η οποία είναι γνωστή και ως πορεία Embden – Meyerhoff (σχήμα 1.6).



Σχήμα 1.6: Ο μηχανισμός της αλκοολικής ζύμωσης [Stryer, 1997].

1.4.2.2. Παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης

Τα παραπροϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης είναι χημικές ενώσεις που προέρχονται είτε από τον μηχανισμό της, είτε από άλλες παράλληλες χημικές, είτε τέλος κατά την ωρίμανση των προϊόντων της ζύμωσης. Τα κυριότερα παραπροϊόντα είναι:

Μεθανόλη: Δεν προέρχεται από τον μηχανισμό της αλκοολικής ζύμωσης, αλλά παράγεται από την απομεθυλίωση των πηκτινών που περιέχονται στο υπόστρωμα.

Ανώτερες αλκοόλες: Οι κυριότερες ανώτερες αλκοόλες είναι οι προπανόλη-1, βουτανόλη-1, βουτανόλη-2, 2-μέθυλοπροπανόλη-1, 2-μέθυλοβουτανόλη-1, πεντανόλη-1 και εξανόλη-1. Παράγονται κατά την απαμίνωση των ελεύθερων αμινοξέων (Webb *et al*, 1963), αλλά και των αμινοξέων που προκύπτουν από την πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών της ζύμης και του υποστρώματος (Hawtmann *et al*, 1986).

Γλυκερίνη: Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης. Ο σχηματισμός της ευνοείται από χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή περιεκτικότητα σε τρυγικό οξύ και από την προσθήκη SO₂.

Ακεταλδεΐδη: Είναι ενδιάμεσο προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης που προκύπτει, από την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Αν προστεθεί NaHSO₃ και SO₂ στο σακχαρούχο υπόστρωμα πριν τη ζύμωση ή κατά την διάρκεια της, η παραγόμενη ακεταλδεΐδη σχηματίζει προϊόν προσθήκης και έτσι δεν ανάγεται περαιτέρω προς αιθανόλη.

Εστέρες: Σπουδαιότερος είναι ο οξικός αιθυλεστέρας CH₃COOC₂H₅, ο οποίος σχηματίζεται από την αντίδραση του οξικού οξέος με την αιθανόλη (Yoshioka *et al*, 1984).

Οξέα: Κυριότερο είναι το οξικό οξύ, το οποίο παράγεται ως κανονικό προϊόν της αλκοολικής ζύμωσης σε ποσότητες μικρότερες από 300 mg/l. Υψηλά επίπεδα οξικού οξέος, συνήθως σχετίζονται με παρουσία στο εκχύλισμα βακτηρίων του οξικού και του γαλακτικού οξέος.

Ακετάλες: Σχηματίζονται από την αντίδραση της ακεταλδεΐδης με την αιθανόλη.

1.4.2.3. Αναστολείς της αλκοολικής ζύμωσης

Υπάρχουν ορισμένοι χημικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να μειώσουν την απόδοση της αλκοολικής ζύμωσης ή ακόμα και να την αναστείλουν. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να ελέγχονται. Οι πιο σημαντικοί από τους αναστολείς είναι:

- ✧ **Αιθανόλη:** Το ίδιο το προϊόν δρα σαν αναστολέας σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αλκοολικοί βαθμοί μεγαλύτεροι των 5 αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό ορισμένων ζυμών, ενώ σε βαθμούς μεγαλύτερους των 12 τα περισσότερα κύτταρα θανατώνονται.
- ✧ **Φορμαλδεΐδη:** Η HCHO που χρησιμοποιείται με την μορφή φορμόλης ως αντισηπτικό ενάντια στα βακτήρια, υπό ορισμένες συνθήκες αναστέλλει την αλκοολική ζύμωση.
- ✧ **Θειώδες οξύ:** Το H₂SO₃ χρησιμοποιείται συνήθως για τη θείωση στις οινοδεξαμενές και πρέπει να είναι ελεύθερο αρσενικού, γιατί σε αντίθετη περίπτωση αποτελεί αναστολέα της ζύμωσης.
- ✧ **Μέταλλα:** Ορισμένα μέταλλα όπως το Cd, ο Cu, ο Pb, και ο Hg σε ορισμένες συγκεντρώσεις δρουν σαν αναστολείς.

1.4.2.4. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις παραγωγή βιοαιθανόλης

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση της αλκοολικής ζύμωσης είναι κυρίως οι ζύμες και ορισμένα βακτήρια (πίνακας 1.3). Αν και ο μηχανισμός της ζύμωσης και τα τελικά προϊόντα της, είναι ίδια για όλους τους οργανισμούς, αυτοί παρουσιάζουν διαφορές ως προς την ικανότητα να ζυμώνουν σακχαρούχα διαλύματα διαφόρων

πυκνοτήτων, την επιλογή του υποστρώματος, τον χρόνο περάτωσης της ζύμωσης και το ποσό των παραπροϊόντων που παράγουν.

Πίνακας 1.3: Είδη ζυμών και βακτηρίων που παράγουν αιθανόλη και τα υποστρώματα που χρησιμοποιούν [Glazer *et al.*, 1995].

| ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ | ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝ |
|--|---|
| Ζύμες | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Γλυκόζη, Φρουκτόζη, Γαλακτόζη, Μαλτόζη, Μαλτοτριόζη, Ξυλουλόζη. |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> | Γλυκόζη, Φρουκτόζη, Γαλακτόζη, Μαλτόζη, Μαλτοτριόζη, Ξυλουλόζη. |
| <i>Saccharomyces rouxii</i> | Γλυκόζη, Φρουκτόζη, Μαλτόζη, Σακχαρόζη. |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> | Γλυκόζη, Γαλακτόζη, Λακτόζη. |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | Γλυκόζη, Γαλακτόζη, Λακτόζη. |
| <i>Candida pseudotropicalis</i> | Γλυκόζη, Γαλακτόζη, Λακτόζη. |
| <i>Candida tropicalis</i> | Γλυκόζη, Ξυλόζη, Ξυλουλόζη. |
| Βακτήρια | |
| <i>Zymomonas mobilis</i> | Γλυκόζη, Φρουκτόζη, Σακχαρόζη. |
| <i>Clostridium thermocellum</i> | Γλυκόζη, Κελλοβιόζη, Κυτταρίνη |
| <i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i> | Γλυκόζη, Κελλοβιόζη, Ξυλόζη, Σακχαρόζη, Άμυλο. |
| <i>Thermoanaerobium brockii</i> | Γλυκόζη, Σακχαρόζη, Κελλοβιόζη. |
| <i>Thermoanaerobium acetoethylicus</i> | Γλυκόζη, Σακχαρόζη, Κελλοβιόζη. |

Η ζύμη που κυρίως χρησιμοποιείται σε εργαστηριακό και βιομηχανικό επίπεδο, είναι η *Saccharomyces cerevisiae*. Χρησιμοποιείται στην αρτοποιία, στην ζυθοποιία και στην παραγωγή βιομηχανικής αιθανόλης. Η επιλογή του στελέχους που χρησιμοποιείται κάθε φορά εξαρτάται από την αποδοτικότητα του, το διαθέσιμο υπόστρωμα και άλλους παράγοντες όπως τη θερμοκρασία. Αν για παράδειγμα ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται τυρόγαλα, τότε χρησιμοποιούνται τα είδη *Torula cremoris* και *Candida pseudotropicalis*, τα οποία μπορούν να μετατρέπουν την λακτόζη σε αιθανόλη.

Εκτός από τις ζύμες, πολλά βακτήρια έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να παράγουν αιθανόλη και για την ικανότητά τους να καταναλώνουν και άλλα υποστρώματα εκτός από απλά σάκχαρα και δισακχαρίτες. Τα βακτήρια αυτά διακρίνονται σε [Walker, 1998]:

- **Μεσόφιλα:** *Leuconostoc mesenteroides*, *Erwinia amylovoras*, *Zymomonas mobilis*, *Sarcinia ventriculli*.
- **Θερμόφιλα:** Αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 60-65 °C. *Clostridium thermosaccharolyticum* και *Clostridium thermocellum*.

- Εξαιρετικά θερμοφιλα: Αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 65-70 °C, μπορούν να μετατρέψουν σε αιθανόλη το άμυλο, την ημικυτταρίνη, τη ξυλόζη και την κελλοβιόζη. *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfurium* και *Thermoanaerobium brockii*.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το βακτήριο *Zymomonas mobilis*. Είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο που μετατρέπει τη σακχαρόζη, τη φρουκτόζη και τη γλυκόζη σε αιθανόλη, μέσω της οδού Entner-Doudoroff (παραγωγή ενός μορίου ATP). Λαμβάνει τη γλυκόζη και παράγει αιθανόλη 3-4 φορές ταχύτερα από τη ζύμη, με αποδόσεις σε αιθανόλη μέχρι 97% της θεωρητικά μέγιστης. Αντίθετα από τις ζύμες, δεν απαιτεί οξυγόνο για την ανάπτυξή του και μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα φτωχό θρεπτικό μέσο χωρίς την απαίτηση οργανικών ενώσεων. Τα στελέχη του είδους αυτού είναι αλκοολοανθεκτικά, αντίθετα από τα πιο πολλά βακτήρια και έχουν υψηλή οσμωανθεκτικότητα αφού τα περισσότερα στελέχη του αναπτύσσονται σε διαλύματα γλυκόζης 40% κ.β. Όμως έχουν χαμηλή ανθεκτικότητα στα άλατα και κανένα στέλεχος δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε 2% NaCl. Πολλά στελέχη αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 38-40 °C.

Αν και η χρήση του *Zymomonas mobilis* στην παραγωγή αιθανόλης, παρουσιάζει αρκετά προτερήματα, δεν έχει αντικαταστήσει την *Saccharomyces cerevisiae* σε μεγάλη κλίμακα. Μερικοί από τους λόγους για την μη προτίμηση του αφορούν τον μεταβολισμό των υδατανθράκων στο *Zymomonas*, ο οποίος όπως έχει ήδη αναφερθεί γίνεται μέσω της οδού Entner-Doudoroff, αλλά και το pH στο οποίο αναπτύσσεται, το οποίο δημιουργεί περιβάλλον επιρρεπές σε μολύνσεις [Esser *et al.*, 1982].

1.4.2.4.1. Σύγκριση της καταλληλότητας ζυμών και βακτηρίων για την παραγωγή βιοαιθανόλης

Στα πλεονεκτήματα των ζυμών μπορούμε να αναφέρουμε πως οι ζύμες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή αιθανόλης, είναι στελέχη με υψηλή αποδοτικότητα και διαθέτουν έναν πολύ οικονομικό ρυθμό μετατροπής του υποστρώματος.

Αναπτύσσονται γρήγορα σε χαμηλά pH (3-4) στα οποία δύσκολα επιζούν άλλοι μικροοργανισμοί και συνεπώς ο κίνδυνος επιμόλυνσης είναι χαμηλός. Για τον λόγο αυτό, δεν απαιτείται η λήψη ειδικών προφυλάξεων, ώστε να διατηρηθούν τόσο το μέσο καλλιέργειας, όσο και ο ζυμωτήρας αποστειρωμένα.

Επιπρόσθετα, όταν οι ζύμες αναπτύσσονται σε αναερόβιες συνθήκες, δεν παράγουν παραπροϊόντα, τα οποία θα απαιτούσαν ειδικές διαδικασίες για τον διαχωρισμό τους κατά την απόσταξη της αλκοόλης [Esser *et al.*, 1982].

Το κύριο μειονέκτημα των ζυμών, είναι πως δεν μπορούν να δράσουν άμεσα σε όλες τις πρώτες ύλες που είναι διαθέσιμες στην παραγωγή βιοαιθανόλης. Για παράδειγμα τα αμυλούχα και κυτταρινούχα υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο αφού υποστούν υδρόλυση.

Ένα ακόμα μειονέκτημα είναι πως σε θερμοκρασίες άνω των 40 °C, αναστέλλονται η αύξηση και η αναπαραγωγή τους, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την ύπαρξη ενός ψυκτικού συστήματος. Το πρόβλημα αυτό μπορεί πιθανόν να αντιμετωπιστεί με την χρήση θερμοανθεκτικών μικροοργανισμών.

Σε αντίθεση με τις ζύμες, ορισμένα βακτήρια έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να χρησιμοποιούν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων και του αμύλου και της κυτταρίνης.

Ειδικά ορισμένα θερμοφιλα βακτήρια θα μπορούσαν να θεωρηθούν ιδανικοί μικροοργανισμοί για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Η ανάπτυξή τους σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα μια αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα, η οποία με την σειρά της προκαλεί έναν υψηλό ρυθμό ζύμωσης με υψηλή παραγωγή. Αυτό θεωρητικά επιτρέπει την χρησιμοποίηση ζύμωσης συνεχούς ροής και την λήψη της αλκοόλης κατευθείαν από τον

ζυμωτήρα. Επιπλέον στην περίπτωση των θερμοφίλων βακτηρίων δεν απαιτείται σύστημα ψύξης, ενώ η υψηλή θερμοκρασία μειώνει τις πιθανότητες για μόλυνση.

Όμως παρά τα πλεονεκτήματα, τα θερμοφιλά βακτήρια, δεν έχουν αντικαταστήσει τις ζύμες στην βιομηχανία εξαιτίας ορισμένων ουσιαστικών μειονεκτημάτων τους. Όλα τα βακτήρια που έχουν μελετηθεί εκτενώς δίνουν χαμηλότερα ποσά αλκοόλης σε σχέση με αυτά που δίνουν οι ζύμες, ενώ υπερτερούν στην παραγωγή οξικού οξέος, γαλακτικού οξέος και H₂. Τα συγκεκριμένα παραπροϊόντα δημιουργούν τεχνικά προβλήματα στον διαχωρισμό τους από την αιθανόλη.

Τέλος, το πιο σημαντικό μειονέκτημα, είναι η μικρή αλκοολοανθεκτικότητα των βακτηρίων. Τα βακτήρια είναι ικανά να αντέξουν συγκέντρωση αλκοόλης 3-8%, σε αντίθεση με τις ζύμες που αντέχουν σε συγκεντρώσεις αιθανόλης 6-12% ή και μεγαλύτερες, χωρίς σημαντική μείωση του ρυθμού αύξησης τους [Esser *et al.*, 1982].

1.4.3. Στάδιο III: Ανάκτηση αιθανόλης

Η ανάκτηση της αιθανόλης μπορεί να επιτευχθεί με απόσταξη. Σε πρώτο στάδιο η αιθανόλη παραλαμβάνεται σε μίγμα με νερό, από το οποίο διαχωρίζεται με κλασματική απόσταξη. Αν και το σημείο βρασμού της αιθανόλης (78.5 °C) είναι αρκετά χαμηλότερο από του νερού (100 °C), τα δυο αυτά υλικά δεν μπορούν να διαχωριστούν τελείως με απόσταξη. Αυτό συμβαίνει γιατί δημιουργείται ένα δυαδικό αζεοτροπικό μίγμα (95% αιθανόλης και 5% νερού), το σημείο βρασμού του οποίου είναι 78.15 °C. Ένα υγρό μίγμα ονομάζεται αζεοτροπικό όταν έχει την ιδιότητα να παράγει ατμούς της ίδιας με αυτό σύστασης. Δηλαδή το μίγμα συμπεριφέρεται σαν καθαρό παρασκεύασμα. Αν χρησιμοποιηθεί μια αποδοτική στήλη απόσταξης, το πρώτο κλάσμα που θα παραλαμβάνεται είναι αυτό του αζεοτροπικού μίγματος, το οποίο έχει το χαμηλότερο σημείο βρασμού. Όσο αποδοτική κι αν είναι η στήλη, αποκλείεται η παραλαβή καθαρής αλκοόλης ή έστω συγκέντρωσης μεγαλύτερης από 95% [<http://www.ucc.ie/ucc/depts./chem./ddchem/html/comp/ethanol.html#Ethanol>].

Άνυδρη αιθανόλη προκύπτει από το διάλυμα αιθανόλης 95% μετά από σχηματισμό ενός άλλου, τριαδικού αζεοτροπικού μίγματος με βενζίνη. Αυτό το αζεοτροπικό μίγμα περιέχει 74% βενζίνη, 18.5% αιθανόλη και 7.5% νερό. Το σημείο βρασμού του είναι 68 °C και μπορεί να αποσταχθεί δίνοντας άνυδρη αιθανόλη. Η πορεία αυτή απαιτεί ένα σύστημα δυο στηλών που αποτελείται από μια ραβδωτή στήλη αφυδάτωσης. Η πορεία όμως είναι αρκετά δαπανηρή και γι' αυτό μελετώνται εναλλακτικές μέθοδοι απομακρύνσεως του νερού. Το νερό είναι δυνατό να απομακρυνθεί με τη χρήση απορροφητών, όπως θρυμματισμένα δημητριακά και ανόργανα ξηραντικά. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν διαλύτες για την αιθανόλη που δεν αναμιγνύονται με το νερό, όπως ο φθαλικός διβουτυλεστέρας και το CO₂.

2. ΟΙ ΖΥΜΕΣ

2.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Ως ζύμες ορίζονται εκείνοι οι βασιδιομύκητες ή ασκομύκητες, οι οποίοι έχουν μονοκύτταρη βλαστητική φάση, πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση ή διχοτόμηση και δεν σχηματίζουν πάντα σπόρια. Ευρέως εξαπλωμένες στο φυσικό περιβάλλον, ποικίλουν σε μέγεθος, σχήμα και χρώμα αναλόγως του γένους ή του είδους. Μπορούν να παρατηρηθούν μόνο με μικροσκόπιο λόγω των μικρών τους διαστάσεων. Το μήκος των κυττάρων διαφέρει πολύ, μπορεί να είναι μόνο 2-3 μm ή ακόμη και 20-50 μm σε μερικά είδη. Το πλάτος τους κυμαίνεται μεταξύ 1-10 μm. Το κυτταρικό τους σχήμα είναι στενά συνδεδεμένο με τη λειτουργία του κυττάρου και έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλεται υπό την επίδραση εξωτερικών συνθηκών όπως της επιφανειακής τάσης και της σύστασης του θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα της ζύμης μπορεί να είναι ελλειψοειδή - ωοειδή (*Saccharomyces* spp.), κυλινδρικά με ημισφαιρικά άκρα

(*Schizosaccharomyces* spp.), φιαλόμορφα (*Pityrosporum* spp.), νηματοειδή (με ψευδοϋφές και υφές με διαφράγματα π.χ. *Candida albicans*), τριγωνικά (*Trigonopsis* spp.), καμπυλωτά (*Cryptococcus cereanus*), σφαιρικά ή επιμηκυμένα [Walker, 1998]. Έχουν περιγραφεί περίπου 500 είδη «αληθινών» ζυμών, τα οποία κατατάσσονται σε 69 γένη. Υπάρχει επίσης ένας σημαντικός αριθμός οργανισμών, οι οποίοι υπό ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης έχουν μια φάση ζωής, που μοιάζει με αυτή των ζυμών [Rose *et al.*, 1993].

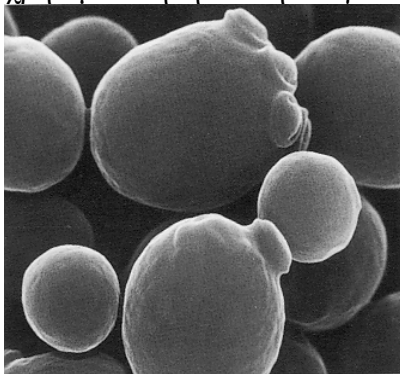
Τα κύτταρα των ζυμών συγκροτούνται κυρίως από μακρομόρια που συνδυάζονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τα δομικά συστατικά του κυττάρου. Τα μακρομόρια αυτά είναι κυρίως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα (πίνακας 2.1), οι συγκεντρώσεις των οποίων ποικίλουν σύμφωνα με τις συνθήκες ανάπτυξης και το είδος.

Πίνακας 2.1: Μακρομοριακά συστατικά των κυττάρων της ζύμης [Walker, 1998].

| ΕΙΔΟΣ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΟΥ | ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ |
|-------------------|---|
| Πρωτεΐνες | <u>Δομικές πρωτεΐνες:</u> Κυρίως α-ακτίνη και τουμπουλίνη του κυτταροσκελετού, ιστόνες και μεμβρανικές πρωτεΐνες. <u>Ριβοσωματικές πρωτεΐνες:</u> Βρίσκονται στις 60S και 40S ριβονουκλεοπρωτεϊνικές υπομονάδες. <u>Ορμονικές πρωτεΐνες:</u> Φερομόνες σύζευξης. <u>Λειτουργικές πρωτεΐνες:</u> Περιλαμβάνουν αρκετά ένζυμα. |
| Γλυκοπρωτεΐνες | Δομικές μαννοπρωτεΐνες στα κυτταρικά τοιχώματα και ένζυμα (π. χ. ιμπερτάση) στην περιπλαστική ζώνη. |
| Πολυσακχαρίτες | <u>Δομικοί πολυσακχαρίτες:</u> Κυρίως η γλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος, η μαννάνη, η χιτίνη και οι ετεροπολυσακχαρίτες της κάψουλας. <u>Αποθηκευτικοί πολυσακχαρίτες:</u> Γλυκογόνο και τρεχαλόζη. |
| Πολυφωσφορικά | Κυρίως αποθηκευτικά πολυφωσφορικά στο κενοτόπιο. |
| Λιπίδια | <u>Δομικά φωσfolιπίδια:</u> Ελεύθερες στερόλες στις μεμβράνες. <u>Αποθηκευτικά λιπίδια:</u> Εστέρες στερόλης και τριγλυκερίδια. <u>Λειτουργικά λιπίδια:</u> Φωσφογλυκερινικά παράγωγα (μεταβίβαση σήματος) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (διεργασίες ανάπτυξης και μεταβολισμού). |
| Νουκλεϊκά οξέα | <u>Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ:</u> γενωμικό DNA (80%), μιτοχονδριακό γενωμικό DNA (10-20%) και εξωχρωμοσωματικό (1-5%). <u>Ριβονουκλεϊκό οξύ:</u> Περίπου 80% ως ριβονουκλεοπρωτεΐνη (rRNA), 5% mRNA στο κυτταρόπλασμα, στο αδρό ER και στα μιτοχόνδρια. Μερικά μικρά πυρηνικά RNA (snRNA) βρίσκονται στον πυρήνα. |

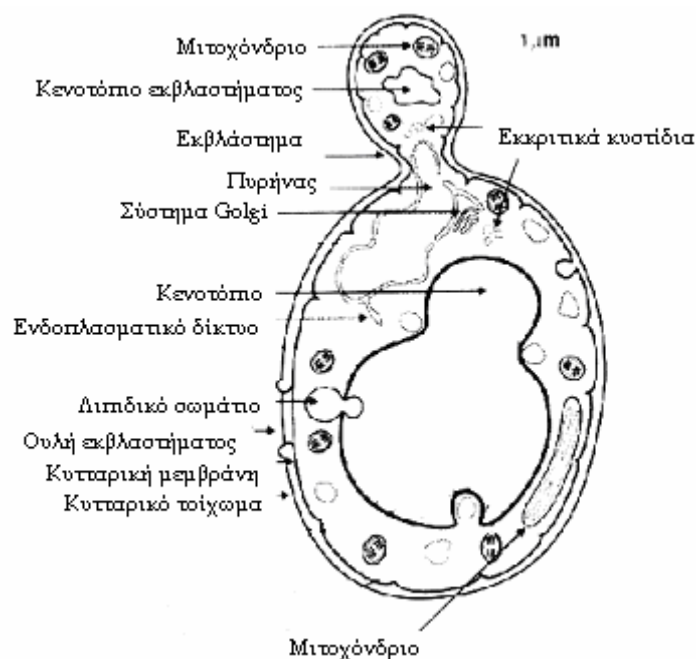
2.2. Η ΖΥΜΗ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Η πιο γνωστή και με τις περισσότερες εφαρμογές ζύμη, είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* (εικόνα 2.1). Είναι και η ζύμη που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη.



Εικόνα 2.1: Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* [<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/wheals2.htm>].

Πρόκειται για μονοκύτταρο και μονοπύρηνο οργανισμό, με κυτταρικό σχήμα γενικά ελλειψοειδές. Αναλόγως του στελέχους το σχήμα μπορεί να ποικίλει από σφαιρικό, ωοειδές ή κυλινδρικό. Το μήκος του κυττάρου ποικίλει από 5-10 μm και το πλάτος από 1-3 έως 1-7 μm . Τα κύτταρα της αποτελούνται από τον κυτταρικό φάκελο, το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα οργανίδια (σχήμα 2.1). Ο κυτταρικός φάκελος περιβάλλει και περικλείει τα κυτταρικά στοιχεία και συνίσταται, από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του κυττάρου, από την πλασματική μεμβράνη, τον περιπλασματικό χώρο, το κυτταρικό τοίχωμα, την κάψουλα και άλλες εξωκυτταρικές δομές. Ο κυτταρικός φάκελος καταλαμβάνει περίπου το 15% του συνολικού όγκου του κυττάρου και παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της όσμωσης και της διαπερατότητας του κυττάρου [Walker, 1998].



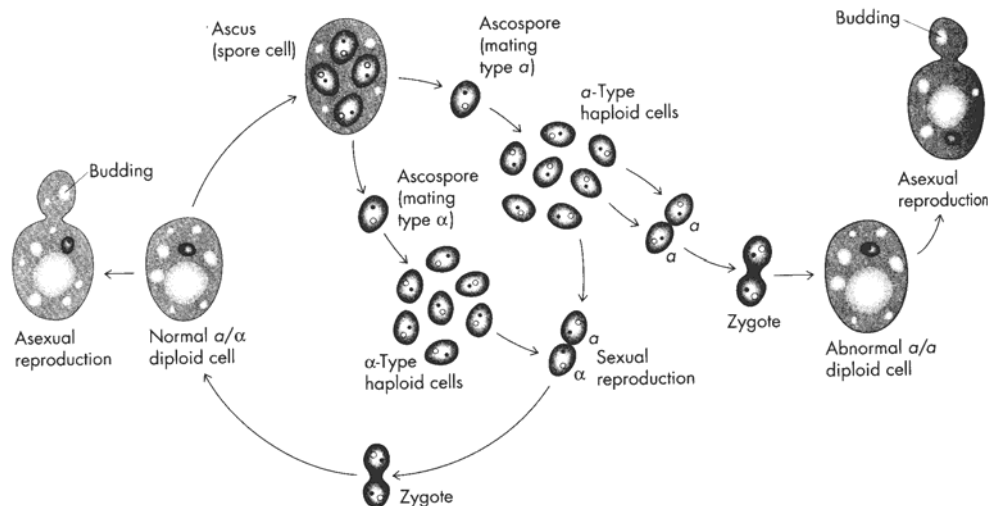
Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση τυπικού κυττάρου *Saccharomyces cerevisiae* με εκβλάστημα. [<http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/yeast/cell.gif>].

Η συστηματική της κατάταξη του *Saccharomyces cerevisiae* είναι:

| | |
|-------------|---------------------------------|
| ΒΑΣΙΛΕΙΟ: | Μύκητες |
| ΦΥΛΟ: | Μυκόφυτα |
| ΚΛΑΣΗ: | Ασκομύκητες |
| ΥΠΟΚΛΑΣΗ: | Πρωτοασκομύκητες |
| ΤΑΞΗ: | Ενδομύκητες |
| ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: | <i>Saccharomycetaceae</i> |
| ΓΕΝΟΣ: | <i>Saccharomyces</i> |
| ΕΙΔΟΣ: | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |

2.2.1. Ο βιολογικός κύκλος του *Saccharomyces cerevisiae*

Ο βιολογικός κύκλος του *S. cerevisiae* (σχήμα 2.2), αποτελείται από δύο φάσεις: την απλοειδή και τη διπλοειδή. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι ετερόθαλλος και χρειάζονται επομένως δύο συμβατά στελέχη **a** και **α** για εγγενή αναπαραγωγή.



Σχήμα 2.2: Ο βιολογικός κύκλος του *S. cerevisiae*. [Glazer *et al.*, 1995].

Δύο ασκοσπόρια αντίθετου συζευκτικού τύπου (ή εκβλαστήματά τους), έρχονται σε φυσική επαφή και μετά συγχωνεύονται (πλασμογαμία). Ακολουθεί καρυογαμία (συγχώνευση πυρήνων) και δημιουργία ζυγωτού κυττάρου. Το ζυγωτό παράγει μεγάλο αριθμό διπλοειδών εκβλαστημάτων. Υπό ορισμένες συνθήκες, που δεν είναι πλήρως γνωστές, μερικά διπλοειδή κύτταρα υφίστανται μείωση και μετατρέπονται σε ασκούς, καθένας από τους οποίους φέρει τέσσερα ασκοσπόρια. Τα ασκοσπόρια πολλαπλασιάζονται με εκβλαστήματα και παράγουν πολλά απλοειδή κύτταρα. Η έλξη των αντίθετων κυττάρων (α και a) οφείλεται σε οργανικές ουσίες ορμονικής φύσης που παράγονται από τα δύο είδη κυττάρων [Χριστιάς, 1999].

Η αγενής αναπαραγωγή γίνεται με εκβλάστηση. Κατά την εκβλάστηση, το κυτταρικό πρωτόπλασμα που περιβάλλεται από λεπτή μεμβράνη, σπάει σε ένα σημείο το κυτταρικό τοίχωμα και σχηματίζει το θυγατρικό κύτταρο. Το εκβλάστημα μεγαλώνει και τελικά αποχωρίζεται από το μητρικό κύτταρο με σύσφιξη της βάσης, αφήνοντας στο σημείο μια ουλή. Το θυγατρικό κύτταρο έχει τη δυνατότητα να εκβλαστήσει ευρισκόμενο σε επαφή με το μητρικό κύτταρο δημιουργώντας έτσι μια αλυσίδα κυττάρων (ψευδομυκήλιο). Κατά την εκβλάστηση πραγματοποιείται πυρηνική διαίρεση και ο ένας θυγατρικός πυρήνας περνάει στο εκβλάστημα, ενώ ο άλλος μένει στο μητρικό κύτταρο [Alexopoulos *et al.*, 1996].

2.3. ΘΡΕΨΗ ΚΑΙ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, οι ζύμες λαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται από το θρεπτικό τους μέσο:

- Νερό: Το θρεπτικό μέσο πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 30% νερό.
- Πηγή άνθρακα: Οι ζύμες είναι χημειότροφοι οργανισμοί και προσλαμβάνουν άνθρακα και ενέργεια από χημικές ενώσεις κυρίως σάκχαρα (πίνακας 2.2). Ένα μικρό μέρος (περίπου 5%) των απαιτήσεων των ζυμών σε άνθρακα καλύπτεται επίσης από το διοξείδιο του άνθρακα για βιοσύνθεση αμινοξέων, λιπαρών οξέων, πουρινών και πυριμιδινών.
- Πηγή αζώτου.
- Στοιχεία απαραίτητα για την σύνθεση των κυτταρικών συστατικών όπως οξυγόνο, υδρογόνο, φώσφορος, μαγνήσιο και θείο. Οι ζύμες δεν μπορούν να αναπτυχθούν κανονικά υπό πλήρη απουσία οξυγόνου. Το οξυγόνο λειτουργεί ως υπόστρωμα για τα ένζυμα της αναπνοής κατά την αερόβια ανάπτυξη αλλά είναι και απαραίτητο για ορισμένες υδροξυλιώσεις όπως αυτές που αφορούν τη βιοσύνθεση των στερολών και των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Τα ιόντα υδρογόνου είναι πολύ σημαντικά στη φυσιολογία των ζυμών αφού μεταβολές στο εξωκυτταρικό αλλά και στο ενδοκυτταρικό pH μπορούν να έχουν

δραματικές επιδράσεις στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό των κυττάρων. Γενικά οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν πολύ καλά σε pH μεταξύ 4.0 και 6.0.

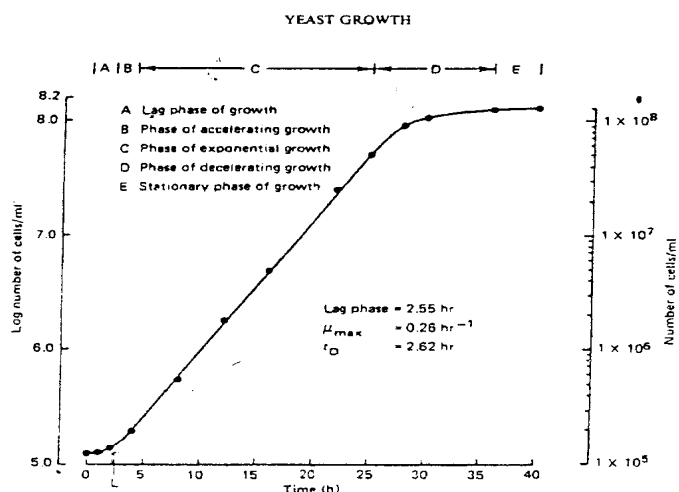
- Ιχνοστοιχεία
- Βιταμίνες και αυξητικούς παράγοντες.

Εκτιμάται ότι περίπου 85% των σακχάρων που αφομοιώνονται από τον *S. cerevisiae* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας, ενώ περίπου το 15% για βιοσυνθετικές αντιδράσεις. Η πρόσληψη και ο μεταβολισμός ποικίλων υποστρωμάτων σε ένα μίγμα συμβαίνει με μια σειρά που καθορίζεται από ρυθμιστικούς μηχανισμούς στο επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα η γλυκόζη είναι το υπόστρωμα που προτιμάται. Εάν είναι παρούσα, οι περμεάσες για τα άλλα υποστρώματα όπως η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη δεν επάγονται αν δεν εξαφανιστεί η γλυκόζη. Τα υποστρώματα αυτά φαίνεται ότι ζυμώνονται διαδοχικά. Οι δι- και τρισακχαρίτες αφού μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου υδρολύονται από μια α-γλυκοσιδάση. Οι ζυμώσεις πρέπει να διεξάγονται έτσι ώστε να επιτρέπουν την επαγωγή των ενζυμικών συστημάτων και την πλήρη χρησιμοποίηση των ποικίλων υποστρωμάτων [Glazer *et al.*, 1995].

Πίνακας 2.2: Διάφορες πηγές άνθρακα για την ανάπτυξη των ζυμών [Walker, 1998].

| Πηγή άνθρακα | Τυπικά παραδείγματα | Παρατηρήσεις |
|------------------------|---|--|
| Εξόζες | D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη, D-φρουκτόζη, D-μαννόζη | • Η γλυκόζη μεταβολίζεται από όλες τις ζύμες. • Αν μια ζύμη δεν ζυμώνει τη γλυκόζη δεν θα ζυμώνει κανένα άλλο σάκχαρο. • Αν μια ζύμη ζυμώνει τη γλυκόζη, επίσης θα μεταβολίζει τη φρουκτόζη και τη μαννόζη όχι όμως απαραίτητα τη γαλακτόζη. |
| Πεντόζες | L-αραβινόζη, D-ξυλόζη, D-ξυλουλόζη | • Ο σακχαρομύκητας μπορεί να χρησιμοποιεί τη ξυλουλόζη όχι όμως τη ξυλόζη. |
| Δισακχαρίτες | μαλτόζη, σακχαρόζη, λακτόζη, τρεχαλόζη | • Αν μια ζύμη χρησιμοποιεί τη μαλτόζη δε σημαίνει ότι το ίδιο συμβαίνει και για τη λακτόζη. • Μεγάλος αριθμός ζυμών μεταβολίζει δισακχαρίτες. |
| Τρισακχαρίτες | Ραφινόζη, Μαλτοτριόζη | • Η ραφινόζη χρησιμοποιείται μερικώς από τον σακχαρομύκητα. |
| Ολιγοσακχαρίτες | Μαλτοτετραόζη, Μαλτοδεξτρίνες | • Μεταβολίζονται από τις αμυλολυτικές ζύμες. |
| Πολυσακχαρίτες | άμυλο, ινουλίνη | • Ζύμες που ζυμώνουν πολυσακχαρίτες είναι σπάνιες. |
| Οργανικά οξέα | Οξικό, κιτρικό, γαλακτικό | • Λίγες ζύμες μπορούν να ζυμώσουν οργανικά οξέα. |
| Λιπαρά οξέα | ολεϊκό, παλμιτικό | • Μερικά είδη μπορούν να αφομοιώσουν τα λιπαρά οξέα. |
| Αρωμ. Ενώσεις | Φαινόλη, κατεχόλη | • Λίγες ζύμες μπορούν να τις χρησιμοποιήσουν. |

Η καμπύλη αύξησης της ζύμης η οποία λαμβάνεται από καλλιέργεια μιας παρτίδας και γενικά από μια αναπτυσσόμενη καλλιέργεια περιλαμβάνει τις εξής φάσεις (σχήμα 2.3) [Walker, 1998].



Σχήμα 2.3: Αυξητική καμπύλη καλλιέργειας ζυμομυκήτων A: λανθάνουσα φάση, B: επιταχυντική φάση, C: εκθετική φάση, D: επιβραδυντική φάση και E: στατική φάση [Walker, 1998].

1. **Λανθάνουσα φάση αύξησης:** Είναι μια περίοδος μηδενικής αύξησης και λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τον εμβολιασμό, όταν τα κύτταρα αντιμετωπίσουν αλλαγή στη θρέψη ή αλλαγές στις συνθήκες ανάπτυξης. Η φάση αυτή αντανακλά τον χρόνο που απαιτείται, ώστε να προσαρμοστούν τα κύτταρα στο νέο περιβάλλον. Συντίθενται ριβοσωμάτια και τα ένζυμα που απαιτούνται για την απόκτηση ενός μεγαλύτερου ρυθμού αύξησης. Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης εξαρτάται από τις συνθήκες, από την πυκνότητα του εμβολιάσματος και το ιστορικό της ανάπτυξης του μύκητα.
2. **Επιταχυντική φάση αύξησης.**
3. **Εκθετική φάση αύξησης:** Ο ρυθμός της αύξησης σε αυτή τη φάση είναι μέγιστος και τα περισσότερα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Στις ζυμώσεις μιας παρτίδας η διάρκεια της εκθετικής φάσης είναι σχετικά μικρή λόγω εξάντλησης των θρεπτικών στοιχείων, υπερβολικής συσσώματωσης κυττάρων ή συσσώρευσης ανασταλτικών μεταβολιτών.
4. **Επιβραδυντική φάση αύξησης:** Μετά την εκθετική φάση ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων επιβραδύνεται, πριν αυτά περάσουν στην επόμενη φάση.
5. **Στατική φάση αύξησης:** Στη φάση αυτή, η μάζα της ζύμης παραμένει σχετικά σταθερή και μάλιστα μετά από μεγάλη περίοδο στη στατική φάση τα κύτταρα μπορεί να νεκρωθούν και να αυτολυθούν. Αυτό μπορεί να επηρεάσει την αύξηση και επιβίωση των λοιπών ζωντανών κυττάρων.
6. **Φάση θανάτου:** Τα ενεργειακά αποθέματα των κυττάρων εξαντλούνται. Η φάση θανάτου είναι εκθετική με αντίθετη κλίση προς την λογαριθμική αύξηση.

2.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Σημαντικοί φυσιολογικοί παράγοντες οι οποίοι έχει βρεθεί να επηρεάζουν την απόδοση της ζύμης στην ζύμωση, είναι:

- **Το οξυγόνο:** Είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και των στερολών, που βοηθούν στην διατήρηση της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης παρουσία αιθανόλης.
- **Το αφομοιώσιμο άζωτο:** Μερικά βιομηχανικά υλικά ζύμωσης, δεν περιέχουν νιτρογενείς ενώσεις, ικανές να μεταβολιστούν από τα κύτταρα των ζυμών.
- **Τα ιόντα μαγνησίου:** Η προσθήκη Mg^{+} , αυξάνει την απόδοση σε αιθανόλη του *S. cerevisiae*.
- **Οι ενώσεις λιπιδίων:** Η προσθήκη λιπιδίων στο υλικό της ζύμωσης ενισχύει την αντοχή σε αιθανόλη του κυττάρου της ζύμης.

2.4.1. Στρεσογόνοι περιβαλλοντικοί παράγοντες

Στρεσογόνοι ονομάζονται οι παράγοντες εκείνοι που με την παρουσία τους επιδρούν αρνητικά στην λειτουργικότητα των κυττάρων των ζυμών και συνεπώς στις αποδόσεις των ζυμώσεων. Οι παράγοντες αυτοί διακρίνονται σε:

Φυσικούς παράγοντες: Σε αυτούς περιλαμβάνονται η υψηλή θερμοκρασία, η υψηλή οσμωτική πίεση, η έλλειψη νερού, οι υψηλές υδροστατικές και ατμοσφαιρικές πιέσεις και οι διάφορες ακτινοβολίες.

Χημικούς παράγοντες: Τέτοιοι είναι η αιθανόλη και άλλοι τοξικοί μεταβολίτες, τα περιορισμένα θρεπτικά συστατικά, το οξειδωτικό στρες, το pH και τα χημικά μεταλλαξιγόνα.

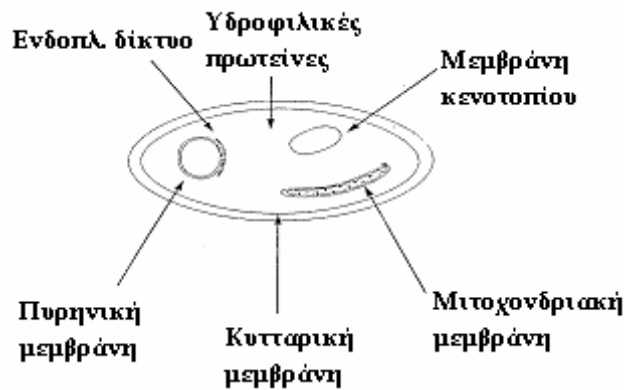
Βιολογικούς παράγοντες: Φαινόμενα όπως η γήρανση των κυττάρων, οι γενοτυπικές αλλαγές, ο ανταγωνισμός από άλλους οργανισμούς κ.α. επηρεάζουν επίσης αρνητικά των μεταβολισμό των κυττάρων.

Από του παραπάνω στρεσογόνους παράγοντες αυτοί που έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και ενδιαφέρουν την βιομηχανία παραγωγής αιθανόλης είναι η αιθανόλη, η θερμοκρασία και η οσμωτική πίεση.

2.4.1.1. 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 είναι 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. Μάλιστα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης, τόσο πιο έντονες γίνονται οι αρνητικές επιδράσεις της. Σε συγκέντρωση αιθανόλης 2% αρχίζει η καταστολή της πρόσληψης γλυκόζης και καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση καταστέλλεται και η μετακίνηση αμμωνιακών ιόντων και μερικών αμινοξέων. Η ζύμωση αναστέλλεται συνήθως πλήρως σε συγκεντρώσεις αιθανόλης περίπου 11% κ.ο. [Glazer *et al.*, 1995]. Οι ανασταλτικές επιδράσεις της αιθανόλης ενισχύονται από υψηλές θερμοκρασίες και από την έλλειψη θρεπτικών ουσιών (ιδιαίτερα ιόντων Mg^{+}) και άλλων μεταβολικών παραπροϊόντων όπως άλλες αλκοόλες, εστέρες, λιπαρά οξέα, αλδεΐδες, οργανικά οξέα, καρβονυλικές και φαινολικές ενώσεις [Jackson 1994, Walker 1998]. Οι ανώτερες αλκοόλες είναι πιο ανασταλτικές από την αιθανόλη όμως η τοξικότητά τους περιορίζεται από τις χαμηλές τους συγκεντρώσεις.

Μια από τις κύριες τοξικές επιδράσεις της αιθανόλης είναι η κατάρρευση της ημίρρευστης κατάστασης της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς η αιθανόλη εισχωρεί στην μεμβράνη και διασπά τους δεσμούς λιπιδίου-πρωτεΐνης και λιπιδίου-λιπιδίου. Το αποτέλεσμα είναι η κυτταρική μεμβράνη να γίνεται ολοένα και πιο διαπερατή. Η ιοντική διαβάθμιση που αποτελεί την πρωτονιακή κινητήρια δύναμη διαμέσου της μεμβράνης, καταρρέει σιγά σιγά και μικρά μόρια διαρρέουν από το κύτταρο στο περιβάλλον με κατάληξη τον θάνατο του κυττάρου [Jackson, 1994]. Έχει βρεθεί πως η ανθεκτικότητα των διαφόρων στελεχών στην αιθανόλη σχετίζεται με υψηλές συγκεντρώσεις ακόρεστων λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη [You *et al.*, 2003]. Η κυτταρική μεμβράνη είναι από τους πρώτους και σημαντικότερους στόχους της αιθανόλης στον *S. cerevisiae* όμως δεν είναι ο μοναδικός (σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: Πιθανοί στόχοι της αιθανόλης στον *S. cerevisiae* [Walker, 1998].

Οι πιο σημαντικές επιπτώσεις της αιθανόλης στη φυσιολογία του κυττάρου του *S. cerevisiae* παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 2.4.

Πίνακας 2.4: Σημαντικές επιπτώσεις της αιθανόλης στη φυσιολογία των ζυμών [Walker, 1998].

| 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 P₄₅₀ • 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 |

2.4.1.2. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις να την σταματήσουν. Υπάρχει μια περιοχή θερμοκρασιών που μπορούν να αναπτυχθούν οι ζύμες, έξω από τα όρια της οποίας μπορεί να προκληθεί κυτταρικός θάνατος. Όπως όλοι οι οργανισμοί, έτσι και οι ζύμες, εμφανίζουν χαρακτηριστικές ελάχιστες (T_{min}), βέλτιστες (T_{opt}) και μέγιστες

(T_{max}) θερμοκρασίες ανάπτυξης. Για τα περισσότερα στελέχη οι T_{opt} είναι οι 20-30 °C. Αξιοσημείωτες αποκλίσεις έχουν βρεθεί σε άγριες ζύμες.

Η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι σχετικά σταθερή μέσα στο είδος. Για την *S. cerevisiae* η T_{max} ποικίλει από 35-43 °C. Οι τιμές της T_{max} εξαρτώνται και από τις συνθήκες ανάπτυξης. Παραγοντες 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 T_{max} . Οι ζύμες μπορούν να ομαδοποιηθούν, σύμφωνα με τις θερμοκρασίες στις οποίες αναπτύσσονται, σε ψυχρόφιλες, μεσόφιλες και θερμόφιλες (πίνακας 2.5) [Walker, 1998].

Πίνακας 2.5: Όρια θερμοκρασιών για την ανάπτυξη των ζυμών [Walker, 1998].

| Θερμοκρασιακές κατηγορίες | Εύρος θερμοκρασιών | Παραδείγματα ζυμών |
|---------------------------|---|---|
| Ψυχρόφιλες | Ζύμες ικανές να αναπτύσσονται μεταξύ 5-18 °C. Τα υποχρεωτικά ψυχρόφιλα στελέχη έχουν ανώτατο όριο ανάπτυξης γύρω στους 20 °C ή χαμηλότερα | <i>Leucosporidium</i> spp., <i>Torulopsis</i> spp. (π.χ. <i>T. psychrophilia</i>) |
| Μεσόφιλες | Ζύμες με όρια ανάπτυξης 0-48 °C | Οι περισσότερες ζύμες |
| Θερμόφιλες | Ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης περίπου 20 °C | <i>Candida slooffii</i> , <i>S. telluris</i> , <i>Torulopsis bovina</i> |

Σε χαμηλές θερμοκρασίες οι ζύμες τείνουν να είναι λιγότερο ευαίσθητες στις τοξικές επιδράσεις των υψηλών επιπέδων αιθανόλης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό των υπολειμμάτων των ακόρεστων λιπαρών οξέων στην πλασματική μεμβράνη. Έτσι εξηγείται και ο υψηλότερος αριθμός ζωντανών κυττάρων σε ζυμώσεις ψυχρότερων θερμοκρασιών.

Ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων της ζύμης επηρεάζεται πολύ από τη θερμοκρασία της ζύμωσης και ιδιαίτερα κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης. Για παράδειγμα η κυτταρική διαίρεση μπορεί να συμβαίνει κάθε 12 ώρες στους 10 °C, κάθε 5 ώρες στους 20 °C και κάθε 3 στους 30 °C. Ο ρυθμός της κυτταρικής διαίρεσης επηρεάζεται επίσης από το pH και από τη συγκέντρωση του σακχάρου στο θρεπτικό μέσο [Jackson, 1994].

Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 20 °C οι ζύμες εμφανίζουν ραγδαία πτώση στη βιωσιμότητα στο τέλος της ζύμωσης, μάλιστα σε θερμοκρασίες 40-50 °C τα κύτταρα αυτολύονται. Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει το μεταβολικό ρυθμό των ζυμών μέχρι μια βέλτιστη τιμή στους 35 °C, μετά μειώνεται βαθμιαία μεταξύ 35-43 °C. Επομένως, η θερμοκρασία λειτουργίας ενός ζυμωτήρα θα πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία κάτω των 35 °C [Glazer *et al.*, 1995]. Σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες (<20 °C) η κυτταρική αύξηση επιβραδύνεται και η βιωσιμότητα ενισχύεται. Οι χαμηλές θερμοκρασίες παρατείνουν τη λανθάνουσα φάση, μπορούν να μειώσουν το ρυθμό της ζύμωσης και να προκαλέσουν πρόωρο τερματισμό της. Κατά τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης πρέπει να αποφεύγονται οι απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας που μπορεί να προκαλέσουν «σοκ» στις ζύμες και έτσι να αλλάξει η συμπεριφορά τους και σε ορισμένες περιπτώσεις να προκληθεί θρόμβωση λόγω ίσως της έκκρισης μιας κολλώδους ουσίας από τα ίδια κύτταρα.

Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης η περισσότερη χημική ενέργεια που είναι αποθηκευμένη στα σάκχαρα, απελευθερώνεται ως θερμότητα. Η απελευθέρωση αυτή ισοδυναμεί περίπου με 23.5 Kcal/mol γλυκόζης, ποσό το οποίο μπορεί να αυξήσει τη θερμοκρασία σακχαρούχου χυμού 23 °Brix, περίπου 30 °C κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι αυξήσεις αυτές δεν παρατηρούνται είτε επειδή η θερμότητα ελευθερώνεται σταδιακά για μέρες ή για βδομάδες, είτε γιατί χάνεται με έκλυση CO₂ και υδρατμών. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να φτάσει σε οριακά επίπεδα για την επιβίωση της ζύμης εάν δε ληφθούν κατάλληλα μέτρα σε μεγάλους αντιδραστήρες.

Σημαντικός παράγοντας στην αύξηση της θερμοκρασίας είναι η αρχική θερμοκρασία του σακχαρούχου διαλύματος, καθώς με αυτή καθορίζεται και ο μετέπειτα ρυθμός αύξησής της. Όσο υψηλότερη είναι η αρχική θερμοκρασία, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αρχικός ρυθμός της ζύμωσης και η απελευθέρωση θερμότητας με αποτέλεσμα η θερμοκρασία θανάτου να επιτυγχάνεται συντομότερα.

Επίσης σημαντικό για τον έλεγχο της θερμοκρασίας είναι το μέγεθος και το σχήμα του ζυμωτήρα και το αν είναι στεγανός ή όχι ο αντιδραστήρας. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται με πολλές τεχνικές. Όταν υφίσταται μεγάλη μεταφορά θερμότητας μέσω του τοιχώματος, η ψύξη της επιφάνειας του αντιδραστήρα με νερό ή με εισαγωγή ενός ψυκτικού μέσω ενός μονωτικού καλύμματος, μπορεί να είναι αποτελεσματικές. Στην περίπτωση που η θερμική αγωγιμότητα δεν είναι εφικτή, το ζυμούμενο υλικό μπορεί να αντληθεί και να ψυχθεί μέσω εξωτερικών εναλλακτών θερμότητας. Εναλλακτικά ψυχόμενοι εσπειραμένοι σωλήνες, μπορούν να εισαχθούν κατευθείαν στο ζυμούμενο υλικό. Σε ειδικούς ζυμωτήρες, το CO₂ παγιδεύεται και η αυξανόμενη πίεση χρησιμοποιείται για ελάττωση του ρυθμού της ζύμωσης και τη συσσώρευση της θερμότητας [Jackson, 1994].

2.4.1.3. Επίδραση των υπεροσμωτικών συνθηκών

Υπεροσμωτικές συνθήκες μπορεί να δημιουργηθούν μετά από απώλεια ενδοκυτταρικού υγρού π.χ. κατά την παρασκευή ξηρής ζύμης ή ως αποτέλεσμα έκθεσης σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης [Walker, 1998]. Έχει βρεθεί ότι η ικανότητα του *S. cerevisiae* να ζυμώνει σε μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης είναι ανάλογη της ενεργότητας της ιμπερτάσης, η οποία υδρολύει την σακχαρόζη. Η υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη αυξάνει την οσμωτική πίεση και σύντομα η ζύμωση αναστέλλεται.

Όταν ο *S. cerevisiae* εκτίθεται σε υψηλές οσμωτικές πιέσεις, επάγεται μια πολύπλοκη αντίδραση που περιλαμβάνει γρήγορη ελάττωση του ενδοκυτταρικού όγκου λόγω εκροής νερού [Marechal *et al.* 1994, Meikle *et al.* 1988]. Η γλυκερόλη είναι η πιο αποτελεσματική οσμωρυθμιστική διαλυτή ουσία στις ζύμες. Γι' αυτό και κάτω από υπεροσμωτικές συνθήκες, επάγεται η έκφραση ορισμένων γονιδίων, που συμμετέχουν στην οδό παραγωγής γλυκερόλης (Brewster *et al.*, 1993, Schuller *et al.*, 1994, Hirayama *et al.*, 1995).

2.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΖΥΜΩΝ

Οι ζύμες είναι πολύτιμοι μικροοργανισμοί για τον άνθρωπο, αφού χρησιμοποιούνται σε μια ευρεία ποικιλία εφαρμογών στη βιοτεχνολογία [Walker, 1998]:

- ⇒ **Βιομηχανίες ζυμώσεων:** Είναι οι μικροοργανισμοί που κυρίως χρησιμοποιούνται στην οινοποιία, στην ζυθοποιία και στην παραγωγή βιοαιθανόλης.
- ⇒ **Χημικές βιομηχανίες τροφίμων:** Χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μαγιάς, ενζύμων και χρωστικών που είναι απαραίτητες στις βιομηχανίες τροφίμων.
- ⇒ **Φαρμακευτικές βιομηχανίες:** Χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εμβολίων, αντιβιοτικών, ορμονών και άλλων φαρμακευτικών προϊόντων.

- ⇒ **Βασική βιολογική έρευνα:** Χρησιμοποιούνται ως πειραματόζωα σε όλους τους τομείς της βιολογίας. Μάλιστα, ο *Saccharomyces cerevisiae* ήταν ο πρώτος ευκαρυωτικός οργανισμός του οποίου μελετήθηκε η αλληλουχία του γονιδιώματος του.
- ⇒ **Περιβαλλοντικές τεχνολογίες:** Χρησιμοποιούνται για βιοαποικοδόμηση άχρηστων υλικών, για την αξιοποίηση των απορριμμάτων (παραγωγή αιθανόλης), για την βιοαπορρόφηση μετάλλων κ.α.

3. ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

3.1. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΖΥΜΩΣΕΩΝ

Ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι αλκοολικές ζυμώσεις, κατατάχθουν σε ανοικτά και κλειστά συστήματα ζυμώσεων. Ένα σύστημα θεωρείται κλειστό όταν κανένα στοιχείο του δεν μπορεί να εισέλθει ή να εγκαταλείψει το σύστημα. Αντιθέτως, ένα σύστημα θεωρείται ανοικτό όταν όλα τα στοιχεία του συστήματος, όπως οι οργανισμοί, θρεπτικά μέσα κλπ. μπορούν συνεχώς να εισέρχονται και να εγκαταλείπουν το ζυμωτήρα. Γενικά οι μέθοδοι ζύμωσης που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία είναι:

Ζύμωση μιας παρτίδας (batch fermentation).

Πάνω από το 75% της παραγόμενης αιθανόλης παράγεται με την συγκεκριμένη μέθοδο. Η διαδικασία έχει ως εξής: Προστίθεται στον βιοαντιδραστήρα το θρεπτικό υπόστρωμα (10-15% w/v σάκχαρο με πρόσθετα θρεπτικά) και εμβολιάζεται με τον κατάλληλο μικροοργανισμό (ζύμη 5-10%). Ύστερα από ορισμένο χρόνο και αφού έχουν επιτευχθεί οι μέγιστες δυνατές αποδόσεις σε αιθανόλη, το προκύπτον μίγμα της αντίδρασης απομακρύνεται από τον αντιδραστήρα. Ο ζυμωτήρας στην συνέχεια καθαρίζεται και αποστειρώνεται και προετοιμάζεται για μια νέα παρτίδα ζύμωσης. Το βασικότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χαμηλή παραγωγικότητα που κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.5 g/l/h [Rose *et al.*, 1976].

Ημισυνεχής ζύμωση (semi continuous fermentation)

Στις ημισυνεχείς ζυμώσεις, οι διαδικασία είναι σχεδόν πανομοιότυπη με αυτήν της μιας παρτίδας. Η διαφορά είναι ότι μετά το τέλος της ζύμωσης δεν απομακρύνεται όλο το μίγμα της αντίδρασης. Ένα μικρό μέρος παραμένει και χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό της επόμενης παρτίδας. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, έτσι και σε αυτή το μειονέκτημα είναι η χαμηλή παραγωγικότητα [Esser *et al.*, 1981].

Συνεχής ζύμωση (continuous fermentation)

Οι συνεχείς ζυμώσεις χαρακτηρίζονται από συνεχή προσθήκη θρεπτικού υλικού και ταυτόχρονη συνεχή απομάκρυνση του περιεχομένου του βιοαντιδραστήρα (περιλαμβανομένων και των κυττάρων). Η αρχική αύξηση των κυττάρων συμβαίνει όπως και στα συστήματα μιας παρτίδας. Στην συγκεκριμένη περίπτωση όμως όταν τα κύτταρα φτάσουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης, διατηρούνται μόνιμα σε αυτήν, με κατάλληλη ρύθμιση των εισροών και των εκροών. Το όλο σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας. Αφού η ζύμηση διατηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην εκθετική φάση ανάπτυξης, αυξάνονται οι αποδόσεις και συνεπώς και η παραγωγικότητα του συστήματος.

Ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι αυξάνονται τόσο ο κίνδυνος για μόλυνση του μίγματος, όσο και οι πιθανότητες για μεταλλάξεις των ζυμών. Επίσης οι ζύμες απαιτούν και μια στοιχειώδη παροχή οξυγόνου, ώστε να μπορέσουν να συνθέσουν διάφορα μεμβρανικά συστατικά, όπως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Στις ζυμώσεις μιας παρτίδας, ένας απλός αερισμός πριν την έναρξη της διαδικασίας είναι αρκετός στις συνεχείς ζυμώσεις όμως απαιτείται συνεχής παροχή οξυγόνου.

Έχουν προταθεί διάφορες εναλλακτικές συνεχείς διαδικασίες όπως:

↳ Συνεχής αναδεδόμενη ζύμωση (CSF)

Η ανάδευση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης επιτρέπει την ομοιόμορφη κατανομή των νεοεισερχόμενων θρεπτικών υλικών και κυττάρων. Η απόδοση της συνεχούς ζύμωσης επηρεάζεται από την αναστολή των ζυμών από την αιθανόλη. Για την επίτευξη υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης χωρίς αναστολή των ζυμών, προτάθηκε η χρήση ζυμωτήρων συνεχούς ανάδευσης σε σειρά. Οι αποδόσεις που επιτεύχθηκαν σε σύστημα δύο ζυμωτήρων σε σειρά είναι 2-3 φορές υψηλότερες σε σχέση με έναν και μόνο ζυμωτήρα συνεχούς ανάδευσης [Ghose *et al.*, 1979].

↳ Συνεχής αναδεδόμενη ζύμωση με ανακύκλωση (CSFR)

Στην συγκεκριμένη εφαρμογή τα κύτταρα που απομακρύνονται μαζί με το περιεχόμενο από τον βιοαντιδραστήρα, διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και επανεισέρχονται σ' αυτόν. Μπορούν έτσι να επιτευχθούν μεγάλες συγκεντρώσεις κυττάρων (40-80 g/l) και να αύξηση της παραγωγικότητας σε αιθανόλη (30-40 g/l/h) [Cysewski *et al.*, 1978]. Το μειονέκτημα είναι πως η χρήση της φυγόκεντρου αυξάνει το κόστος της επένδυσης, της συντήρησης, των ενεργειακών απαιτήσεων και των πιθανοτήτων μόλυνσης.

↳ Ζύμωση υπό κενό (VF)

Με την δημιουργία κενού (32-35 mm Hg) στον βιοαντιδραστήρα, ένα μίγμα αιθανόλης-νερού αποστάζεται στους 30 °C που πραγματοποιείται η ζύμωση. Τα κύτταρα δεν επηρεάζονται από το κενό και η απομάκρυνση της αιθανόλης από το ζυμωτήρα, εξαλείφει την πιθανότητα αναστολής της ζυμωτικής λειτουργίας της ζύμης [Cysewski *et al.*, 1978]. Πλεονέκτημα είναι επίσης και η παραγωγή ενός πυκνού προϊόντος με αποτέλεσμα τη μείωση των απαιτήσεων της απόσταξης προκειμένου να ληφθεί 95% αιθανόλη.

Σημαντικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου, είναι η συσσώρευση τοξικών, μη πτητικών συστατικών στο ζυμωτήρα. Ένα μεγάλο μέρος του περιεχομένου του ζυμωτήρα πρέπει να απομακρύνεται συνεχώς για να διατηρείται η συγκέντρωση των τοξικών σε επίπεδο που δε θα αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων. Η ανακύκλωση και η υπό κενό λειτουργία αυξάνουν την πιθανότητα μόλυνσης και διακοπής της διαδικασίας και το κόστος επένδυσης και λειτουργίας είναι υψηλό [Bullock *et al.*, 1981].

3.2. ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ (ΖΥΜΩΤΗΡΕΣ)

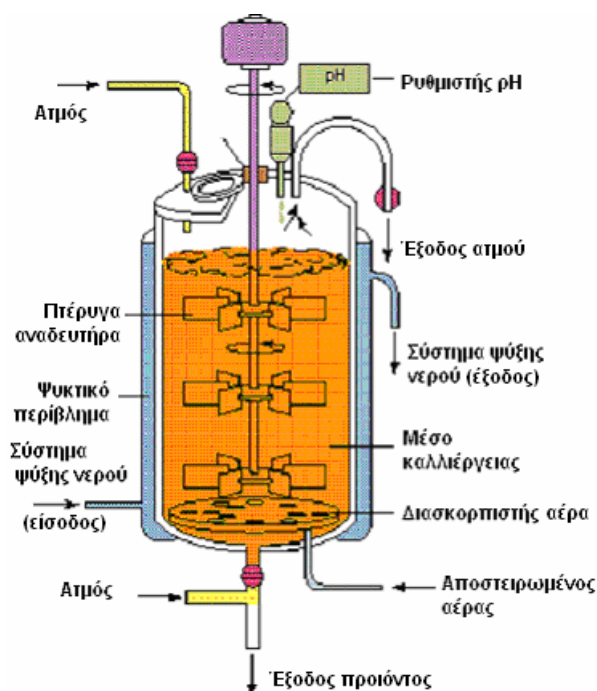
Βιοαντιδραστήρες είναι οι συσκευές μέσα στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι διάφοροι βιοχημικοί μετασχηματισμοί, με τη βοήθεια βιοκαταλυτών (ενζύμων ή ζωντανών κυττάρων). Αποτελούν ένα ελεγχόμενο περιβάλλον και ονομάζονται συχνά ζυμωτήρες, ιδιαίτερα στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί.

Το μέγεθος τους ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος της αντίδρασης. Οποιοδήποτε όμως κι αν είναι το μέγεθος του βιοαντιδραστήρα, οι συνθήκες μέσα σ' αυτόν πρέπει να είναι τέτοιες ώστε

να εξασφαλίζεται η δραστηριότητα των βιοκαταλυτών κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες λειτουργίας. Η ταχύτητα της αντίδρασης, η αύξηση των κυττάρων και η σταθερότητα της διεργασίας εξαρτώνται από τις συνθήκες μέσα στον βιοαντιδραστήρα. Η ταξινόμηση των βιοαντιδραστήρων σε κατηγορίες μπορεί να γίνει [Λιακοπούλου-Κυριακίδου, 2004] με βάση:

- 1) Τον τρόπο λειτουργίας τους (συνεχούς, ασυνεχούς και ημισυνεχούς λειτουργίας)
- 2) Τον αριθμό φάσεων (ομογενής, ετερογενής)
- 3) Τα πρότυπα ροής και ανάμιξης (πλήρους και εμβολικής ανάμιξης)
- 4) Το είδος του βιοκαταλύτη (ένζυμα ή μικροοργανισμοί)
- 5) Τον τρόπο εισαγωγής και διατήρησης του βιοκαταλύτη στον αντιδραστήρα (ελεύθερος ή ακινητοποιημένος)

Η μορφή των βιοαντιδραστήρων άλλαξε πολύ τις τελευταίες δεκαετίες. Αρχικά τα συστήματα ζυμώνσεων ήταν ανοικτές δεξαμενές αναδεδόμενες με το χέρι. Από αυτές αναπτύχθηκε το βασικό σύστημα που επικρατεί τώρα στην βιομηχανία (σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού βιομηχανικού ζυμοτήρα [Crueger *et al.*, 1989].

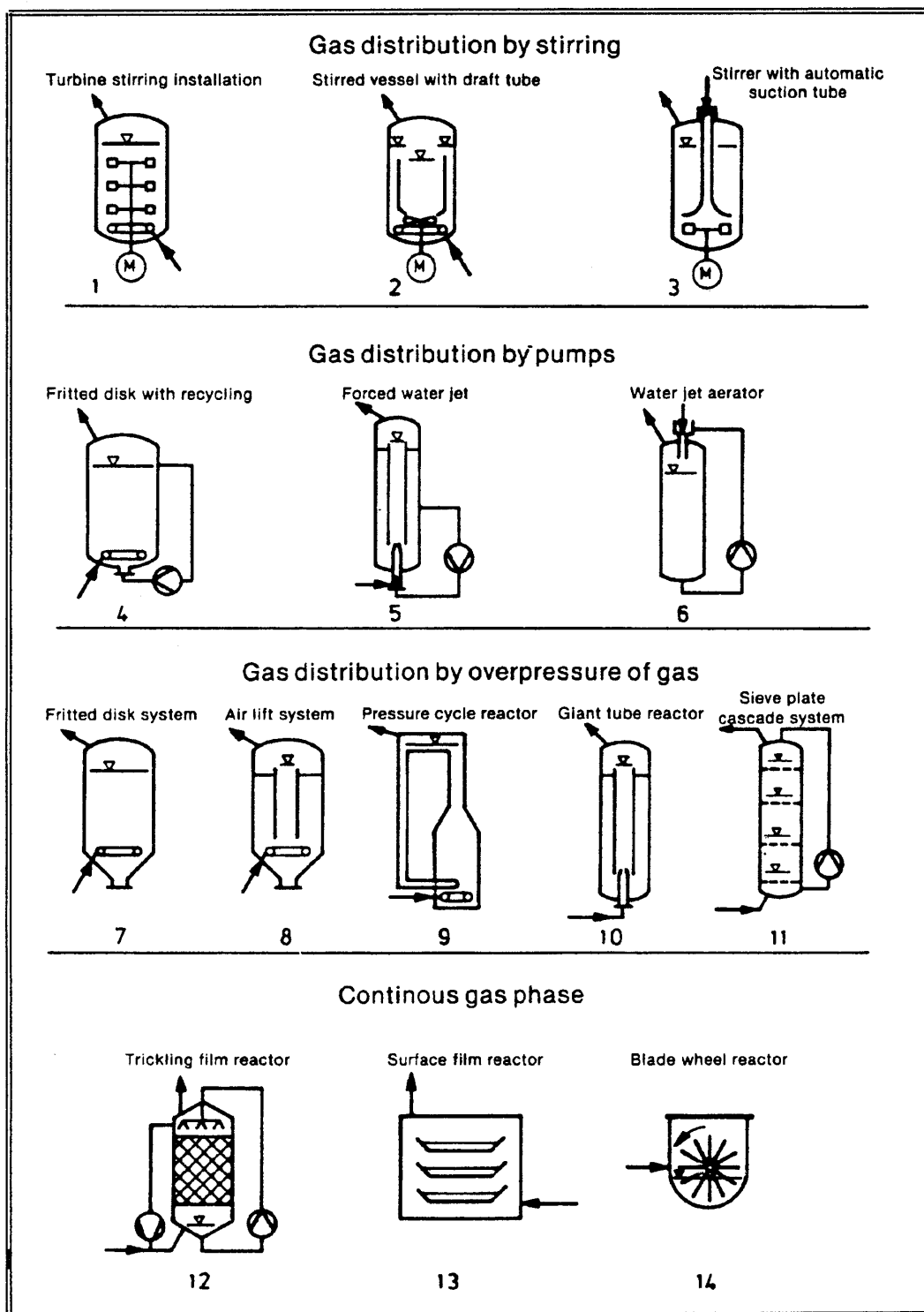
Οι κυριότεροι βιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή αιθανόλης είναι:

↳ Αναδεδόμενοι και αεριζόμενοι αντιδραστήρες πλήρους ανάδευσης (Continuously Stirred Tank Reactors, CSTR).

Είναι οι αρχαιότεροι και τυπικότεροι αντιδραστήρες και μπορούν να διακριθούν σε πέντε κατηγορίες:

- i. Στην πρώτη, οι ζυμοτήρες έχουν μηχανικό μηχανισμό αερισμού και ανάδευσης με σχετικά μεγάλη κατανάλωση ενέργειας. Τέτοιοι αντιδραστήρες εξασφαλίζουν καλή μεταφορά μάζας αερίου / υγρού, έχουν αξιόπιστη μεταφορά θερμότητας και εξασφαλίζουν επίσης καλή ανάμιξη του περιεχομένου τους, έτσι ώστε να υπάρχει ομοιόμορφη σύσταση σε ολόκληρο τον όγκο του δοχείου (σχήμα 3.2, 1-3).
- ii. Στην δεύτερη, ο καταμερισμός του αέρα στους ζυμοτήρες, επιτυγχάνεται με χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και γίνεται με προώθηση ελεγχόμενων ρευμάτων υγρού / αέρος με

την βοήθεια αντλιών, δημιουργώντας έτσι έναν κυκλοφοριακό βρόγχο μέσα ή έξω από τον ζυμωτήρα (σχήμα 3.2, 4-6).



Σχήμα 3.2: Διάφοροι τύποι βιοαντιδραστήρων [Crueger *et al.*, 1989].

- iii. Στην τρίτη, οι βιοαντιδραστήρες δεν διαθέτουν κινούμενα μέρη, αλλά ο αερισμός και η ανάδευση γίνονται με την χρήση πεπαισμένου αέρα (σχήμα 3.2, 7-11).
- iv. Στην τέταρτη, ο αέρας στους βιοαντιδραστήρες, κυκλοφορεί πάνω από ένα λεπτό στρώμα από μικροοργανισμούς ακινητοποιημένους κατά διάφορους τρόπους, σε αδρανή υλικά (σχήμα 3.2, 12-14).

- v. Στην τελευταία, στους αντιδραστήρες προστίθεται ένας διαχωριστής κυττάρων και επανακυκλώνεται ένα ρεύμα με υψηλή συγκέντρωση κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την αύξηση της απόδοσης προϊόντος ανά μονάδα όγκου αντιδραστήρα, στην μονάδα του χρόνου.

↳ Σωληνωτοί βιοαντιδραστήρες εμβολικής ροής (Plug-Flow Tubular Reactors, PFTR)

Τα θρεπτικά συστατικά και οι μικροοργανισμοί εισέρχονται από το ένα άκρο του κυλίνδρου και τα κύτταρα αυξάνονται κατά μήκος του σωλήνα. Επειδή όμως η ανάμειξη επιτυγχάνεται κατά μήκος της εμβολικής ροής αντιδραστήρα, χωρίς επιπλέον συσκευή ανάδευσης, δεν γίνεται σωστά και οι ιδιότητες του ρεύματος υγρού διαφέρουν και κατά μήκος του σωλήνα και ακτινωτά.

↳ Βιοαντιδραστήρες ρευστοστερεάς κλίνης (Fluidized Bed Reactors)

Οι πιο πολλοί βιοαντιδραστήρες ρευστοστερεάς κλίνης που χρησιμοποιούν κύτταρα σαν βιοκαταλύτες, είναι τριφασικά συστήματα (στερεά-υγρή-αέρια φάση). Λειτουργούν με ανοδική ροή αερίου ή υγρού που διοχετεύονται στον αντιδραστήρα. Η παραγωγή προϊόντος κατ' όγκο είναι μεγαλύτερη αυτής των αντιδραστήρων συνεχούς ροής [Λιακοπούλου-Κυριακίδου, 2004].

↳ Βιοαντιδραστήρες πακεταρισμένης (σταθερής) κλίνης (Packed Bed Reactor)

Στους βιοαντιδραστήρες σταθερής κλίνης χρησιμοποιούνται ακινητοποιημένοι βιοκαταλύτες. Ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης πακετάρεται στον αντιδραστήρα (στήλη) και η τροφοδοσία των θρεπτικών γίνεται είτε από το επάνω, είτε από το κάτω άκρο της στήλης [Λιακοπούλου-Κυριακίδου, 2004].

4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στόχος της βιομηχανίας παραγωγής βιοαιθανόλης είναι η μείωση του κόστους παραγωγής ώστε η βιοαιθανόλη να γίνει ανταγωνιστική ως καύσιμο έναντι των συμβατικών. Μία μέθοδος η οποία έχει μελετηθεί εκτεταμένα και αποδεδειγμένα βελτιώνει την παραγωγική διαδικασία της βιοαιθανόλης, είναι η χρήση ακινητοποιημένων κυτταρικών συστημάτων. Η ακινητοποίηση των βιοκαταλυτών σαν βιοτεχνολογική πρακτική άρχισε να εφαρμόζεται στη δεκαετία του '70 και έκτοτε αναπτύχθηκε ραγδαία και αποτελεί σήμερα μια από τις κυριότερες μεθοδολογίες της βιοτεχνολογίας.

Η ακινητοποίηση είναι ένας γενικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τον περιορισμό ενός βιοκαταλύτη μέσα ή πάνω σε ένα υλικό στήριξης. Τα συστήματα ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών αποτελούνται από δύο στοιχεία: το φορέα ακινητοποίησης (ανόργανο, οργανικό, φυσικό ή συνθετικό μέσο) και τους βιοκαταλύτες. Ο όρος βιοκαταλύτης, όπως ήδη ορίστηκε αναφέρεται σε βιολογικές δομές που εμφανίζουν ενζυμική δραστηριότητα. Περιλαμβάνει από ένα απλό ένζυμο, έως ένα ζωντανό κύτταρο (μικροβιακό, φυτικό ή ζωικό) με το σύνολο των ενζύμων του [Fogarty *et al.*, 1990]. Ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης εκμεταλλεύεται τα φυσικά χαρακτηριστικά του υλικού στήριξης, ενώ διατηρεί τη βασική βιοχημική δραστηριότητα του ελεύθερου καταλύτη και βελτιώνει την αποδοτικότητά του [Rosevear *et al.*, 1987]. Η ακινητοποίηση συχνά μιμείται αυτό που συμβαίνει στη φύση όπου κύτταρα αναπτύσσονται σε επιφάνειες ή μέσα σε φυσικές δομές. Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται σε διάφορα είδη επιφανειών.

Η ανάκτηση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών επιτυγχάνεται:

- α. με φίλτρα, όπως π.χ. στους αντιδραστήρες στερεάς κλίνης,
- β. με φυγοκέντρηση, όπως στους βιοαντιδραστήρες μιας παρτίδας,
- γ. με κατακρήμνιση, όπως στους υγροαναδευόμενους βιοαντιδραστήρες ρευστοστερεάς κλίνης (Fluidized bed reactors)

4.1. ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

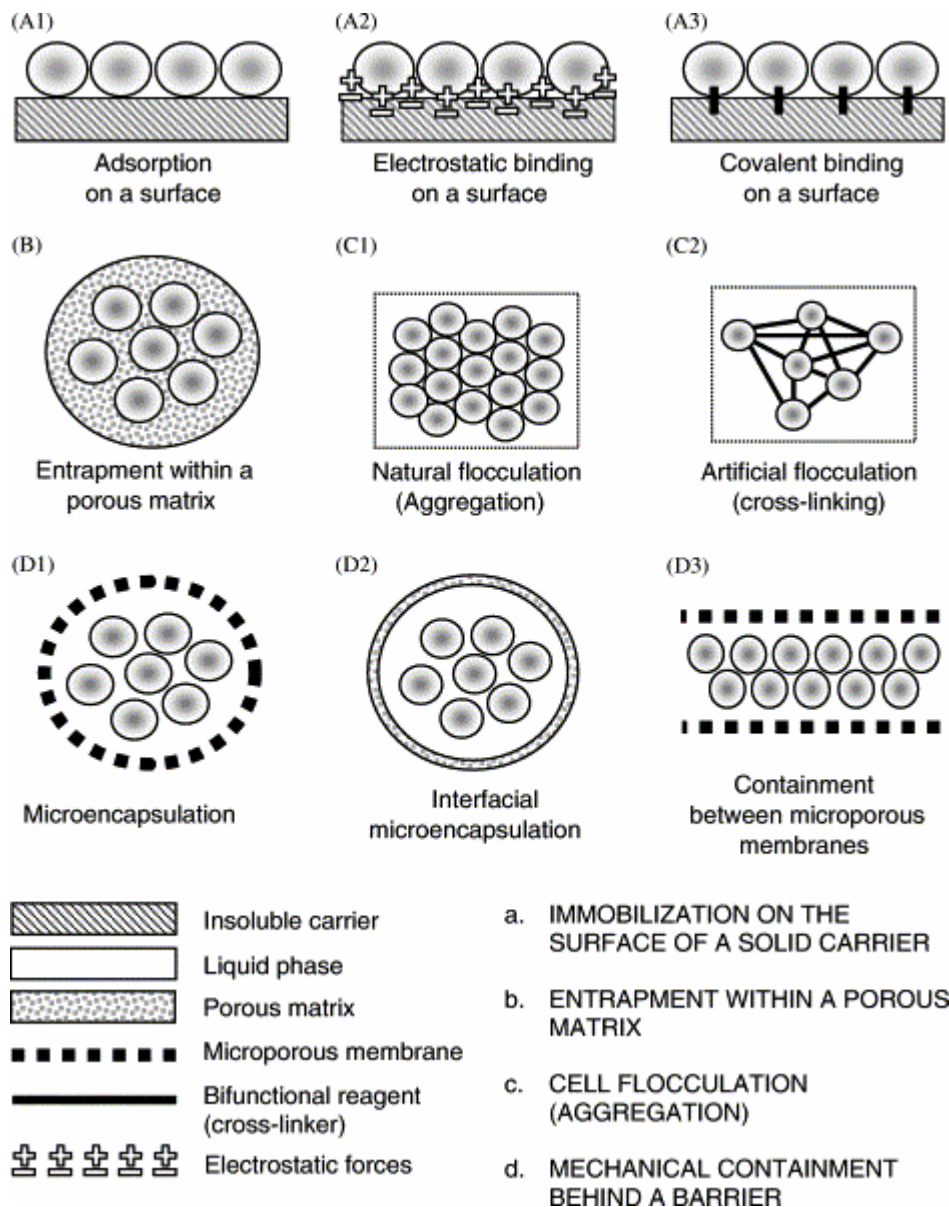
Πλήθος βιοτεχνολογικών διαδικασιών επωφελούνται από την τεχνολογία των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών (πίνακας 4.1) και συνεπώς κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές και φορείς ακινητοποίησης.

Πίνακας 4.1: Παραδείγματα προϊόντων που παρήχθησαν από ακινητοποιημένα κύτταρα ζυμών.

| Ζύμη | Φορέας Ακινητοποίησης | Προϊόν |
|----------------------------------|---|---------------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Ζελατίνη | Κρασί |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Αλγινικό οξύ | Αφρώδες κρασί |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Αλγινικό οξύ, Πορώδες κεραμικό, Μεμβρανικό φίλτρο, Κυτταρίνη | Αιθανόλη |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Αγαρόζη | L-μηλικό οξύ |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Αλγινικό οξύ | β-γλυκανάση |
| <i>Saccharomyces bayanus</i> | Καραγεννάνη | Βιομάζα, Αιθανόλη |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | Αλγινικό οξύ | Κρασί χωρίς οξέα |
| <i>Kluyveromyces bulgaricus</i> | Αλγινικό οξύ | Υδρόλυση λακτόζης ορού γάλακτος |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | Αλγινικό οξύ | Υδρόλυση ινουλίνης |
| <i>Trichosporon pullulans</i> | Αλγινικό οξύ | Υδρόλυση κελλοβιόζης |
| <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | Αλγινικό οξύ | Ζύμωση σόγιας sauce |

Οι τεχνικές ακινητοποίησης που έχουν χρησιμοποιηθεί έως σήμερα, μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις γενικές κατηγορίες (σχήμα 4.1) [Pilkington, *et al.*, 1998]:

1. Προσκόλληση ή προσρόφηση σε επιφάνεια στερεού φορέα.
2. Εγκλωβισμός σε πολυμερή δικτυωτά.
3. Συσσωμάτωση με κροκύδωση (φυσική) ή με τη βοήθεια διαφόρων παραγόντων (τεχνητή).
4. Μηχανική συγκράτηση βιοκαταλυτών σε έναν φορέα.



Σχήμα 4.1: Βασικές μέθοδοι ακινητοποίησης κυττάρων [Kourkoutas *et al.*, 2004].

4.1.1 Ακινητοποίηση σε επιφάνεια στερεού φορέα

Η ακινητοποίηση κυττάρων σε στερεό φορέα γίνεται με φυσική προσκόλληση μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων ή ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του φορέα. Το πάχος του κυτταρικού στρώματος ποικίλει από μια στρώση κυττάρων μέχρι 1mm ή περισσότερο. Συστήματα που χρησιμοποιούν ακινητοποιημένα κύτταρα σε μια επιφάνεια είναι αρκετά δημοφιλή λόγω της σχετικής ευκολίας της μεθόδου. Η δύναμη με την οποία τα κύτταρα συνδέονται με τον φορέα ποικίλει και δεν μπορεί να προσδιορισθεί εύκολα. Επειδή δεν υπάρχουν εμπόδια μεταξύ των κυττάρων και του διαλύματος, είναι πιθανό συνεχώς κύτταρα να αποσπώνται και να ακινητοποιούνται, με αποτέλεσμα την δημιουργία μιας κατάστασης ισορροπίας μεταξύ των προσροφημένων και των ελεύθερων κυττάρων. Παραδείγματα στερεών φορέων που χρησιμοποιούνται για αυτό τον τύπο ακινητοποίησης είναι κυτταρινικά υλικά (π.χ ξύλο, πριονίδι), ανόργανα υλικά (π.χ. πορώδης πορσελάνη, πορώδες γυαλί, κίσηρη, περλίτης, γ-αλουμίνα), κ.λ.π. Η ικανότητα προσρόφησης των στερεών φορέων, όπως το γυαλί ή η

κυτταρίνη μπορεί να ενισχυθεί, ύστερα από την επεξεργασία τους με χιτοζάνη ή άλλα χημικά για [Norton *et al.*, 1994, Navarro *et al.*, 1977].

4.1.2. Εγκλωβισμός σε πολυμερή δικτυωτά

Σε αυτό τον τύπο της ακινητοποίησης τα κύτταρα, είτε αφήνονται να διεισδύσουν στο πορώδες υλικό έως ότου η κινητικότητά τους εμποδιστεί από άλλα κύτταρα, είτε το πήκτωμα σχηματίζεται *in situ* σε μια καλλιέργεια κυττάρων. Και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στον εγκλεισμό των κυττάρων σε ένα άκαμπτο δίκτυο, έτσι ώστε να μη διαχέονται στο περιβάλλον μέσο, ενώ παράλληλα επιτρέπεται η συνεχής μεταφορά θρεπτικών ουσιών και μεταβολιτών.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτού του τύπου της ακινητοποίησης είναι η παγίδευση μέσα σε πήκτωμα πολυσακχαριτών όπως αλγινικών, κ-καραγεννάνης, άγαρ, χιτοζάνης, πολυγαλακτουρονικού οξέως ή σε άλλα πολυμερή υλικά όπως σε ζελατίνη και κολλαγόνο (Norton *et al.*, 1994, Park *et al.*, 2000). Η ανάπτυξη των κυττάρων στο υλικό αυτό εξαρτάται από τους περιορισμούς της διάχυσης που επιβάλλονται από το πορώδες του υλικού και από την επίδραση της συσσωρευμένης βιομάζας. Για παράδειγμα, το εύρος διείσδυσης του οξυγόνου έχει υπολογιστεί πως είναι 0.08 – 0.10 mm σε σφαιρίδια καραγεννάνης [Huang *et al.*, 1990] και 0.1 – 0.15 mm σε σφαιρίδια αλγινικού [Ogbonna *et al.*, 1991]. Αναπτύσσεται ένας ανομοιογενώς κατανομημένος κυτταρικός πληθυσμός και πιθανώς εκείνα τα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια συμπεριφέρονται διαφορετικά σε σύγκριση με τα σχετικά φτωχά τροφοδοτούμενα κύτταρα του εσωτερικού.

Ένα από τα προβλήματα του εγκλωβισμού σε ένα πολυμερές πορώδες υλικό, όπως σε πήκτωμα πολυσακχαριτών, είναι η ικανότητα των κυττάρων στην εξωτερική επιφάνεια του στρώματος να πολλαπλασιάζονται και να απελευθερώνονται. Για να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα έχουν δημιουργηθεί σφαιρίδια με δυο στρώσεις, μια εσωτερική η οποία περιέχει τα κύτταρα και μια εξωτερική που τα συγκρατεί [Tanaka *et al.*, 1989, Taillandier *et al.*, 1994, Ramon-Portugal *et al.*, 2003].

4.1.3. Συσσωμάτωση με κροκύδωση (φυσική) ή με τη βοήθεια διαφόρων συνδετικών παραγόντων (τεχνητή)

Κροκύδωση των κυττάρων ονομάζεται, η συνάθροιση των κυττάρων ώστε να σχηματίσουν μια μεγαλύτερη μονάδα ή αλλιώς η ιδιότητα των κυττάρων σε εναιωρήματα να σχηματίζουν θρόμβους και να καθιζάνουν γρήγορα.. Η κροκύδωση μπορεί να θεωρηθεί τεχνική ακινητοποίησης, αφού το μεγάλο μέγεθος των συσσωματωμάτων τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιηθούν σε βιοαντιδραστήρες. Η ικανότητα σχηματισμού συσσωματωμάτων, παρατηρείται κυρίως σε μύκητες και φυτικά κύτταρα. Ωστόσο σε κυτταρικές καλλιέργειες που δεν γίνεται φυσική κροκύδωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τεχνητοί παράγοντες κροκύδωσης, ώστε να επαχθεί η συνάθροιση και η θρόμβωση. Η κροκύδωση ζυμών είναι σημαντική για τη βιομηχανία παρασκευής μύρας αφού επηρεάζει την παραγωγικότητα της ζύμωσης και την ποιότητα του προϊόντος. Επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως την σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος, το pH, το διαλυμένο οξυγόνο και τη σύσταση του θρεπτικού μέσου [Jin *et al.*, 1998].

4.1.4. Μηχανική συγκράτηση βιοκαταλυτών σε έναν φορέα

Ο μηχανική συγκράτηση των βιοκαταλυτών μπορεί να επιτευχθεί: i) με τη χρήση μεμβρανικών φίλτρων με μικρούς πόρους, ii) με εγκλωβισμό των κυττάρων σε μικροκάψουλες, iii) με ακινητοποίηση των βιοκαταλυτών σε μια επιφάνεια αλληλεπίδρασης δυο μη αναμειγνυόμενων υγρών. Αυτός ο τύπος ακινητοποίησης είναι ιδανικός όταν απαιτείται προϊόν ελεύθερο από κύτταρα και ελάχιστη μεταφορά ουσιών [Park *et al.*, 2000]. Στη αγορά είναι

διαθέσιμες μεμβράνες στις οποίες έχουν εγκλειστεί επιλεγμένα στελέχη ζυμών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην οινοποίηση. Τα κύρια μειονεκτήματα της κυτταρικής ακινητοποίησης ανάμεσα σε μεμβράνες με μικροπόρους, είναι οι περιορισμοί στις μεταφορές των ουσιών [Lebeau *et al.*, 1998] και η πιθανή μεμβρανική βιορύπανση που προκαλείται από την ανάπτυξη των κυττάρων [Gryta, 2002].

4.2. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ακινητοποίησης, γίνεται με βάση ακόλουθα κριτήρια [Margaritis *et al.*, 1984]:

- ⇒ Η μέθοδος πρέπει να είναι αρκετά ήπια ώστε να εξασφαλίζεται η ικανότητα αναγέννησης των συμπαράγοντων.
- ⇒ Η διαδικασία πρέπει να είναι ικανή να επανενεργοποιηθεί μετά από απενεργοποίηση, η οποία μπορεί να συμβεί μετά από μακροχρόνια χρήση.
- ⇒ Η τεχνική της ακινητοποίησης πρέπει να επιτρέπει την επίτευξη υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας μέσα στο βιοαντιδραστήρα και τη διατήρηση της σε αυτό το επίπεδο για μεγάλη χρονική περίοδο.
- ⇒ Η τεχνική της ακινητοποίησης πρέπει να είναι απλή και σχετικά οικονομική.
- ⇒ Το ακινητοποιημένο κυτταρικό σύστημα πρέπει να είναι σταθερό στις συνθήκες λειτουργίας (pH, θερμοκρασία).

4.3. ΠΡΟΫΠΟΘΕΣΕΙΣ ΧΡΗΣΗΣ ΦΟΡΕΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ.

Μια ποικιλία υλικών έχει μελετηθεί έως σήμερα για την χρήση τους ως φορείς για ακινητοποίηση κυττάρων, για παραγωγή αιθανόλης, κρασιού ή μπύρας (πίνακας). Τα υλικά αυτά μπορούν να διακριθούν σε οργανικά, ανόργανα, φυσικά υλικά και σε συστήματα μεμβρανών. Τα φυσικά υλικά όπως είναι το ξύλο, τα πριονίδια κ.α. είναι κυρίως food grade purity και χρησιμοποιούνται με ελάχιστη ή καμία επεξεργασία. Αντιθέτως, τα οργανικά υλικά είναι συνθετικά (όπως το πλαστικό) ή εξάγονται από φυσικές πηγές με πολύπλοκες διαδικασίες [Kourkoutas *et al.*, 2004].

Για να χρησιμοποιηθεί ένα υλικό ως φορέας ακινητοποίησης κυττάρων πρέπει να τηρούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις [Freeman, 1984, Martin, 1991]:

1. Να έχει μεγάλη επιφάνεια με πολλά λειτουργικά τμήματα στα οποία να μπορούν να προσδένονται τα κύτταρα.
2. Να είναι εύκολο στη χρήση, αναγεννήσιμο και με χαμηλό κόστος
3. Η βιωσιμότητα και η λειτουργική σταθερότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων, να είναι υψηλή και να διατηρείται για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.
4. Η βιολογική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων δεν πρέπει να επηρεάζεται αρνητικά από την διαδικασία της ακινητοποίησης.
5. Η πορώδης υφή του να είναι ομοιόμορφη, ώστε να επιτρέπεται η ελεύθερη ανταλλαγή των θρεπτικών υλικών, των προϊόντων και των αερίων.
6. Να εμφανίζει μηχανική, χημική, θερμική και βιολογική σταθερότητα, έτσι ώστε να μην αποικοδομείται εύκολα από ένζυμα, διαλύτες και μεταβολές της πίεσης.
7. Η τεχνική ακινητοποίησης στον φορέα να είναι απλή και οικονομική και να μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα
8. Στην περίπτωση της πόσιμης αλκοόλης ο φορέας πρέπει να είναι μη- τοξικός και να μην επηρεάζει την ποιότητα του προϊόντος.

| Micro-organism | Immobilization method/substrate | Support | Type of fermentation | Process/flow rate | Substrate/product |
|--|--|---------|----------------------|--|--|
| <i>S. cerevisiae</i> + <i>S. castellana</i> | Alginate beads | | Secondary AF | 10 ⁸ trawb cells l ⁻¹ wine; | Wine/sparking wine |
| <i>S. bayanus</i> | Mineral kiesel | | AF | Batch-stationary: 300 ml; | Glucose, amino acids |
| <i>S. cerevisiae</i> | 3-atomina pellets | | AF | Batch-stationary: 110 ml; | Glucose, amino acids |
| <i>S. cerevisiae</i> | Double-layer alginate beads | | MLF | Batch-stationary: 500 ml; | Glucose, amino acids |
| <i>S. cerevisiae</i> | Microfiltration membranes | | Secondary AF | 25°C | Glucose, amino acids |
| <i>S. cerevisiae</i> | Delignified cellulose material | | AF | Batch-stationary, UFR: 500 ml; 0-30°C | Glucose, amino acids |
| <i>S. cerevisiae</i> | Mineral kiesel | | AF | Two PBRs; continuous; 1500 ml; 5-16°C | Glucose, amino acids |
| <i>S. cerevisiae</i> | Mineral kiesel | | AF | Industrial-scale pilot-plant; multi-stage fixed bed tower reactor; 7.000L-100.000L; 20°C | Maltose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Porous, spherical glass beads | | Secondary AF | Flow scale: up-flow tubular reactor; 500L; 0-60°C; vertical PBR; continuous; 100 ml; 3°C | Green beer/mature beer |
| <i>S. cerevisiae</i> | Sponge-like, neutral, acidic and basic cross-linked cellulose | | AF | Up-flow; PBR; continuous; 2000 ml; 20°C | Glucose, fructose, sucrose/ethanol; fructose |
| <i>S. cerevisiae</i> + <i>L. plantarum</i> | Delignified cellulose material | | Post-primary AF; MLF | Batch-stationary: 400 ml; 0-30°C | Wort/beer |
| <i>S. cerevisiae</i> | Cellulose | | AF | Batch-stationary: 2170 ml; 0-30°C | Wort/beer |
| <i>S. cerevisiae</i> + <i>Candida lusitana</i> | <i>Lager cylinder</i> sponges | | AF | PBR; continuous; 1500 ml; 30°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> + <i>Candida lusitana</i> | Agar layer; microporous membrane filters | | AF | Two-chambered reactor; batch, symmetrical and asymmetrical aeration; 30°C | Glucose, xylose/ethanol |
| <i>L. kefir</i> | Cellulose particles; modified cellulose | | MLF | Batch-stationary: 400 ml; continuous; 2170 ml; 0-30°C | Wine/wine |
| <i>S. cerevisiae</i> | Cellulose particles; modified cellulose | | AF | PBR; continuous; 1500 ml; 30°C | Wort/beer |
| <i>S. cerevisiae</i> | Stainless steel untreated and modified | | AF | Batch-stationary: 75 ml; 30°C | Sucrose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Polyethylene, methyl methacrylate, polyethylene oxide | | AF | PBR, continuous; 200 ml; effect of pH and temperature | Glucose/ethanol |
| <i>S. bayanus</i> + <i>L. kefir</i> | Alginate gel | | AF; MLF | Up-flow, PBR; continuous; 2500 ml; 30°C | Apple juice/cider |
| <i>S. pasteurianus</i> | Porous cellulose carriers; modified and non modified | | AF | Batch-stationary; 50-400 ml; 5-20°C; Continuous; up-flow, CLR: 482 ml; 15°C | Glucose/ethanol |
| <i>C. melaleuca</i> | Alginate beads | | AF | Batch-stationary; 75 ml; 30°C | Sucrose/ethanol |
| <i>C. camp</i> | Alginate beads | | MLF | Flow scale; reactor; batch; 100 ml; 30°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Gluten pellets | | AF | Batch-stationary; 400 ml; 0-15°C; batch | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Stainless steel sponges; Al ₂ O ₃ granules | | AF | Batch-stationary; 70 ml; 30°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Gluten pellets | | AF | Batch-stationary; 800 ml; 5-25°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Delignified cellulose material | | AF | Batch-stationary; 300 ml; 1-25°C; continuous; 730 ml; 5-30°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Dried figs | | AF | PBR; batch; 400 ml; 0-15°C; batch; 600-1000 ml; 5-30°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Cross flow microfilters | | Cell growth; AF | Batch-stationary; 800 ml; 5-25°C | Glucose/ethanol |
| <i>K. marxianus</i> | Delignified cellulose material | | High-temp. AF | Single/double vessel; MBs; 500 ml; 25°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Gluten pellets | | Low-temp. AF | PBR; batch-stationary; 250 ml; 37-50°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Cu-organic | | Batch AF | UFR; batch; 300 ml; 5-30°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Cu-organic | | Secondary AF | Batch-stationary; 300 ml; 5-30°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Clayey pieces | | Low-temp. AF | Batch-stationary; 700 ml; 5-30°C | Glucose/ethanol |
| <i>S. cerevisiae</i> | Amalgam-activated styrene copolymer hydrogels | | AF | Batch-stationary; 300 ml; 5-30°C | Glucose/ethanol |

Πίνακας 3.3.2.1.1.: Οι κύριοι φορείς και τεχνικές ακινητοποίησης που προτείνονται για παραγωγή αιθανόλης. PBR=Packed Bed Reactor; FBL=Fluidized Bed Reactor; GLR=Gas-Lift Reactor; MB=Membrane reactor; AF=Alcoholic Fermentation, MLF=Malolactic Fermentation, Kourkoutas *et al.*, 2004].

4.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ.

Έχουν παρατηρηθεί διάφορες επιπτώσεις στην αύξηση, την φυσιολογία και την μεταβολική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων *S. cerevisiae*, σε σχέση με τα ελεύθερα. Πιο συγκεκριμένα συγκριτικές μελέτες ανάμεσα σε ακινητοποιημένα και ελεύθερα κύτταρα, αναφέρουν αύξηση των αποθηκευτικών και των δομικών πολυσακχαριτών, μεταβολές στον ρυθμό αύξησης, αύξηση στην πρόσληψη του υποστρώματος και στην απόδοση των προϊόντων, μείωση των παραγόμενων παραπροϊόντων, υψηλότερες τιμές του ενδοκυτταρικού pH, αυξημένη ανθεκτικότητα σε τοξικούς και ανασταλτικούς παράγοντες και αυξημένη δράση της ιμπερτάσης [Norton *et al.*, 1994].

Αξιοσημείωτο είναι το φαινόμενο της αύξησης της ανθεκτικότητας στην αιθανόλη των ακινητοποιημένων ζυμών, γεγονός σημαντικό στην παραγωγή διαλυμάτων υψηλής αλκοολικής περιεκτικότητας. Σύμφωνα με τους Hilge-Rotmann *et al.* (1991) η αλκοολική ανθεκτικότητα σχετίζεται θετικά με την αύξηση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών. Επίσης πιστεύεται πως το πολυμερές πλαίσιο που περικλείει τα ακινητοποιημένα κύτταρα μπορεί να παρέχει ένα προστατευτικό περιβάλλον κατά της τοξικότητας της αιθανόλης [Norton *et al.*, 1994].

Οι παραπάνω μεταβολές στα κύτταρα των ζυμών έχουν αποδοθεί στο μικροπεριβάλλον των ακινητοποιημένων κυττάρων που δημιουργείται από την στενή κυτταρική επαφή και το οποίο είναι απομονωμένο από το υπόλοιπο σύστημα. Πιο συγκεκριμένα στο περιβάλλον αυτό μια ποικιλία παραμέτρων όπως είναι, περιορισμοί στην διάχυση ουσιών, διαταραχές στο πρότυπο αύξησης των κυττάρων, επιδράσεις της επιφανειακής τάσης και της οσμωτικής πίεσης, μειωμένη ενεργότητα του νερού, διακυτταρική επικοινωνία και μετατροπή στην διαπερατότητα της μεμβράνης, ευνοούν την αύξηση της βιωσιμότητας και της ενεργότητας των κυττάρων.

4.5. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Η ακινητοποίηση των κυττάρων προσφέρει σε μια βιολογική διαδικασία επιθυμητές ιδιότητες, που δεν επιτυγχάνονται εύκολα σε συστήματα ελεύθερων κυττάρων. Αν και τα πλεονεκτήματα εξαρτώνται από τη μέθοδο ακινητοποίησης, μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω [Margaritis *et al.*, 1984]:

- ⇒ Με την ακινητοποίηση των κυττάρων, υπάρχει η δυνατότητα για μεγαλύτερες κυτταρικές συγκεντρώσεις στον βιοαντιδραστήρα και συνεπώς μπορούν να επιτευχθούν υψηλότερες αποδόσεις, μειωμένοι χρόνοι ζύμωσης και περιορισμός στις μη-παραγωγικές φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων.
- ⇒ Παρατηρείται παρατεταμένη ενεργότητα και σταθερότητα του βιοκαταλύτη. Ο φορέας πιθανόν να δρα σαν προστατευτικός παράγοντας έναντι των φυσικοχημικών επιδράσεων του pH, της θερμοκρασίας, διαλυτών ή ακόμη και βαρέων μετάλλων.
- ⇒ Η παρουσία στερεού σε διαλυτό μέσο, είναι γνωστό ότι συγκεντρώνει θρεπτικά υλικά στα όρια υγρού-στερεού. Τα ακινητοποιημένα κύτταρα εκτίθενται επομένως σε υψηλότερες συγκεντρώσεις θρεπτικών, με αποτέλεσμα υψηλότερους ρυθμούς ζυμώσεων.
- ⇒ Είναι εφικτή η διεξαγωγή συνεχών διαδικασιών.
- ⇒ Αυξάνεται η ανθεκτικότητα έναντι των υψηλών πυκνοτήτων των θρεπτικών μέσων και των υψηλών συγκεντρώσεων του προϊόντος (π.χ. αιθανόλης).
- ⇒ Είναι εφικτή η διεξαγωγή ζυμώσεων σε χαμηλές θερμοκρασίες, γεγονός που οδηγεί σε καλύτερης ποιότητας προϊόντα και εξοικονόμηση ενέργειας.
- ⇒ Ανάλογα με τη μέθοδο ακινητοποίησης, το περιεχόμενο του βιοαντιδραστήρα είναι σχετικά ελεύθερο από κύτταρα, γεγονός που διευκολύνει την ανάκτηση του τελικού προϊόντος και συνεπώς μειώνει το κόστος παραγωγής, αφού δεν απαιτείται απομάκρυνση των κυττάρων πριν την απόσταξη.

- ⇒ Ο βιοκαταλύτης μπορεί να αναγεννηθεί και να ξαναχρησιμοποιηθεί σε ζυμώσεις μιας παρτίδας για μεγάλες περιόδους, χωρίς να απομακρύνεται από τον βιοαντιδραστήρα.
- ⇒ Η υψηλή πυκνότητα κυττάρων ελαττώνει τις πιθανότητες μικροβιακής μόλυνσης.
- ⇒ Παρέχεται η ικανότητα να χρησιμοποιηθούν μικρότεροι και πιο απλοποιημένοι βιοαντιδραστήρες και συνεπώς μειώνεται το κόστος.
- ⇒ Μειώνεται ο χρόνος ωρίμανσης ορισμένων προϊόντων.

4.6. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Τα μειονεκτήματα των ακινητοποιημένων κυττάρων πρέπει να ξεπεραστούν για να είναι δυνατή εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα.

- ⇒ Τα μικροβιακά κύτταρα περιέχουν και ένζυμα που καταλύουν μη επιθυμητές αντιδράσεις. Μεταλλάξεις ή κατάλληλη επεξεργασία των κυττάρων, ενδέχεται να αυξήσουν την ενεργότητα των μη επιθυμητών ενζύμων και να μειώσουν αυτή των επιθυμητών.
- ⇒ Το κυτταρικό τοίχωμα και η κυτταρική μεμβράνη των ανέπαφων κυττάρων, συχνά εμποδίζουν τη διάχυση των υποστρωμάτων, των προϊόντων και άλλων συστατικών της αντίδρασης, μέσα και έξω από το κύτταρο. Αυτά τα φράγματα διάχυσης πρέπει να καταστρέφονται με κατάλληλη επεξεργασία των κυττάρων πριν και μετά την ακινητοποίηση.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το ενδιαφέρον της παγκόσμιας αγοράς καυσίμων για την χρήση της βιοαιθανόλης έναντι των συμβατικών καυσίμων, έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Με βάση τα δεδομένα της διεθνούς εμπειρίας σε ευρωπαϊκό, αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο, η εισαγωγή των βιοκαυσίμων στην ελληνική αγορά αναμένεται να αποφέρει πολλαπλά οφέλη. Η χρήση τους θα συμβάλλει σημαντικά στην προστασία του περιβάλλοντος, στην μείωση της εξάρτησης της χώρας από το πετρέλαιο, καθώς επίσης στην αύξηση της απασχόλησης.

Η αύξηση των αποδόσεων των ζυμωτικών διαδικασιών για την παραγωγή βιοαιθανόλης, αποτελεί κύριο στόχο της σχετικής έρευνας παγκοσμίως. Μια μεθοδολογία που εφαρμόζεται και μελετάται εντατικά στην βιοτεχνολογική παραγωγή αιθανόλης, είναι η χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων, ως μέσο για τη αύξηση της παραγωγικότητας των ζυμώσεων.

Στην παρούσα εργασία κύριος στόχος είναι μελέτη και η προοπτική αξιοποίησης δυο νέων υλικών της ελληνικής χλωρίδας ως φορέων ακινητοποίησης κυττάρων για την παραγωγή βιοαιθανόλης, με την συμμετοχή ζυμομυκήτων και υπόστρωμα την μελάσα. Η τελευταία αποτελεί ένα βιομηχανικό παραπροϊόν άφθονο και μικρού κόστους, προερχόμενο επίσης από την ελληνική σακχαροβιομηχανία.

Πιο συγκεκριμένα τα δύο υλικά που εξετάζονται είναι τμήματα του αποξηραμένου καρπού του φυτού *Luffa cylindrica* (ελίφη), καθώς και τεμάχια του βλαστού του φυτού *Arundo donax* (καλάμι). Οι φορείς αυτοί μελετώνται για να προσδιορισθούν οι παρακάτω παράμετροι:

α) Η δυνατότητα βελτίωσης της απόδοσης μετατροπής της πρώτης ύλης σε αιθανόλη παρουσία των φορέων αυτών.

β) Η πιθανή μείωση του κόστους παραγωγής αιθανόλης με την νέα τεχνολογία.

γ) Η καταλληλότητα των προτεινόμενων υλικών ως φορέων ακινητοποίησης βιοκαταλυτών (ικανή επιφάνεια καθήλωσης, έλλειψη τοξικότητας κ.λ.π.).

δ) Η χημική, θερμική και βιολογική σταθερότητα του εξεταζόμενου συστήματος φορέα-βιοκαταλύτη.

ε) Οι καλές μηχανικές ιδιότητες των φορέων, καθώς και η ευχέρεια χρησιμοποίησής τους σε μεγάλη κλίμακα (βιομηχανική).

στ) Η βιωσιμότητα της μεθόδου σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με τη χρήση ζυμομυκήτων.

ζ) Η συγκριτική μελέτη της απόδοσης των προτεινόμενων οργανικών υλικών σε σχέση με εκείνη άλλων φορέων ακινητοποίησης.

η) Η μικροσκοπική μελέτη της μορφής και της έκτασης της ακινητοποιημένης, στην επιφάνεια των φορέων, βιομάζας με τη χρησιμοποίηση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*, σε μορφή νωπής πιεστής ζύμης αρτοποιίας (baker's yeast), της εταιρίας S.I.Lesaffre. Ο τύπος αυτός πιεστής ζύμης περιέχει 70% περίπου υγρασία και 2×10^{10} κύτταρα/g. Η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε στην πλειοψηφία των πειραμάτων ήταν 20 g/l.

2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Ως πρώτη ύλη στα πειράματα παραγωγής αιθανόλης χρησιμοποιήθηκαν:

2.1. Διάλυμα μελάσας

Η μελάσα είναι ένα παχύρρευστο υγρό, παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής ζάχαρης. Είναι πλούσια σε σάκχαρα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία και αποτελεί κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την παραγωγή βιοαιθανόλης (πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1: Σύσταση μελάσας [Walker, 1998].

| Συστατικό | Περιεκτικότητα |
|---------------|--|
| Πηγές άνθρακα | Σακχαρόζη (48-50%), Φρουκτόζη, Γλυκόζη, Ραφινόζη (0,3-1,2%), Μη ζυμώσιμα σάκχαρα (2-4%) |
| Πηγές αζώτου | Αζωτούχες ενώσεις (10%), Αμινοξέα (0,3%) Το μεγαλύτερο μέρος του περιεχόμενου αζώτου είναι μη αφομοιώσιμο γι' αυτό απαιτείται η προσθήκη αζωτούχων αλάτων. |
| Μέταλλα | Κάλιο (K_2O / 3,4-4,7%), Νάτριο (Na_2O / 0,8-1,3%), Ασβέστιο (CaO) και Μαγνήσιο (MgO) [0,3%] Η προσθήκη P, K και S είναι απαραίτητη. |
| Βιταμίνες | Χαμηλή αλλά επαρκής περιεκτικότητα. Στην μελάσα που προέρχεται από σακχαρότευτλα είναι ανεπαρκής η ποσότητα της βιοτίνης. |
| Ιχνοστοιχεία | Περιέχει μια ποικιλία από ιχνοστοιχεία. |
| Υγρασία | 20% |
| Βεταΐνη | 5,5% |
| Οξέα | Πυρολιδονοκαρβονικό οξύ (2,8%), Γαλακτικό οξύ (1,9%), Μηλικό οξύ (0,4%), Κιτρικό οξύ (0,3%), Άλλα οργανικά οξέα (4,3%), |
| Τέφρα | 10,9 % |
| Χλωριούχα | 1,0 % |
| Θειικά | 0,3 % |

Για να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα διαλυόταν σε κατάλληλες ποσότητες απιονισμένου νερού ώστε να αποκτήσει την επιθυμητή αρχική πυκνότητα σακχάρων. Στην συνέχεια προσθέτονταν 1 g/l KH_2PO_4 και 1g/l $(NH_4)_2SO_4$ και το pH ρυθμιζόταν με H_2SO_4 στο 4,69. Το προκύπτον διάλυμα αποστειρωνόταν στους 120 °C, για 20 λεπτά και ήταν έτοιμο για χρήση.

2.2. Διάλυμα γλυκόζης

Παρασκευαζόταν με διάλυση D- γλυκόζης σε απιονισμένο νερό και στην συνέχεια προσθέτονταν 1 g/l KH_2PO_4 , 1g/l $(NH_4)_2SO_4$, 10 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ και 4 g/l yeast extract. Το pH ρυθμιζόταν με H_2SO_4 στο 4,69 και το προκύπτον διάλυμα αποστειρωνόταν στους 120 °C, για 20 λεπτά.

2.3. Διάλυμα σακχαρόζης

Παρασκευαζόταν με διάλυση σακχαρόζης σε απιονισμένο νερό και στην συνέχεια προσθέτονταν 1 g/l KH_2PO_4 , 1g/l $(NH_4)_2SO_4$, 10 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ και 4 g/l yeast extract. Το pH

ρυθμιζόταν με H₂SO₄ στο 4,69 και το προκύπτον διάλυμα αποστειρωνόταν στους 120 °C, για 20 λεπτά.

2.4. Εκχύλισμα σόργου

Τα στελέχη του σόργου καθαρίζονταν από τα φύλλα και τεμαχίζονταν σε μικρά τεμάχια 4-8 χιλιοστών με σπαστήρα. Ακολουθούσε εκχύλιση των σακχάρων στους 90°C σε ομογενοποιητή για 10 λεπτά. Η αναλογία σόργου/απιονισμένου νερού ήταν 1:1,5 (500 g σόργο σε 750 ml νερό). Το εκχύλισμα διηθούνταν με υφασμάτινο φίλτρο και το προκύπτον διάλυμα είχε πυκνότητα σακχάρων περίπου 2,5 °Be. Ακολούθως, το διάλυμα συμπυκνωνόταν με θέρμανση μέχρι βρασμού ώστε να προκύψει η επιθυμητή πυκνότητα (16 °Be). Στο διάλυμα με την επιθυμητή πυκνότητα προσθέτονταν KH₂PO₄ και (NH₄)₂SO₄ σε συγκέντρωση 1g/l και το pH ρυθμιζόταν με H₂SO₄ στο 4,69. Το προκύπτον διάλυμα αποστειρωνόταν στους 120 °C για 20 λεπτά και ήταν έτοιμο για χρήση.

2.5. Εκχύλισμα σταφίδας

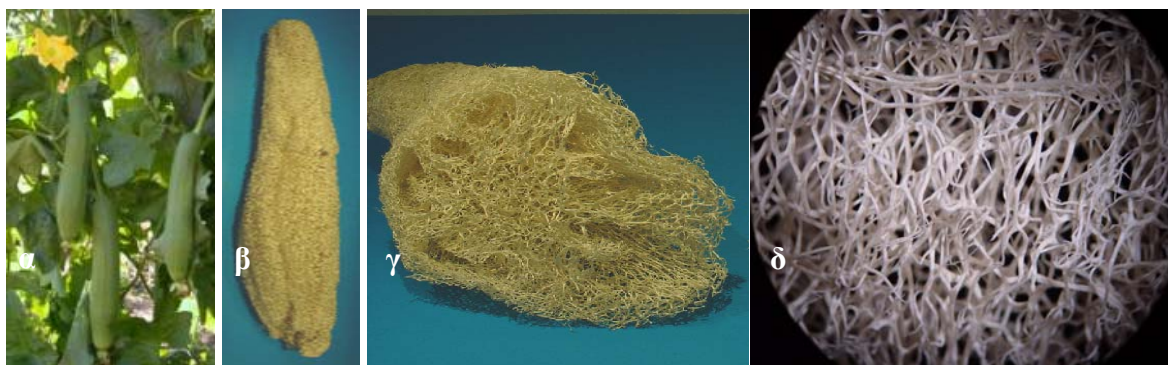
Το εκχύλισμα σταφίδας σουλτανίνας προέκυπτε από θερμή εκχύλιση της σταφίδας σε υδατόλουτρο στους 70 °C, για 4 ώρες. Η αναλογία του βάρους της σταφίδας προς τον όγκο του απιονισμένου νερού ήταν 1:1,5 (500 gr σταφίδας, σε 750 ml νερού). Στην συνέχεια γινόταν διήθηση του εκχυλίσματος και το προκύπτον διάλυμα είχε πυκνότητα, περίπου, 17 °Be. Η επιθυμητή πυκνότητα (16 °Be) προέκυπτε με αραίωση με απιονισμένο νερό. Στο διάλυμα προσθέτονταν KH₂PO₄ και (NH₄)₂SO₄ σε συγκέντρωση 1g/l και το pH ρυθμιζόταν με H₂SO₄ σε 4,69. Το προκύπτον διάλυμα αποστειρωνόταν στους 120 °C για 20 λεπτά και ήταν έτοιμο για χρήση.

3. ΦΟΡΕΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ως φορείς κυτταρικής ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τρία οργανικά υλικά (ελίφη, καλάμι, οξιά), ένα ανόργανο (κίσηρη) και ένας συνθετικός σπόγγος (συνθετικό πορώδες). Η συνολική εξωτερική επιφάνεια των χρησιμοποιηθέντων φορέων ήταν 750 cm² και υπολογιζόταν κατά προσέγγιση. Όλοι οι φορείς πριν τη χρήση τους κατεργάζονταν με απιονισμένο νερό με βρασμό (100 °C) για 15 λεπτά, προκειμένου να απομακρυνθούν άχρηστες επικαθίσεις και προσκολλημένα κύτταρα προηγούμενων ζυμώσεων.

α) Ελίφη

Η ελίφη είναι ένα φυσικό υλικό το οποίο προέρχεται από τον αποξηραμένο, ώριμο καρπό του φυτού *Luffa cylindrica*. Η *Luffa cylindrica*, είναι είδος της οικογένειας Curcubitaceae, το οποίο κατάγεται από την Ινδία και καλλιεργείται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Ο καρπός της έχει συνήθως διάμετρο 5-8 cm. και μήκος 38-46 cm. (εικόνα 3.1) και χρησιμοποιείται κυρίως σαν τροφή και σαν σφουγγάρι (αποξηραμένος).



Εικόνα 3.1: *Luffa cylindrica* (α) φυτό με καρπούς, (β, γ) αποξηραμένος καρπός, (δ) στερεοσκοπική εικόνα του αποξηραμένου ινώδους πλέγματος που χρησιμοποιήθηκε (x 65)

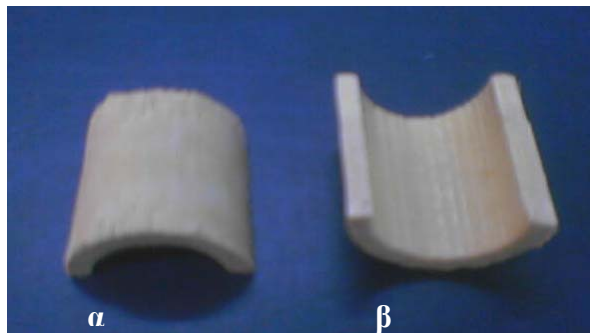
Περιέχει ένα δίκτυο από ίνες (ξυλώδης στηρικτικός ιστός), οι οποίες διατάσσονται προς όλες τις κατευθύνσεις (εικόνα 3.1) και συνίστανται κυρίως από κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη (πίνακας 3.1). Επίσης, αποτελεί και έναν κατάλληλο φορέα ακινητοποίησης, καθώς είναι σε μεγάλο βαθμό πορώδης, μη – τοξικός και βιοδιασπώμενος, ενώ έχει σταθερές φυσικές ιδιότητες και χαμηλό κόστος. Έχει κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για ακινητοποίηση διαφόρων κυττάρων όπως φυτικών, μικροφυκών (*Chlorella sorokiniana*, *Porphyridium cruentum*) και μικροβιακών (*Penicillium cyclopium*). [Mazmanci *et al*, 2005]. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τεμάχια ελίφης διαστάσεων περίπου 3 x 3 x 2 cm.

Πίνακας 3.1: Χημική σύσταση της *Luffa cylindrica* [Valcineide, *et al.*, 2005]

| Συστατικό | Περιεκτικότητα (%) |
|--------------|--------------------|
| Όλοκυτταρίνη | 82,4 |
| α-Κυτταρίνη | 63,0 |
| Ημικυτταρίνη | 19,4 |
| Λιγνίνη | 11,2 |
| Extractives | 3,2 |
| Τέφρα | 0,4 |

β) Καλάμι

Το καλάμι που χρησιμοποιήθηκε προήρχετο από τον αποξηραμένο βλαστό του φυτού *Arundo donax* (εικόνα 3.2). Το καλάμι τεμαχίστηκε σε κυλινδρικά κομμάτια ύψους περίπου 2 cm (διάμετρος περίπου 1,2 cm) ακολούθησε κάθετη τομή τους και καθαρισμός του εσωτερικού περιεχομένου. Επίσης αφαιρέθηκε η εξωτερική στιλπνή του επιφάνεια.



Εικόνα 3.2: Φωτογραφία της εξωτερικής (α) και της εσωτερικής (β) επιφάνειας κατεργασμένου τεμαχίου καλάμιου που χρησιμοποιήθηκε.

γ) Ξύλο οξιάς

Για τη διεξαγωγή ορισμένων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν κυλινδρικά τεμάχια οξιάς (εικόνα) τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία χημική επεξεργασία. Η οξιά ήταν σε μορφή ράβδων μήκους 2 m και διαμέτρου 1,7 cm οι οποίες τεμαχίζονταν στο εργαστήριο σε μικρούς κυλίνδρους ύψους 2 cm και διαμέτρου 1,7 cm.



Εικόνα 3.3: Στερεοσκοπική εικόνα τεμαχίου οξιιάς (x 65).

δ) Κίσηρη

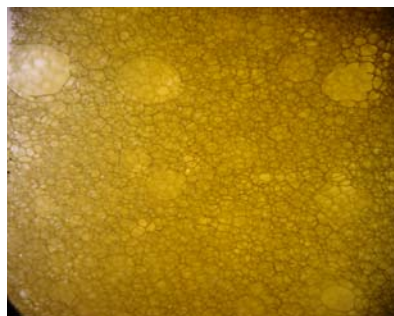
Το ορυκτό κίσηρη (ελαφρόπετρα) που χρησιμοποιήθηκε είναι ηφαιστειακό πέτρωμα, με τόπο προέλευσης την Σαντορίνη. Αποτελείται από 72% SiO_2 , 13% Al_2O_3 και σε μικρότερες ποσότητες MgO , MnO , Na_2O και K_2O . Είναι πορώδες σε ποσοστό 80% και έχει πυκνότητα $400\text{-}900 \text{ Kg/m}^3$. Για να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα θρυμματίστηκε και κατεργάστηκε, ώστε να προκύψουν σφαιρικής μορφής τεμάχια, διαμέτρου 1 cm περίπου (εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Στερεοσκοπική εικόνα τεμαχίου κίσηρης (x 65).

ε) Συνθετικό πορώδες

Το συνθετικό πορώδες (σφουγγάρι εμπορίου) (εικόνα) τεμαχίστηκε σε κομμάτια διαστάσεων 2 x 2 x 3 cm.



Εικόνα 3.5: Στερεοσκοπική εικόνα συνθετικού πορώδους (x 65).

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε γυάλινους αντιδραστήρες (Simax) χωρητικότητας 1000 ml (εικόνα 4.1), με την μέθοδο του διαλείποντος έργου.

4.1. Ζυμώσεις σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, απουσία φορέα

Αρχικά, 500 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού εμβολιάζονταν με την ανάλογη ποσότητα *Saccharomyces cerevisiae* και τοποθετούνταν στον αντιδραστήρα. Ο αντιδραστήρας στην συνέχεια τοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο σε κατάλληλη θερμοκρασία (Shellab 1375 FX, Forced air oven, Sheldon manufacturing, INC). Μετά το τέλος της ζύμωσης από το μίγμα της αντίδρασης (θρεπτικό υλικό, μικροοργανισμός, προϊόντα), λαμβάνονταν δείγματα από τα οποία υπολογίζονταν η συγκέντρωση των κυττάρων, η συγκέντρωση της παραχθείσας αιθανόλης και στην συνέχεια η παραγωγικότητα του αντιδραστήρα.

4.2. Ζυμώσεις σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, παρουσία φορέα

Στις περιπτώσεις που οι ζυμώσεις διεξάγονταν παρουσία φορέα ακινητοποίησης, τοποθετούνταν πρώτα ο φορέας στον αντιδραστήρα και στην συνέχεια προσθέτονταν το εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό. Ορισμένοι φορείς λόγω της φύσης τους επέπλεαν και για το λόγο αυτό προσαρμοζόταν ειδική κατασκευή που συγκρατούσε το φορέα μέσα στο διάλυμα. Μετά το τέλος της ζύμωσης, ο φορέας απομακρυνόταν και δείγματα από το μίγμα της αντίδρασης που απέμενε εξετάζονταν για την συγκέντρωση των ελευθέρων κυττάρων και την συγκέντρωση της αιθανόλης.



Εικόνα 4.1: Το σύστημα της ζύμωσης.

4.3. Επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με αναγέννηση των φορέων

Για τις ανάγκες ορισμένης ομάδας πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος φορέας ακινητοποίησης (ελίφη - καλάμι) σε επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές ο φορέας, μετά το τέλος κάθε ζύμωσης επεξεργαζόταν κατάλληλα ώστε να απομακρυνθούν τα ακινητοποιημένα κύτταρα ζύμης και τα υπολείμματα του θρεπτικού υλικού. Συγκεκριμένα, οι φορείς τοποθετούνταν σε σκεύος με απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία βρασμού. Μετά από 15 λεπτά γινόταν απόχυση του υγρού του πρώτου βρασμού του φορέα και ακολουθούσε δεύτερος βρασμός (επίσης για 15 λεπτά), μετά την προσθήκη νέας ποσότητας νερού. Μετά τους δύο διαδοχικούς βρασμούς, ο φορέας αφηνόταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε τα τεμάχια να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και τοποθετούνταν στον αντιδραστήρα. Στην συνέχεια προσθέτονταν εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό και ξεκινούσε μια νέα παρτίδα ζύμωσης.

4.4. Επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, με χρήση του ίδιου φορέα και των ακινητοποιημένων σ' αυτόν κύτταρων

Σε κάποια πειράματα πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με την χρήση του ίδιου φορέα, αλλά χωρίς την προσθήκη νέας βιομάζας. Πιο συγκεκριμένα, μετά το τέλος κάθε ζύμωσης ο φορέας είτε αφηνόταν να αποστραγγιστεί από το πλεονάζον μίγμα της ζύμωσης, είτε ξεπλενόταν επιπλέον σε αποστειρωμένο διάλυμα μελάσας. Στην συνέχεια τοποθετούνταν στον αντιδραστήρα και προσθέτονταν θρεπτικό υλικό, το οποίο όμως δεν ήταν εμβολιασμένο με καινούρια κύτταρα ζύμης.

5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Με πυκνόμετρα τύπου Baumé

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης σακχάρων χρησιμοποιήθηκαν πυκνόμετρα τύπου Baumé (Alla, France). Η κλίμακα Baumé, αποτελεί μέτρο της ποσότητας των διαλυτών σακχάρων ενός διαλύματος. Αποτελεί παράλληλα και ένα μέσο εκτίμησης της παραγόμενης αιθανόλης, καθώς θεωρητικά από διάλυμα σακχάρων 1 Baumé μετά από ζύμωση θα παραχθεί αιθανόλη 1 % v/v.

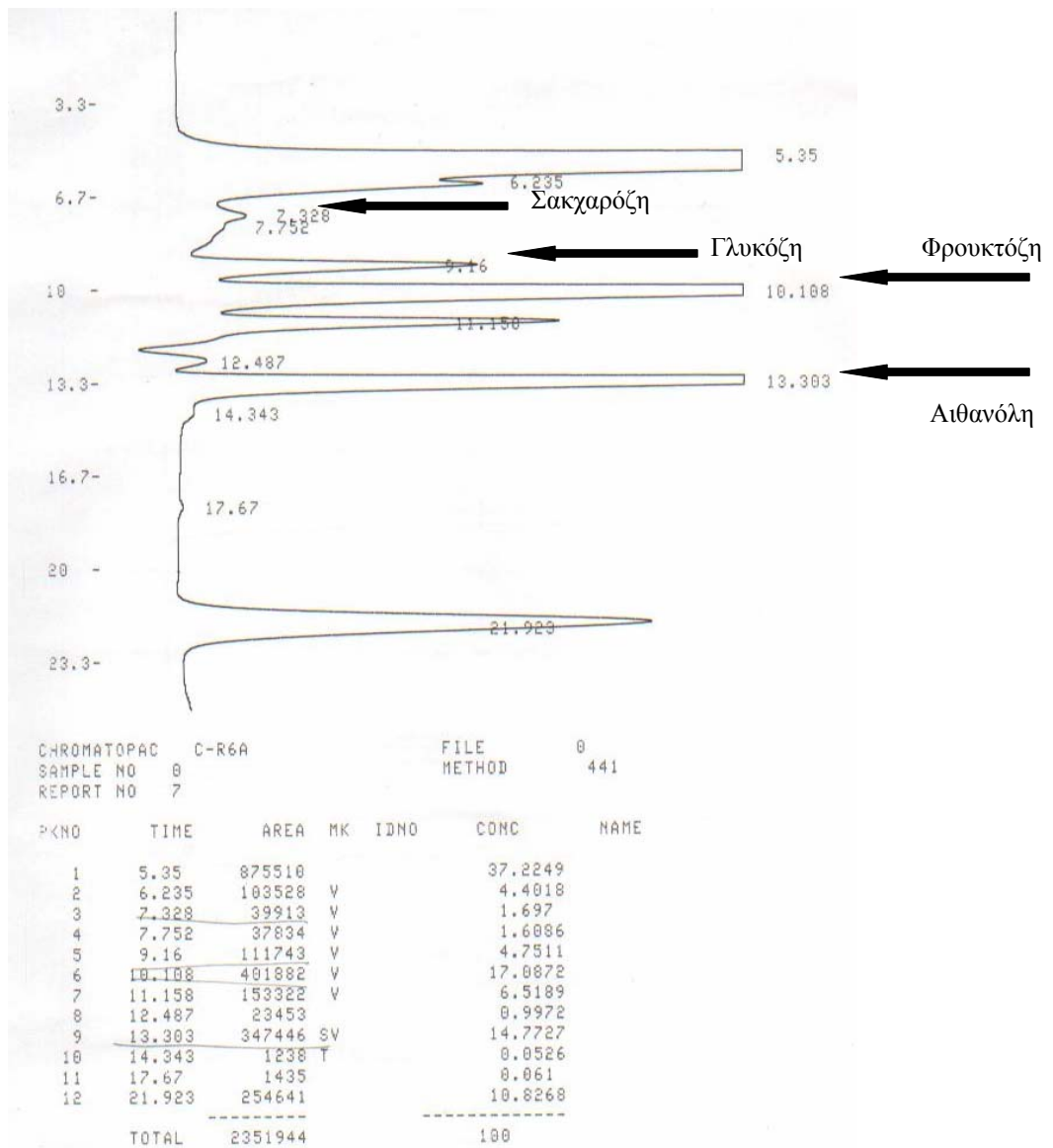
Με υγρή χρωματογραφία (HPLC)

Η τελική περιεκτικότητα σε σάκχαρα ορισμένων δειγμάτων, αναλύθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης. Η HPLC είναι μια μορφή της χρωματογραφίας στήλης (εικόνα 5.1). Η προς ανάλυση ουσία διοχετεύεται υπό υψηλή πίεση σε υγρή μορφή (κινητή φάση), μέσα σε μια στήλη που περιέχει μικροσφαιρίδια καλυμμένα με την στατική φάση. Ο χρόνος που τα διαχωρισμένα συστατικά παραμένουν στην στατική φάση και συνεπώς ο χρόνος που διαθέτουν αυτά να διαχυθούν στην στήλη, είναι μειωμένος. Αυτό οδηγεί σε στενότερες κορυφές στο προκύπτον χρωματογράφημα και συνεπώς σε μεγαλύτερη ανάλυση (είναι πιο εύκολο να διαφοροποιηθούν οι κορυφές) και ευαισθησία (ψηλές στενές κορυφές μπορούν να διακριθούν πιο εύκολα από θορύβους σε σχέση με πιο κοντές και ευρύτερες κορυφές).



Εικόνα 5.1: Συσσκευή HPLC.

Στην παρακάτω εικόνα 5.2 φαίνεται το αποτέλεσμα της χρωματογραφίας ενός δείγματος από ζύμωση σε διάλυμα μελάσας αρχικής πυκνότητας 18 °Be.



Εικόνα 5.2: Χρωματογράφημα HPLC

6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Από το δείγμα που λαμβάνονταν μετά το τέλος της ζύμωσης, 100 ml μεταφέρονταν για απόσταξη, σε συστοιχία Dujardin-Salleron (εικόνα 6.1). Στην συνέχεια με χρήση αλκοολόμετρου Gay-Lussac, υπολογιζόταν το τελικό ποσό της αιθανόλης που περιείχε το δείγμα.



Εικόνα 6.1: Συστοιχία απόσταξης Dujardin-Salleron.

Η αρχή λειτουργίας της συστοιχίας απόσταξης είναι η εξής:

Κατά το βρασμό του δείγματος, εξατμίζεται η αιθανόλη, περνά στο άνω μέρος της φιάλης ζέσεως και από εκεί σε σωλήνα που συγκοινωνεί με αυτή μέσω οπής. Οι ατμοί της αιθανόλης οδηγούνται στο εσπειραμένο μέρος του σωλήνα που είναι βυθισμένο σε νερό, με αποτέλεσμα την απότομη πτώση της θερμοκρασίας τους. Σταδιακά η αιθανόλη συμπυκνώνεται και οδηγείται στο τελικό άκρο του σωλήνα όπου συγκεντρώνεται σε ογκομετρική φιάλη. Στην συνέχεια με χρήση αλκοολόμετρου και κατάλληλων πινάκων υπολογίζεται το ποσό της αιθανόλης που περιείχε το δείγμα.

7. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η συγκέντρωση της βιομάζας στο τελικό μίγμα της ζύμωσης, προσδιορίστηκε με μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer improved, μετά από κατάλληλη αραιώση των δειγμάτων.

8. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗΣ

Φωτονικό μικροσκόπιο

Τα κύτταρα της ζύμης που περιέχονταν στα δείγματα από τις ζυμώσεις, παρατηρήθηκαν και μετρήθηκαν σε φωτονικό μικροσκόπιο Leica DMLB.

Στερεοσκόπιο

Δείγματα των φορέων ακινητοποίησης μελετήθηκαν σε στερεοσκόπιο Zeiss, Stemi 2000-C και φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Sony, model no. DSC-F717, 5.0 mega pixels.

Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Δείγματα φορέων ακινητοποίησης παρατηρήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) JEOL JSM-6300, αφού πρώτα επιστρώθηκαν με χρυσό με εξάχνωση υπό κενό (συσκευή επίστρωσης: Fine Coat Ion Sputter, JFC-1100). Στις περιπτώσεις που οι φορείς μελετήθηκαν ύστερα από την συμμετοχή τους σε ζυμώσεις, πριν μεταφερθούν στο μικροσκόπιο, τοποθετούνταν σε κλίβανο στους 30 °C για 3 μέρες για την απομάκρυνση της υγρασίας.



Εικόνα 7.1: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM)

9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παραγωγικότητα

Η παραγωγικότητα ενός αντιδραστήρα εκφράζεται σαν η ποσότητα του προϊόντος που παράγεται, στη μονάδα του χρόνου και όγκου [Λιακοπούλου-Κυριακίδου, 2004].

Η παραγωγικότητα μιας ζύμωσης ορίζεται ως:

$$\text{Παραγωγικότητα (P)} = \frac{\text{Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l)}}{\text{Χρόνος ολοκλήρωσης ζύμωσης (h)}}$$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας ήταν, όπως ήδη αναφέρθηκε, η βελτίωση της παραγωγικότητας αλκοόλης από φθινό και άφθονο υπόστρωμα με τη χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων. Στα πλαίσια λοιπόν της παρούσας ερευνητικής εργασίας, εξετάστηκε η δυνατότητα χρήσης δύο νέων οργανικών υλικών ως φορέων ακινητοποίησης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν μετά από κατάλληλη κατεργασία, τεμάχια ελίφης και τεμάχια καλαμιού. Οι φορείς αυτοί επιλέχθηκαν μεταξύ άλλων λόγω του ότι διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια προσκόλλησης των κυττάρων, έχουν μικρό κόστος και καλές μηχανικές ιδιότητες, είναι εύκολοι στο χειρισμό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ευχέρεια σε μεγαλύτερη κλίμακα (βιομηχανική), διατηρούν καλή χημική, θερμική και βιολογική σταθερότητα, δεν είναι τοξικοί και δεν αλλοιώνονται εύκολα. Μελετήθηκαν διάφοροι παράμετροι που μπορούν να επηρεάζουν την καταλληλότητα των υλικών αυτών και έγινε συγκριτική μελέτη με άλλους φορείς ακινητοποίησης που έχουν ήδη μελετηθεί (ξύλο, κίσηρη, συνθετικό πορώδες υλικό). Μελετήθηκε ιδιαίτερα η επίδραση σε κάθε περίπτωση, του υλικού ακινητοποίησης στο ρυθμό ζύμωσης, στην περιεκτικότητα σε αλκοόλη του τελικού προϊόντος και στην παραγωγικότητα σε αυξανόμενες αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων του υλικού ζύμωσης. Όλες οι ζυμωτικές διαδικασίες διεξήχθησαν με την μέθοδο του διαλείποντος έργου (ενός κύκλου ή μιας παρτίδας) και επαναλήφθηκαν δύο φορές.

1. ΕΛΙΦΗ

1.1. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΦΗΣ ΣΕ ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

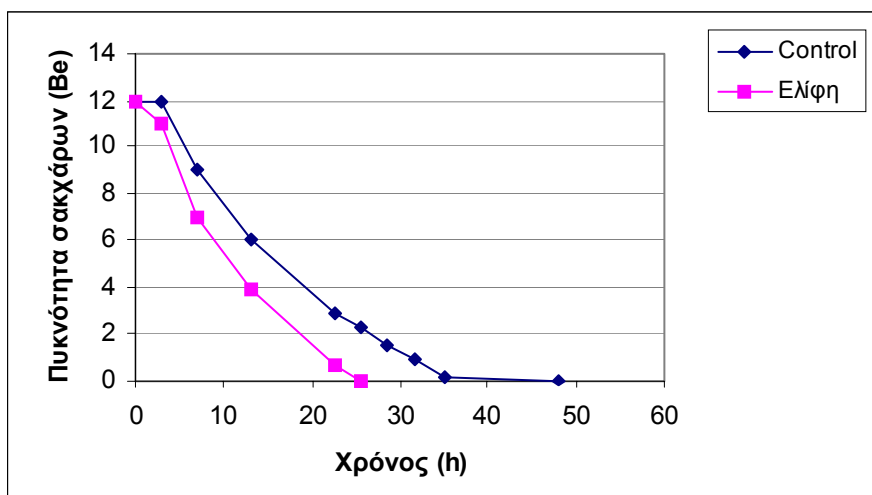
Σκοπός των πειραμάτων ήταν να μελετηθεί η χρήση της ελίφης ως φορέα για την ακινητοποίηση κυττάρων σε ζυμώσεις διαλυμάτων απλών σακχάρων. Ως πρότυπα διαλύματα σακχάρων χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα γλυκόζης και διαλύματα σακχαρόζης διαφόρων αρχικών πυκνοτήτων (12, 16 και 18 °Be). Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν με την συμμετοχή ως βιοκαταλύτη της *Saccharomyces cerevisiae* (20 g/l), στους 30 °C.

1.1.1. Διαλύματα γλυκόζης

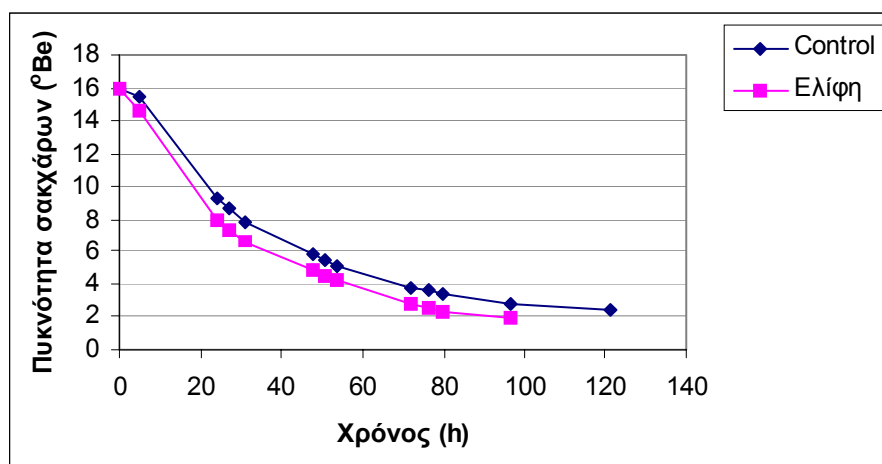
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων στα οποία χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 1.1.1 και αναλύονται στα ακόλουθα διαγράμματα.

Πίνακας 1.1.1: Αποτελέσματα ζυμώσεων σε διαλύματα διαφορετικών πυκνοτήτων γλυκόζης, απουσία (control) και παρουσία ελίφης

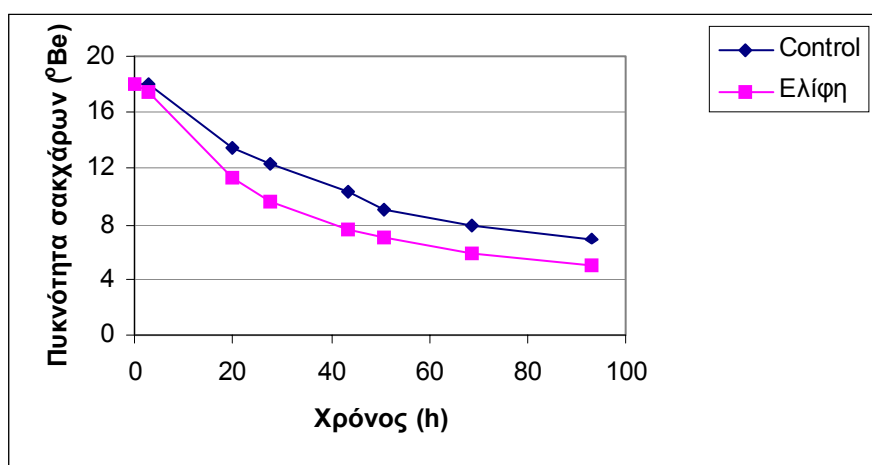
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τητα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|---------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------------|--|--|-----------|-----------|
| Control | 12 | 0 | 48 | 93,22 | 1,942 | 16,8 | 19,8 | 4,69 | 3,04 |
| Ελίφη | 12 | 0 | 25,5 | 93,22 | 3,656 | 16,8 | 18,6 | 4,69 | 2,6 |
| Control | 16 | 2,4 | 121,5 | 106,65 | 0,878 | 16,8 | 22,8 | 4,69 | 3,41 |
| Ελίφη | 16 | 1,9 | 97 | 110,6 | 1,140 | 16,8 | 9,3 | 4,69 | 3,15 |
| Control | 18 | 6,9 | 93 | 88,48 | 0,951 | 16,8 | 15,9 | 4,69 | 3,36 |
| Ελίφη | 18 | 5 | 93 | 101,91 | 1,096 | 16,8 | 14,3 | 4,69 | 3,15 |



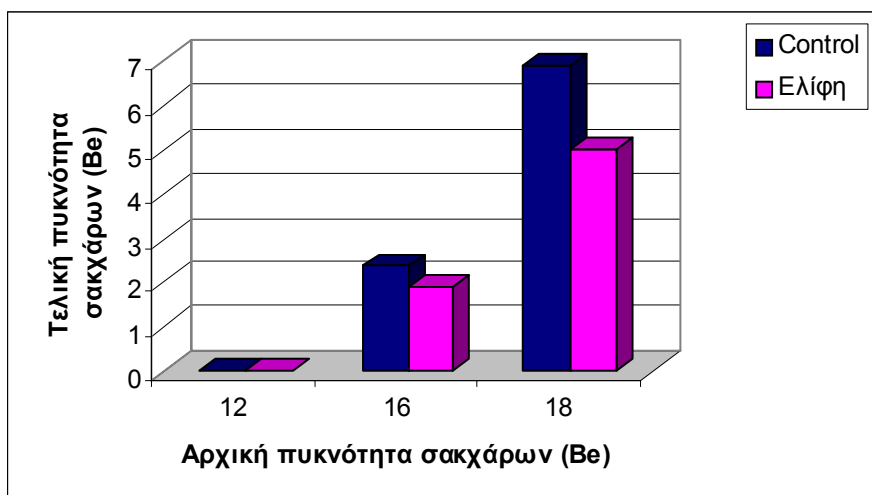
Γράφημα 1.1.1: Κινητική ζύμωσης διαλύματος γλυκόζης πυκνότητας 12 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



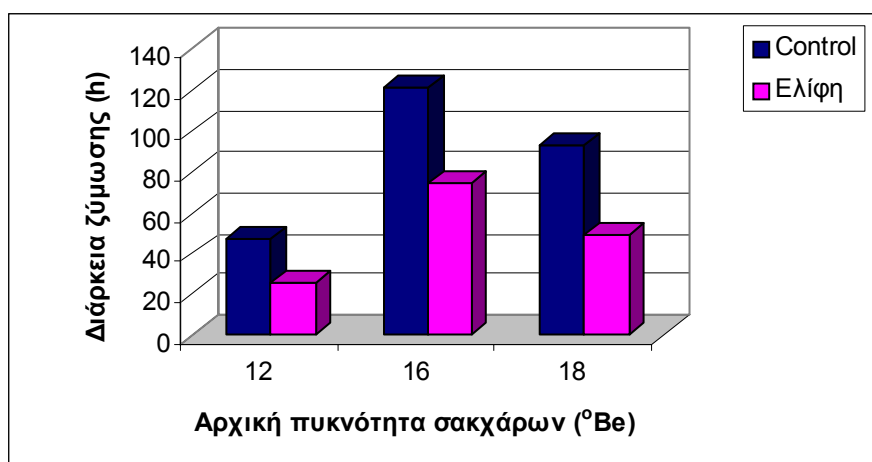
Γράφημα 1.1.2: Κινητική ζύμωσης διαλύματος γλυκόζης πυκνότητας 16 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



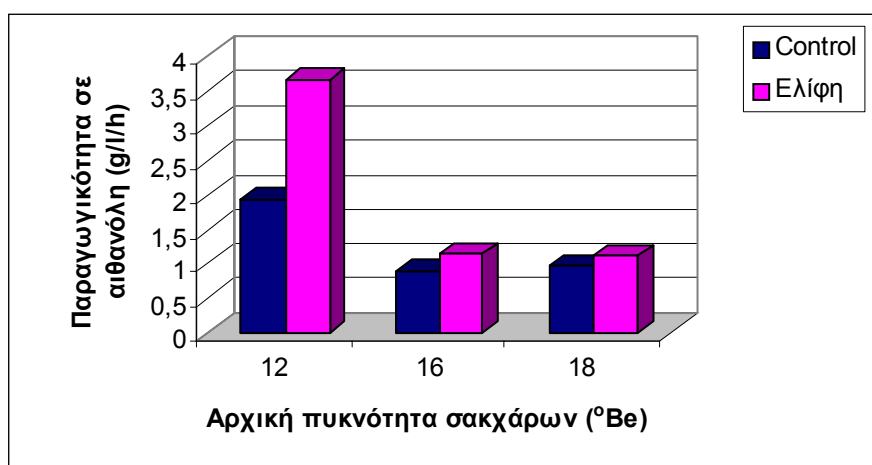
Γράφημα 1.1.3: Κινητική ζύμωσης διαλύματος γλυκόζης πυκνότητας 18 °Be απουσία και παρουσία ελίφης.



Γράφημα 1.1.4: Συγκριτικό διάγραμμα της τελικής πυκνότητας του σακχάρου που παραμένει μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες σακχάρου.



Γράφημα 1.1.5: Συγκριτικό διάγραμμα χρόνου της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες σακχάρου.



Γράφημα 1.1.6: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες σακχάρου.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρουσία της ελίφης φάνηκε να επηρεάζει θετικά όλες τις παραμέτρους των ζυμώσεων στα διαλύματα γλυκόζης. Η θετική της επίδραση ήταν αισθητή σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε αραιά (12 °Be) όσο και σε πυκνά διαλύματα (18 °Be).

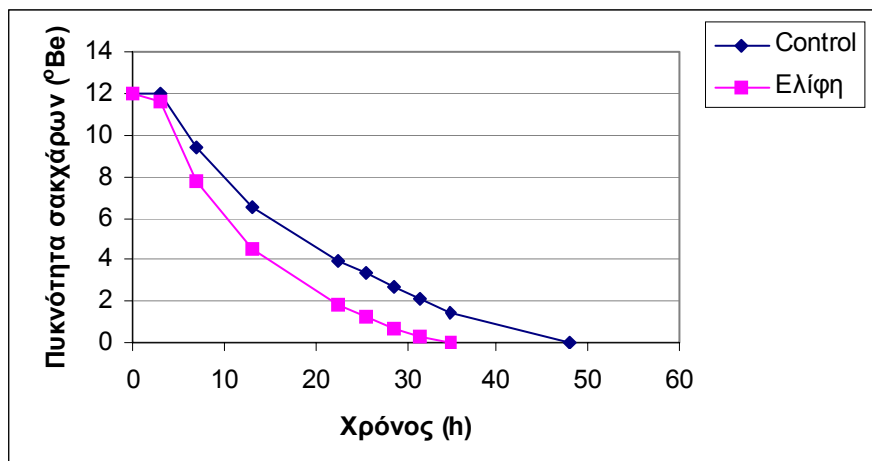
- ✓ Στις ζυμώσεις των διαλυμάτων των 12 °Be, στα οποία είχε προστεθεί ελίφη η παραγωγικότητα αυξήθηκε περίπου κατά 88 % σε σχέση με το control, αφού ολοκληρώθηκαν στον μισό περίπου χρόνο.
- ✓ Στα διαλύματα των 16 °Be η παραγωγικότητα παρουσία της ελίφης αυξήθηκε περίπου κατά 30%, εξαιτίας της μείωσης της διάρκειας της ζύμωσης (20%) και της μικρής αύξησης (4%) της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης.
- ✓ Στο συγκεκριμένο πείραμα, αλλά και στα υπόλοιπα που ακολουθούν, παρουσιάζει ενδιαφέρον η επίδραση της παρουσίας της ελίφης κυρίως στις ζυμώσεις σε διαλύματα υψηλής πυκνότητας σε σάκχαρο (>18 °Be). Σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων ο σακχαρομύκητας, απουσία του φορέα αδυνατεί να αξιοποιήσει ένα μεγάλο μέρος από αυτά, εξαιτίας της επίδρασης της αυξημένης συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης στα κύτταρα, καθώς και της πίεσης από τις υπεροσμωτικές συνθήκες που επικρατούν. Αντίθετα, παρουσία της ελίφης στους 18 °Be, τα κύτταρα κατόρθωσαν να αξιοποιήσουν μεγαλύτερο ποσοστό των διαθέσιμων σακχάρων με αποτέλεσμα η παραγωγικότητα της ζύμωσης να αυξηθεί σχεδόν κατά 25 %.
- ✓ Το pH του μίγματος της ζύμωσης μειώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις μέσα στις πρώτες τρεις ώρες από την έναρξη της ζύμωσης.
- ✓ Η συγκέντρωση των ελευθέρων κυττάρων μετά το τέλος της ζύμωσης, ήταν μικρότερη στις ζυμώσεις παρουσία του φορέα σε σχέση με τις ζυμώσεις ελέγχου. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει εν μέρει την ακινητοποίηση των κυττάρων στην επιφάνεια του φορέα.

1.1.2. Διαλύματα σακχαρόζης

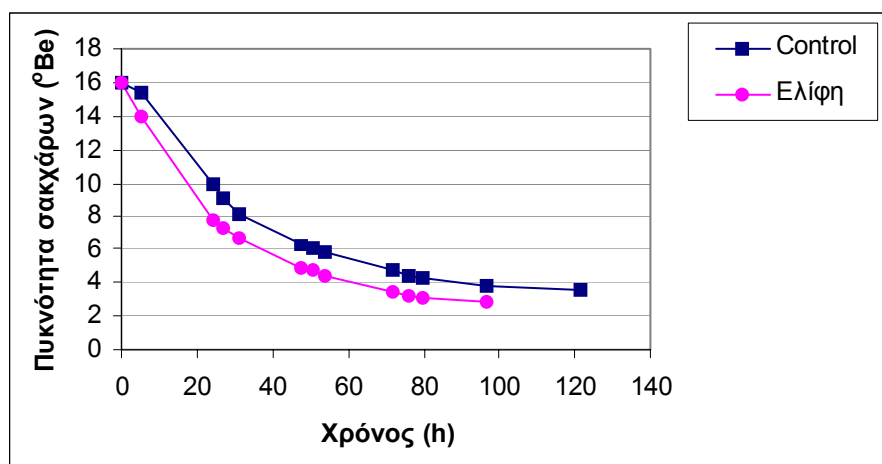
Στην συνέχεια διεξήχθησαν πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη ο δισακχαρίτης σακχαρόζη. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα και αναλύονται στα ακόλουθα διαγράμματα.

Πίνακας 1.1.2: Αποτελέσματα ζυμώσεων σε διαλύματα διαφορετικών πυκνοτήτων σακχαρόζης απουσία (control) και παρουσία ελίφης

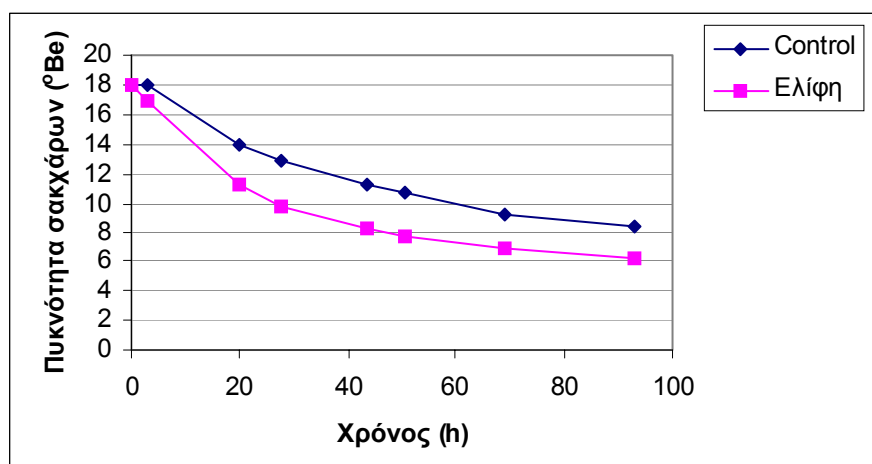
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παραγ/τητα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|---------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|--|-----------|-----------|
| Control | 12 | 0 | 48 | 91,64 | 1,909 | 16,8 | 16,9 | 4,69 | 2,97 |
| Ελίφη | 12 | 0 | 35 | 93,22 | 2,663 | 16,8 | 15,4 | 4,69 | 2,84 |
| Control | 16 | 3,5 | 121,5 | 97,17 | 0,800 | 16,8 | 17,3 | 4,69 | 3,44 |
| Ελίφη | 16 | 2,9 | 97 | 101,91 | 1,051 | 16,8 | 13,1 | 4,69 | 3,15 |
| Control | 18 | 8,5 | 93 | 74,26 | 0,798 | 16,8 | 14,7 | 4,69 | 3,46 |
| Ελίφη | 18 | 6,2 | 93 | 93,22 | 1,002 | 16,8 | 12,8 | 4,69 | 3,18 |



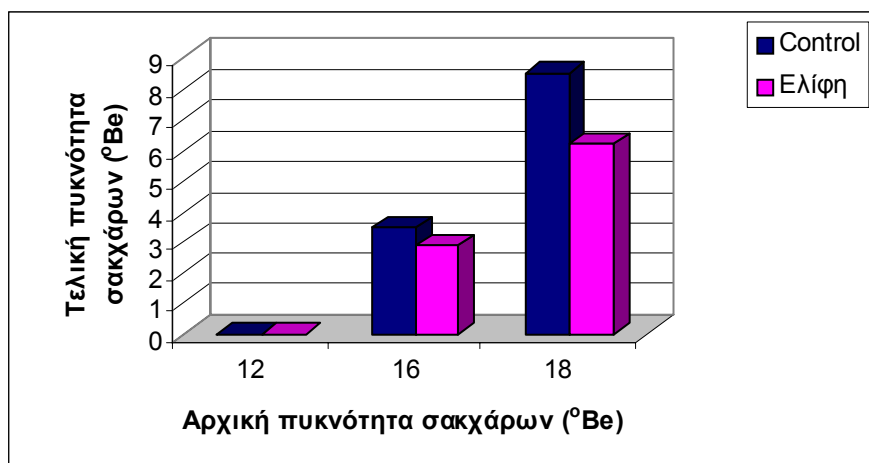
Γράφημα 1.1.7: Κινητική ζύμωσης διαλύματος σακχαρόζης πυκνότητας 12 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης



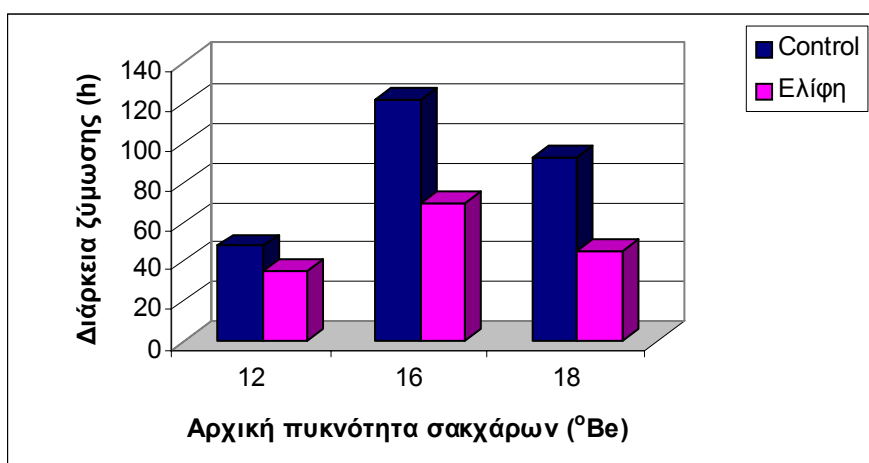
Γράφημα 1.1.8: Κινητική ζύμωσης διαλύματος σακχαρόζης πυκνότητας 16 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



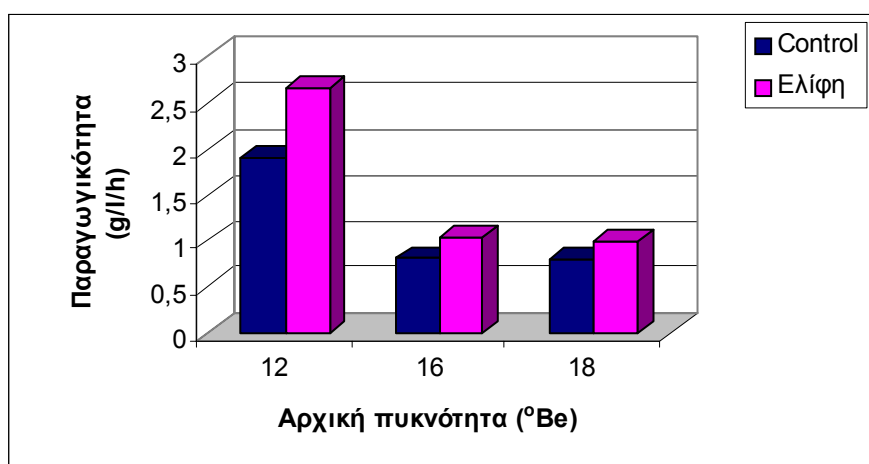
Γράφημα 1.1.9: Κινητική ζύμωσης διαλύματος σακχαρόζης πυκνότητας 18 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης



Γράφημα 1.1.10: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες.



Γράφημα 1.1.11: Συγκριτικό διάγραμμα χρόνου της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες σακχάρων.



Γράφημα 1.1.12: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες σακχάρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη της δράσης της ελίφης ως φορέα ακινητοποίησης, συνεχίστηκε με την χρήση ως πηγής σακχάρου του δισακχαρίτη σακχαρόζη. Από τα αποτελέσματα γίνεται φανερό ότι, όπως στην περίπτωση του μονοσακχαρίτη (γλυκόζη), έτσι και στην παρούσα περίπτωση του δισακχαρίτη, η παρουσία της ελίφης επιδρά θετικά στις ζυμώσεις ανεξαρτήτως της αρχικής πυκνότητας των σακχάρων. Η παραγωγικότητα αυξήθηκε κατά 40% στα 12 °Be, 31% στα 16 °Be και 26% στα 18 °Be. Στα 18 °Be τα σάκχαρα που αξιοποιήθηκαν παρουσία της ελίφης ήταν περισσότερα κατά 13%, ενώ μειώθηκε σημαντικά ο χρόνος ζύμωσης.

Όλες λοιπόν οι παραπάνω παρατηρήσεις συνηγορούν στο ότι η ελίφη αποτελεί ένα κατ' αρχήν καλό υλικό δέσμευσης κυττάρων και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της δράσης της σε φθηνά υποστρώματα, ώστε η παραγόμενη αλκοόλη να έχει εμπορικό ενδιαφέρον.

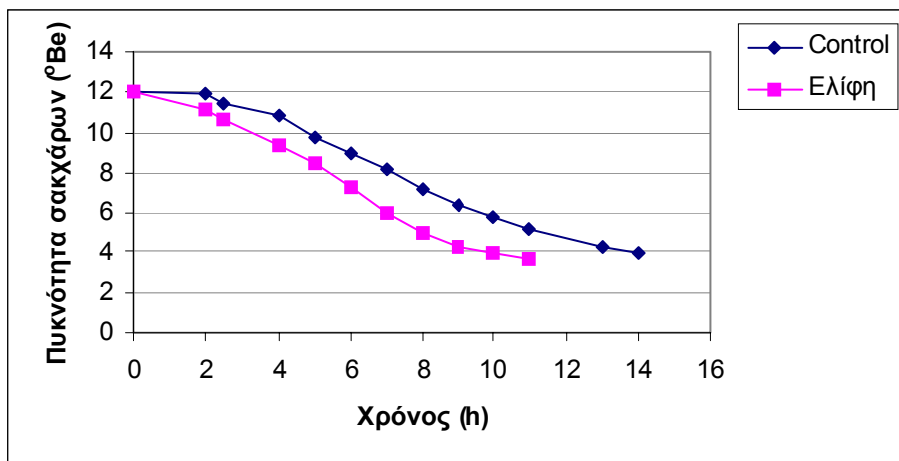
1.2. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΦΗΣ ΣΕ ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕΛΑΣΑΣ

Στην συγκεκριμένη ομάδα πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας της ελίφης, στην ικανότητα των κυττάρων της *S. cerevisiae* να ζυμώνουν διαλύματα μελάσας αυξανόμενης αρχικής πυκνότητας σακχάρων. Χρησιμοποιήθηκε μελάσα γιατί είναι μια φθηνή πρώτη ύλη, με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και χρησιμοποιείται ευρέως διεθνώς αλλά και στην Ελλάδα για την παραγωγή αιθανόλης, με την κλασική μεθοδολογία.

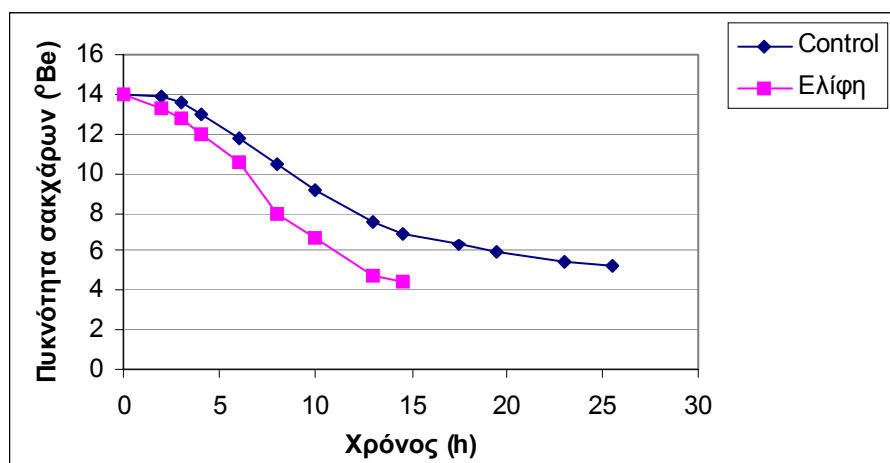
Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζυμώσεων, με πρώτη ύλη διαλύματα μελάσας διαφορετικών αρχικών πυκνοτήτων σακχάρων (12, 14, 16, 18, 20 και 22 °Be). Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα και αναλύονται στα ακόλουθα διαγράμματα.

Πίνακας 1.2.1: Αποτελέσματα των ζυμώσεων σε διαλύματα μελάσας με διαφορετική αρχική πυκνότητα σακχάρων

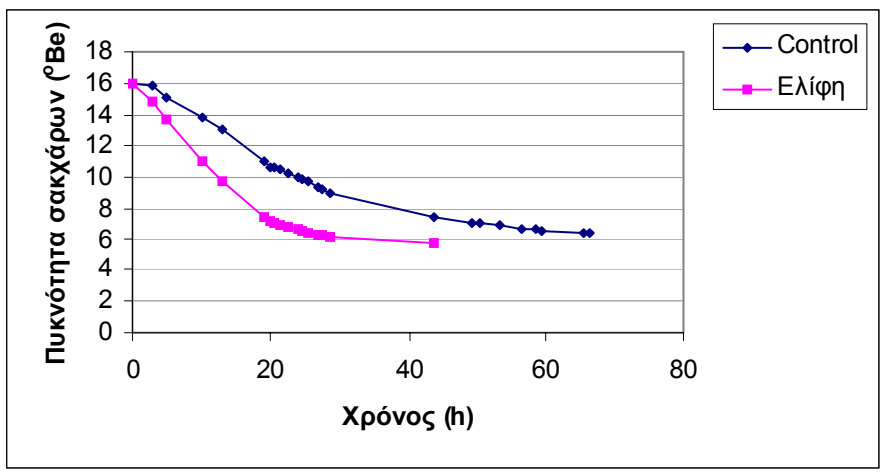
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|---------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|--|--|-----------|-----------|
| Control | 12 | 4 | 14 | 63,99 | 4,571 | 16,8 | 16,6 | 4,69 | 4,78 |
| Ελίφη | 12 | 3,6 | 11 | 65,57 | 5,961 | 16,8 | 15,8 | 4,69 | 4,83 |
| Control | 14 | 5,2 | 25,5 | 69,52 | 2,726 | 16,8 | 17,1 | 4,69 | 4,88 |
| Ελίφη | 14 | 4,5 | 14,5 | 74,26 | 5,121 | 16,8 | 12,9 | 4,69 | 4,90 |
| Control | 16 | 6,4 | 66,5 | 74,26 | 1,117 | 16,8 | 17,8 | 4,69 | 4,98 |
| Ελίφη | 16 | 5,7 | 43,5 | 81,37 | 1,871 | 16,8 | 10,2 | 4,69 | 4,99 |
| Control | 18 | 10,3 | 134,5 | 60,04 | 0,446 | 16,8 | 16,3 | 4,69 | 4,85 |
| Ελίφη | 18 | 6,9 | 98 | 87,69 | 0,895 | 16,8 | 10,5 | 4,69 | 4,90 |
| Control | 20 | 14,3 | 130,5 | 45,03 | 0,345 | 16,8 | 9,8 | 4,69 | 5,04 |
| Ελίφη | 20 | 11,2 | 101,5 | 67,94 | 0,669 | 16,8 | 7 | 4,69 | 5,12 |
| Control | 22 | 16,9 | 138 | 40,29 | 0,292 | 16,8 | 10,8 | 4,69 | 5,15 |
| Ελίφη | 22 | 13,5 | 113,5 | 66,36 | 0,585 | 16,8 | 10,3 | 4,69 | 5,19 |



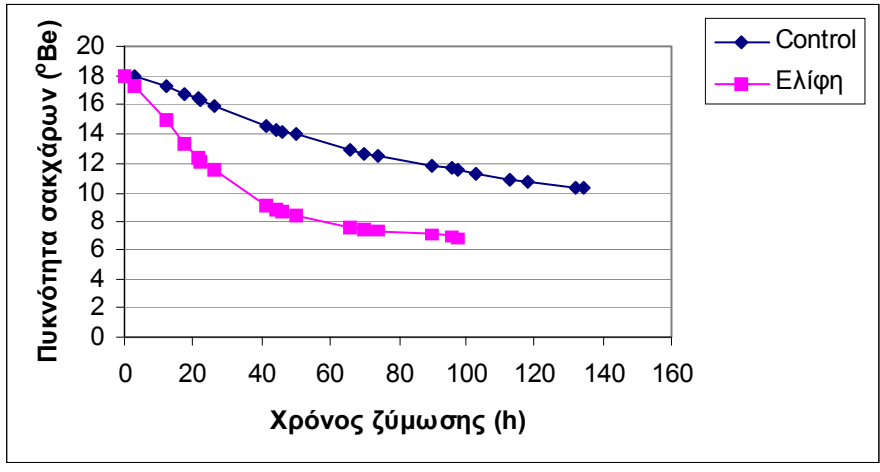
Διάγραμμα 1.2.1: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας πυκνότητας 12 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



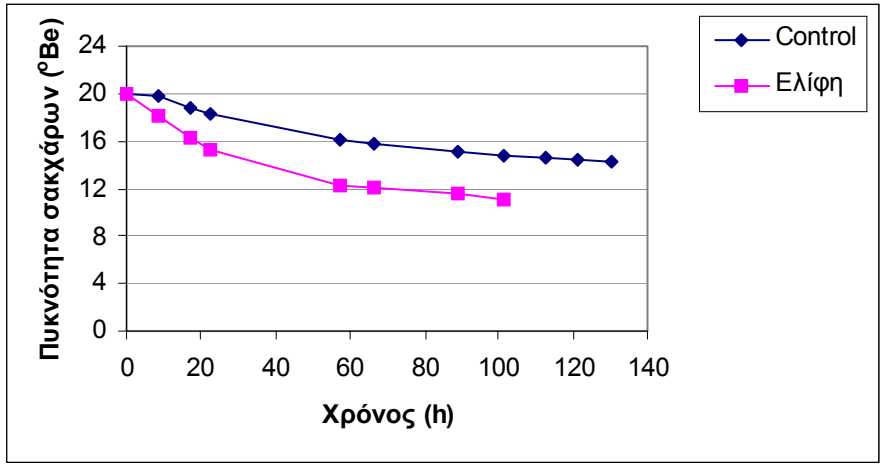
Γράφημα 1.2.2: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας πυκνότητας 14 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



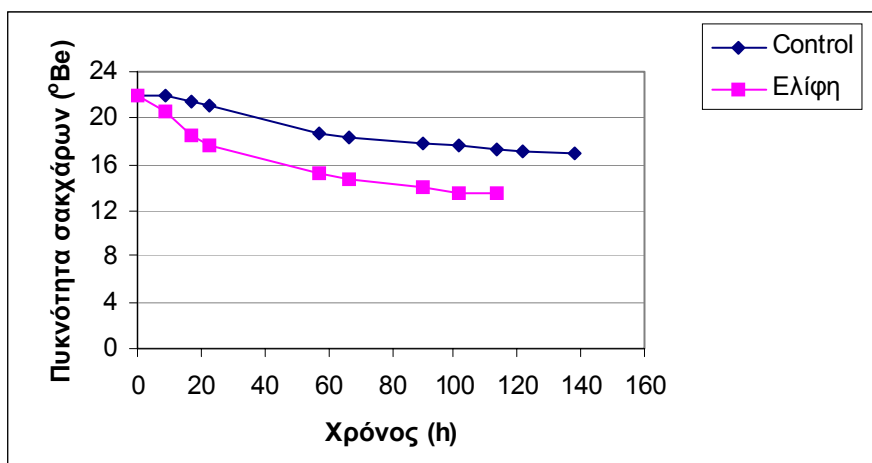
Γράφημα 1.2.3: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας πυκνότητας 16 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



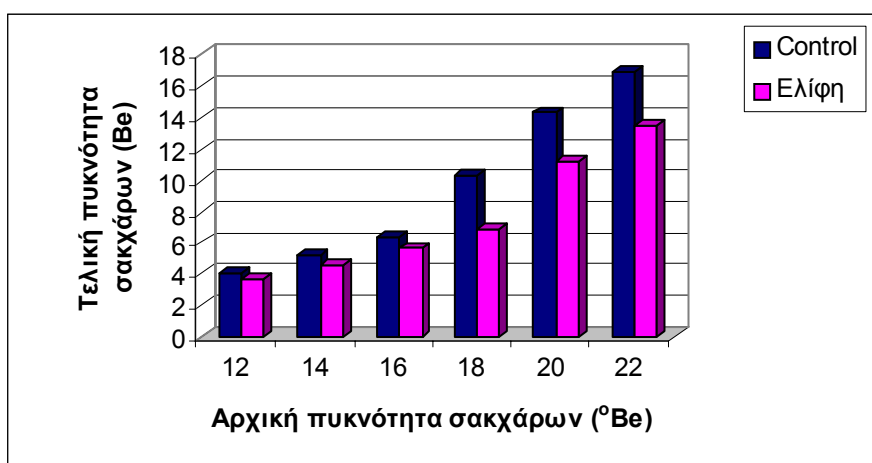
Γράφημα 1.2.4: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας πυκνότητας 18 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



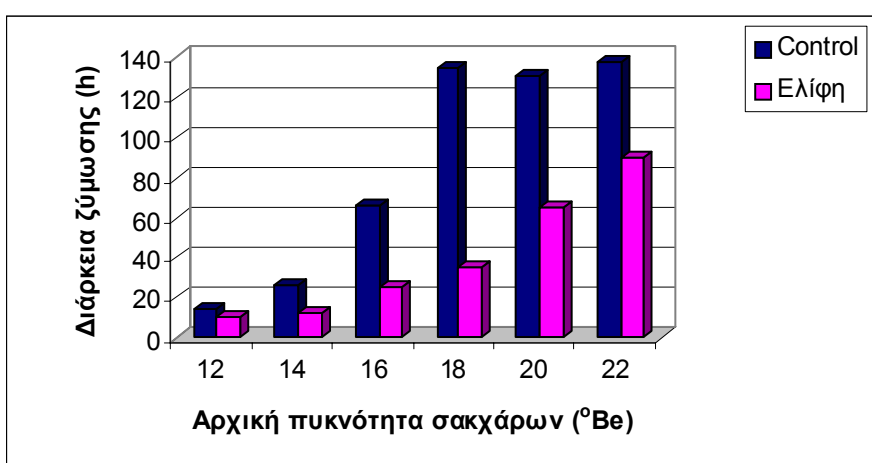
Γράφημα 1.2.5: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας πυκνότητας 20 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



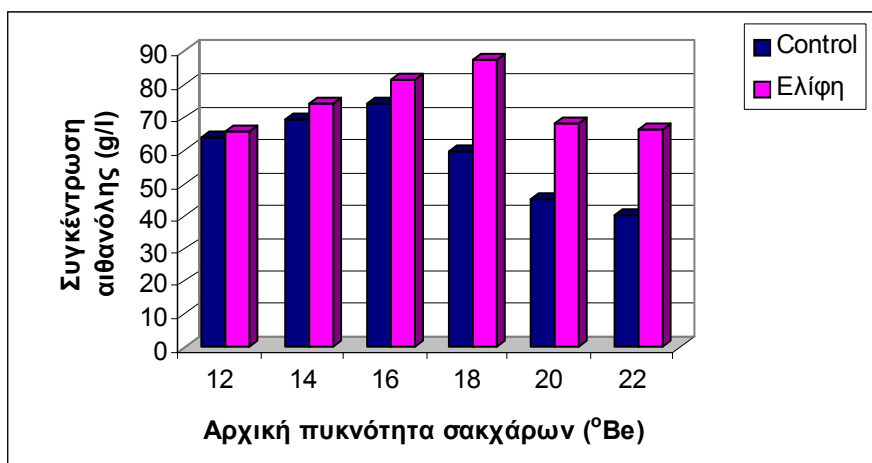
Γράφημα 1.2.6: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας πυκνότητας 22 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης.



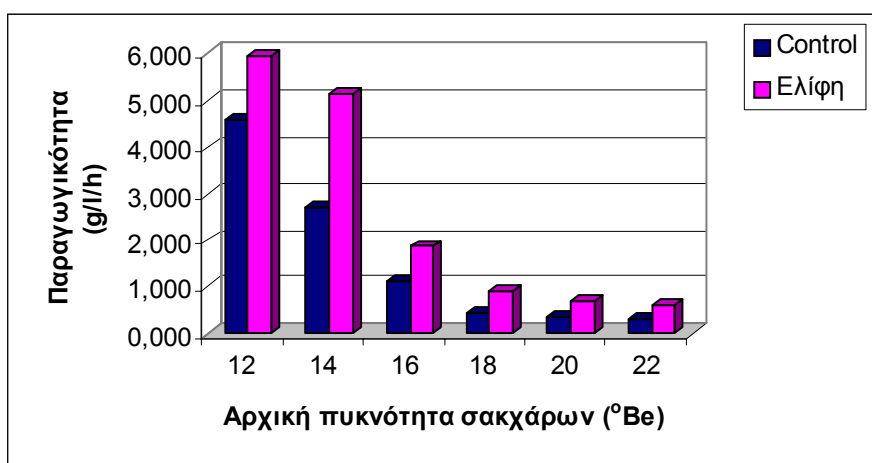
Γράφημα 1.2.7: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες.



Γράφημα 1.2.8: Συγκριτικό διάγραμμα χρόνου ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες σακχάρων.



Γράφημα 1.2.9: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες σακχάρων.



Γράφημα 1.2.10: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές πυκνότητες σακχάρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η παρουσία της ελίφης, όπως και στα πειράματα πρότυπων σακχάρων, επηρέασε θετικά τις αποδόσεις των ζυμώσεων, σε όλες τις περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα:

- ✓ Σε όλες τις περιπτώσεις η πυκνότητα των αζύμωτων σακχάρων παρουσία του φορέα, ήταν μειωμένη σε σχέση με τις ζυμώσεις ελέγχου (απουσία φορέα). Στα αραιά διαλύματα μελάσας (12, 14 και 16 °Be), το φαινόμενο αυτό δεν ήταν τόσο έντονο, αφού και απουσία του φορέα τα κύτταρα καταφέρνουν, έστω και σε μεγαλύτερο χρόνο να αξιοποιούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ζυμώσιμων σακχάρων. Στα πιο πυκνά διαλύματα όμως (18, 20 και 22 °Be) η παρουσία της ελίφης είχε ως αποτέλεσμα την αξιοποίηση κατά 30% περίπου, περισσότερων ζυμώσιμων σακχάρων.
- ✓ Η διάρκεια των ζυμώσεων μειώθηκε σημαντικά παρουσία του φορέα, έως και 43% στα διαλύματα μελάσας 14 °Be.
- ✓ Κατά συνέπεια και η παραγωγικότητα βελτιώθηκε σημαντικά σε όλες τις περιπτώσεις. Η αύξηση της παραγωγικότητας ήταν τουλάχιστον της τάξης του 30 % (12 °Be). Μάλιστα στις

περιπτώσεις των πυκνών διαλυμάτων των 20 και των 22 °Be, η παραγωγικότητα σχεδόν διπλασιάστηκε (93% και 100% αντίστοιχα). Βέβαια η παραγωγικότητα στα πυκνά διαλύματα, αν και αυξήθηκε θεαματικά παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα (περίπου 0,6 g/l/h).

✓ Παρατηρήθηκε επίσης ότι με το τέλος της ζύμωσης παρουσία του φορέα μειώθηκε ο αριθμός των ζυμοκυττάρων, αφού πιθανόν πολλά ελεύθερα κύτταρα μετά το τέλος των ζυμώσεων, παρέμειναν ακινητοποιημένα στην επιφάνεια του φορέα. Το τελευταίο οφείλει να επιβεβαιωθεί με μελέτη τμημάτων του φορέα σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

✓ Το pH του μίγματος ζύμωσης σε αντίθεση με την περίπτωση του μονοσακχαρίτη και του δισακχαρίτη, αυξήθηκε.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ένα ποσοστό των περιεχόμενων στην μελάσα σακχάρων μη ζυμώσιμα (ραφινόζη) από τον συγκεκριμένο ζυμομύκητα, με αποτέλεσμα ακόμα και στα αραιά διαλύματα (12 και 14 °Be) η τελικές πυκνότητες να ήταν υψηλότερες σε σχέση με αυτές των πρότυπων σακχάρων

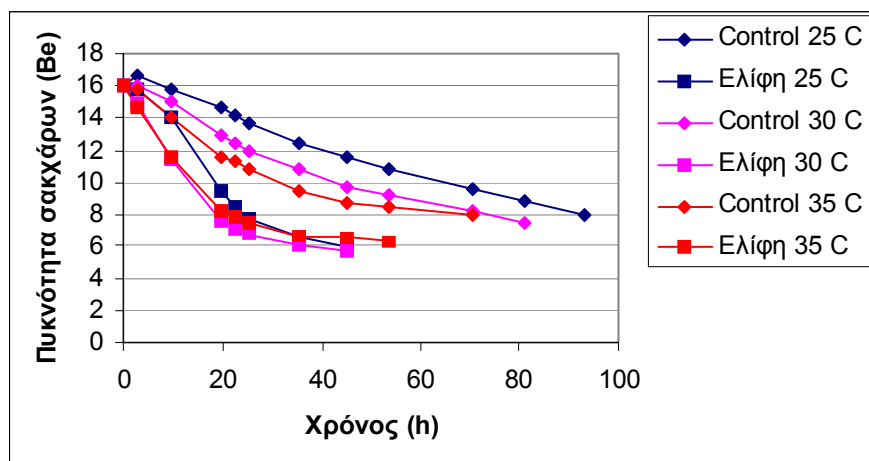
1.3. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Στην επόμενη σειρά πειραμάτων εξετάστηκε η δράση διαφόρων παραγόντων (θερμοκρασία, βιομάζα, ποσότητα φορέα κ.λπ.) στην απόδοση της βιοχημικής διαδικασίας.

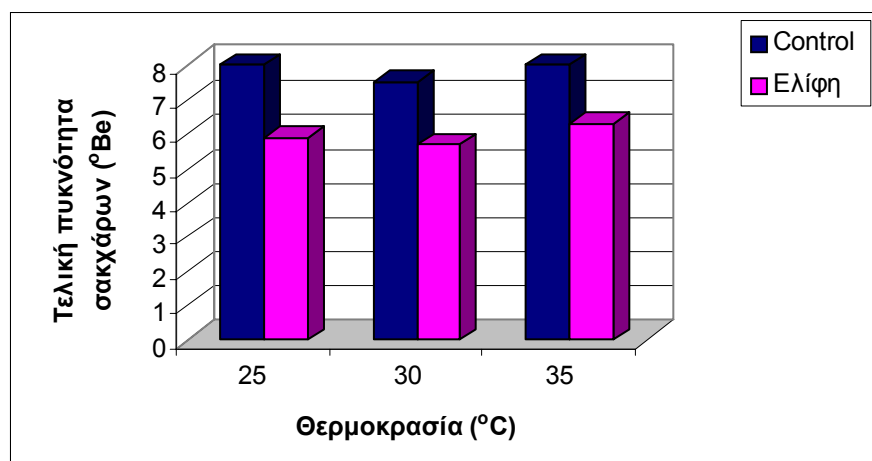
Στην πρώτη ομάδα πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της ελίφης στην ζύμωση σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 30°C και 35°C). Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε διαλύματα μελάσας με αρχική πυκνότητα σακχάρων 16 °Be. Τα αποτελέσματα των ζυμώσεων καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα 1.3.1 και αναλύονται στα ακόλουθα διαγράμματα.

Πίνακας 1.3.1: Αποτελέσματα των ζυμώσεων σε διαλύματα μελάσας απουσία και παρουσία ελίφης, σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

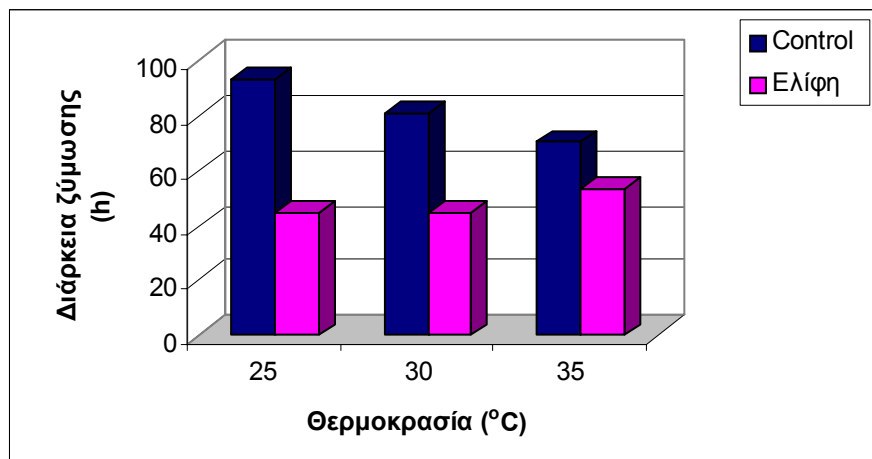
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση η αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|---------------|------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------------|----------------------------|--|--|-----------|-----------|
| Control 25 °C | 16 | 8 | 93 | 61,62 | 0,663 | 16,8 | 16,2 | 4,69 | 4,90 |
| Ελίφη 25 °C | 16 | 5,9 | 45 | 79 | 1,756 | 16,8 | 13,7 | 4,69 | 4,96 |
| Control 30 °C | 16 | 7,5 | 81 | 67,94 | 0,839 | 16,8 | 18,7 | 4,69 | 4,86 |
| Ελίφη 30 °C | 16 | 5,7 | 45 | 82,95 | 1,843 | 16,8 | 8,3 | 4,69 | 5,01 |
| Control 35 °C | 16 | 8 | 70,5 | 61,62 | 0,874 | 16,8 | 12 | 4,69 | 4,99 |
| Ελίφη 35 °C | 16 | 6,3 | 53,5 | 76,63 | 1,432 | 16,8 | 6,7 | 4,69 | 5,04 |



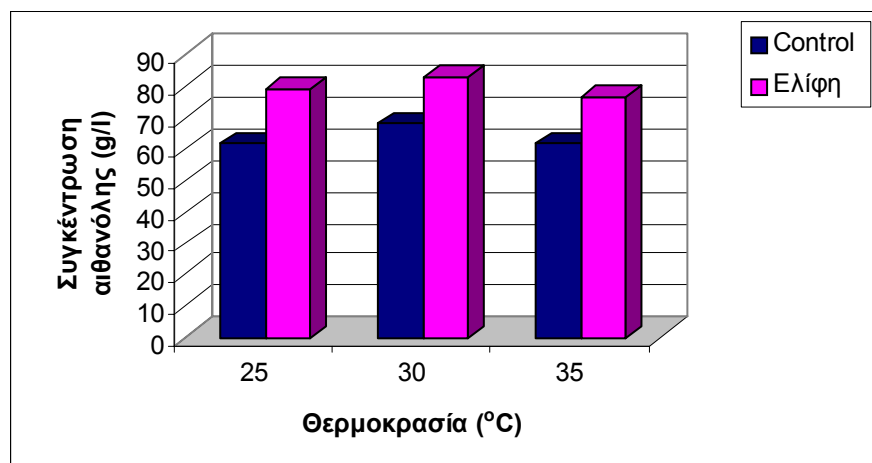
Γράφημα 1.3.1: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 16 °Be απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.



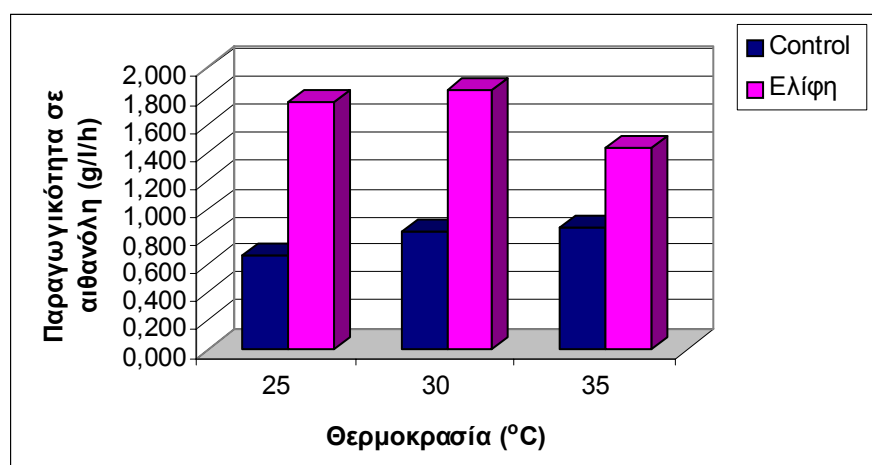
Γράφημα 1.3.2: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.



Γράφημα 1.3.3: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.



Γράφημα 1.3.4: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.



Γράφημα 1.3.5: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

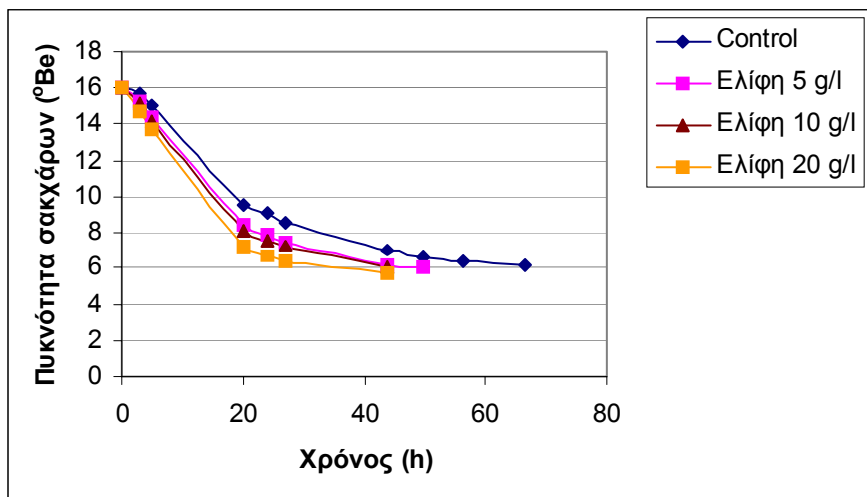
Όπως ήδη έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, έχει διαπιστωθεί από μεγάλο αριθμό ερευνητών, ότι ο ρυθμός ζύμωσης αυξάνει με την άνοδο της θερμοκρασίας μέχρι μιας μέγιστης τιμής γύρω στους 30°C. Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει τους ρυθμούς ζύμωσης [Roukas, 1995]. Όπως φαίνεται στο γράφημα 3.1, απουσία της ελίφης οι μεγαλύτεροι ρυθμοί ζύμωσης παρατηρήθηκαν στους 35 °C, χωρίς όμως οι παραγωγικότητες στους 30 και στους 35 °C, να διαφέρουν σημαντικά. Παρουσία της ελίφης οι μεγαλύτεροι ρυθμοί ζύμωσης και οι υψηλότερες παραγωγικότητες, σημειώθηκαν στους 30 °C και διέφεραν σημαντικά από αυτές των 35 °C, αλλά όχι και από αυτές των 25 °C. Συμπερασματικά από τα ανώτερα πειράματα προκύπτει ότι η παρουσία της ελίφης βελτίωσε τις αποδόσεις των ζυμώσεων και στις τρεις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την θετική δράση του φορέα στην απόδοση της αντίδρασης σε όλο το εύρος μεταβολικής δράσης των κυττάρων του χρησιμοποιούμενου βιοκαταλύτη.

1.4. ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΟΣΟΤΗΤΩΝ ΕΛΙΦΗΣ

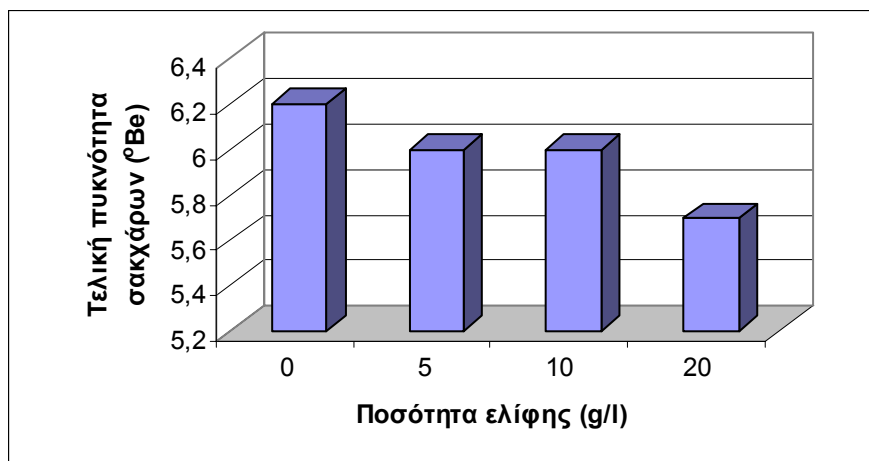
Η ποσότητα της ελίφης που χρησιμοποιήθηκε στην πλειοψηφία των πειραμάτων, ήταν 20 g/l. Η ποσότητα αυτή υπολογίστηκε με βάση το κατά προσέγγιση εμβαδόν της επιφάνειας των τεμαχίων της ελίφης που ήταν περίπου 750 cm². Το συγκεκριμένο εμβαδόν έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν και σε μελέτες άλλων φορέων ακινητοποίησης. Επιπλέον η συγκεκριμένη ποσότητα ελίφης, ήταν τέτοια ώστε ο φορέας να περιέχεται ολόκληρος εντός του όγκου του θρεπτικού υλικού. Σε αυτήν την ομάδα πειραμάτων μελετήθηκε η συμπεριφορά της ελίφης όταν χρησιμοποιηθεί αυτή σε μικρότερες ποσότητες, προκειμένου να προσδιοριστεί η άριστη ελάχιστη ποσότητα χρήσης της. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε διαλύματα μελάσας 16 °Be, απουσία ελίφης και παρουσία ελίφης σε ποσότητες 20, 10 και 5 g/l. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα 1.4.1 και στα ακόλουθα γραφήματα.

Πίνακας 1.4.1: Αποτελέσματα των ζυμώσεων σε διαλύματα μελάσας απουσία και παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων ελίφης.

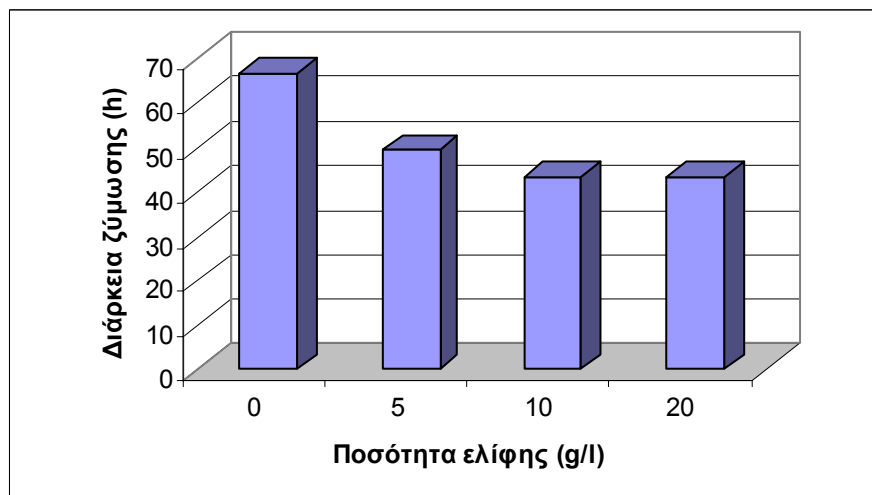
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|--------------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|--|--|-----------|-----------|
| Control | 16 | 6,2 | 66,5 | 75,05 | 1,129 | 16,8 | 21,2 | 4,69 | 5,07 |
| Ελίφη 5 g/l | 16 | 6 | 49,5 | 77,42 | 1,564 | 16,8 | 6,9 | 4,69 | 5,04 |
| Ελίφη 10 g/l | 16 | 6 | 43,5 | 77,42 | 1,780 | 16,8 | 10,7 | 4,69 | 5,04 |
| Ελίφη 20 g/l | 16 | 5,7 | 43,5 | 80,58 | 1,852 | 16,8 | 13 | 4,69 | 5,06 |



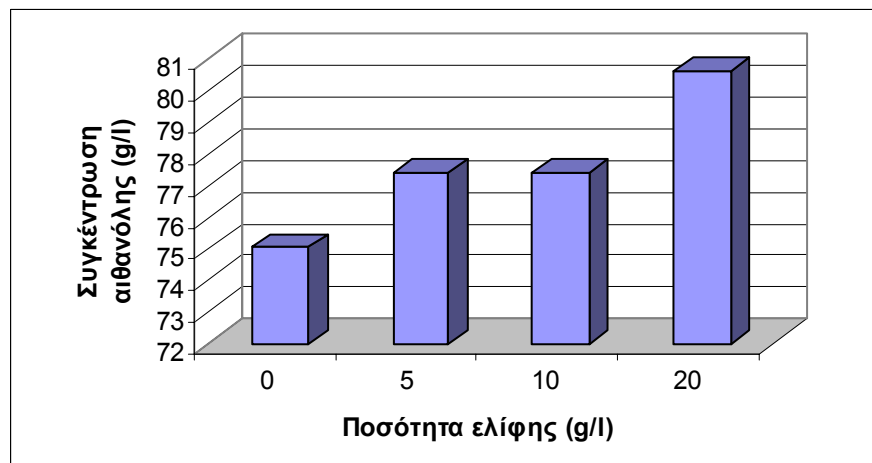
Γράφημα 1.4.1: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 16 °Be, απουσία και παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων ελίφης.



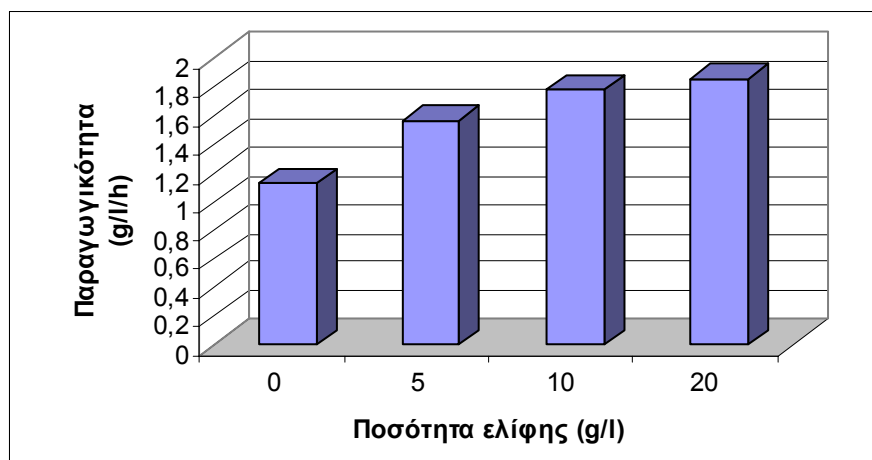
Γράφημα 1.4.2: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων ελίφης.



Γράφημα 1.4.3: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης, απουσία και παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων ελίφης.



Γράφημα 1.4.4: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης, απουσία και παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων ελίφης.



Γράφημα 1.4.5: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία διαφορετικών ποσοτήτων ελίφης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρουσία της ελίφης, ακόμα και στην ελάχιστη ποσότητα (5 g/l), αποδείχθηκε ικανή να αυξήσει τις αποδόσεις των ζυμώσεων. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία 5 g/l ελίφης η διάρκεια της ζύμωσης μειώθηκε περίπου κατά 25% και η παραγωγικότητα αυξήθηκε σημαντικά (38 %).

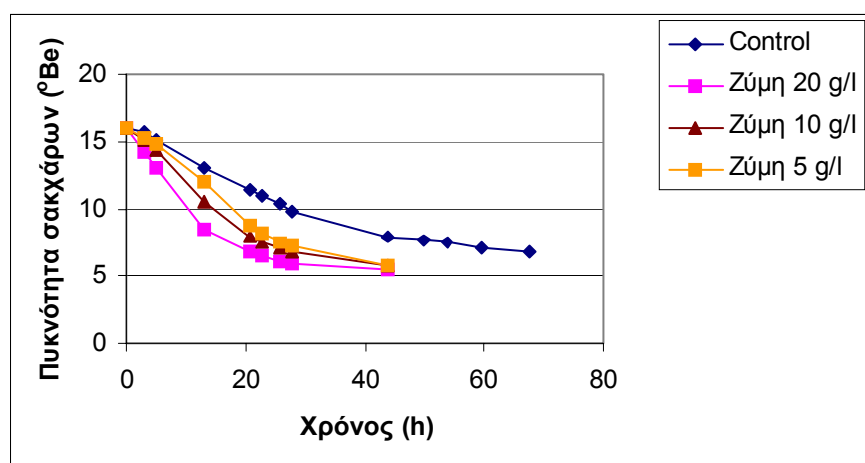
Συγκρίνοντας την απόδοση του βιοαντιδραστήρα με τη χρήση διαφορετικών ποσοτήτων ελίφης φαίνεται πως η βελτίωση των αποδόσεων των ζυμώσεων είναι ανάλογη της ποσότητας του χρησιμοποιούμενου φορέα. Ο μέγιστος ρυθμός ζύμωσης και η μέγιστη παραγωγικότητα καταγράφηκαν παρουσία 20 g/l ελίφης.

1.5. ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΕΛΙΦΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

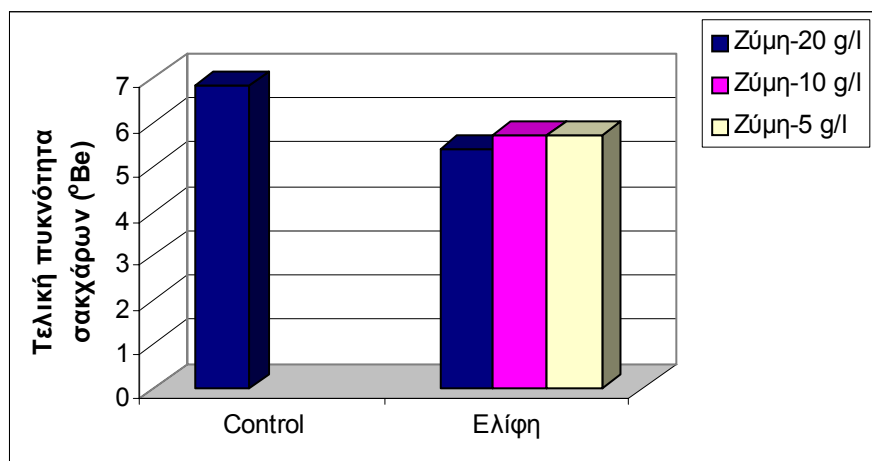
Η επόμενη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν εκείνη της βιομάζας. Η ποσότητα της ζύμης που χρησιμοποιήθηκε στην πλειοψηφία των πειραμάτων ήταν 20 g/l, δηλαδή περίπου $16,8 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml. Η συγκεκριμένη ποσότητα επιλέχθηκε με βάση βιβλιογραφικές αναφορές και είναι αυτή που χρησιμοποιείται στην ερευνητική ομάδα, ώστε να προκύπτουν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Στην παρούσα ομάδα πειραμάτων μελετήθηκε κατά πόσο η παρουσία της ελίφης μπορεί να αυξήσει την παραγωγικότητα των ζυμώσεων, με ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης των κυττάρων. Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις παρουσία ελίφης με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων και συγκρίθηκαν με ζυμώσεις απουσία ελίφης και με συγκέντρωση κυττάρων 20 g/l. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα. 1.5.1 και αναλύονται στα ακόλουθα γραφήματα.

Πίνακας 1.5.1: Αποτελέσματα ζυμώσεων σε διαλύματα μελάσας απουσία και παρουσία ελίφης, με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων.

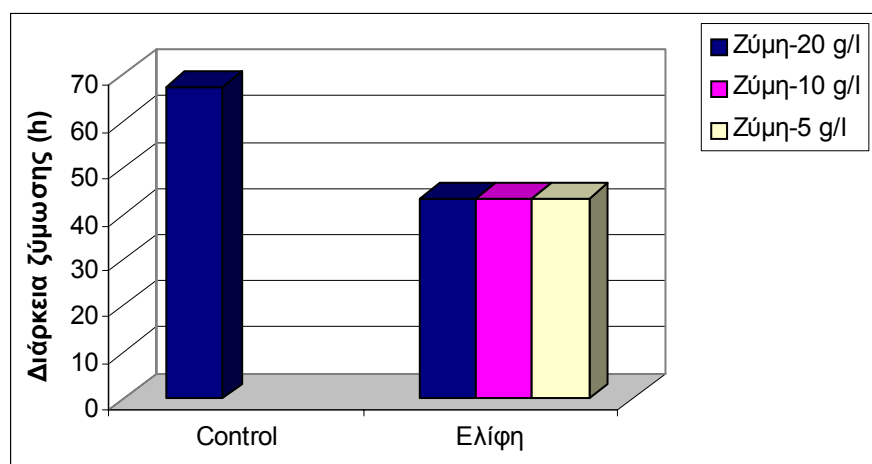
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα ($\cdot 10^6$ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα ($\cdot 10^6$ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|---------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|
| Control | 16 | 6,8 | 67,5 | 71,1 | 1,053 | 16,8 | 16,2 | 4,69 | 5,01 |
| Ελίφη | 16 | 5,4 | 43,5 | 84,53 | 1,943 | 16,8 | 12,3 | 4,69 | 5,09 |
| Ελίφη | 16 | 5,7 | 43,5 | 79,79 | 1,834 | 8,4 | 5,6 | 4,69 | 5,04 |
| Ελίφη | 16 | 5,7 | 43,5 | 79 | 1,816 | 4,2 | 4 | 4,69 | 5,01 |



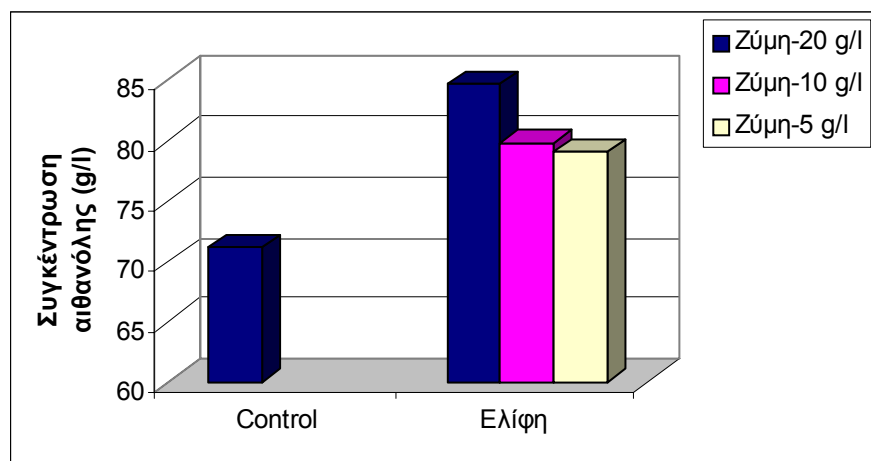
Γράφημα 1.5.1: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 16 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων.



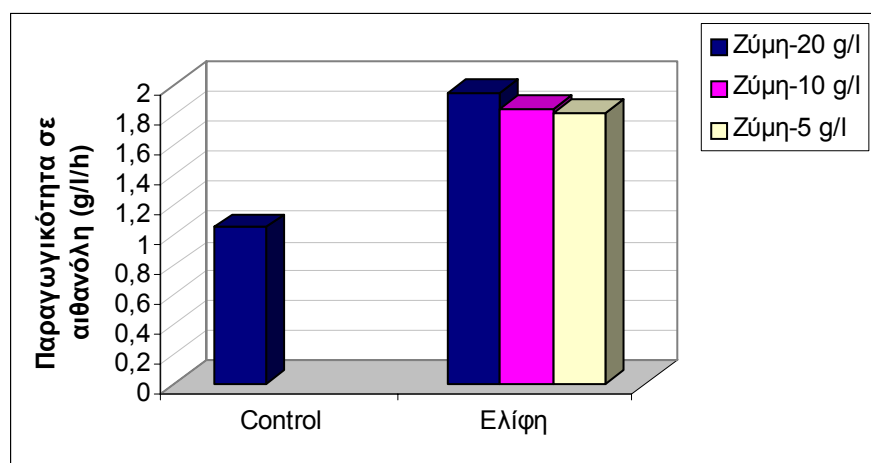
Γράφημα 1.5.2: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων.



Γράφημα 1.5.3: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων.



Γράφημα 1.5.4: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης, απουσία και παρουσία ελίφης και σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων.



Γράφημα 1.5.5: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία ελίφης, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κυττάρων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρυθμός της ζύμωσης παρουσία της ελίφης ήταν σημαντικά βελτιωμένος σε όλες τις περιπτώσεις, ανεξάρτητα από την ποσότητα της βιομάζας. Ακόμα και στη περίπτωση προσθήκης της ελάχιστης βιομάζας (5 g/l), η παραγωγικότητα σε σχέση με την ζύμωση ελέγχου (απουσία ελίφης και βιομάζα 20 g/l), αυξήθηκε περίπου κατά 70%. Ανάμεσα στις ζυμώσεις παρουσία ελίφης αυτή με την μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση κυττάρων φάνηκε να υπερτερεί έναντι των άλλων δύο, αλλά χωρίς σημαντικές διαφορές. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι στην ελάχιστη προσθήκη βιομάζας η ακινητοποίηση στο φορέα ουσιαστικά μηδενίζεται.

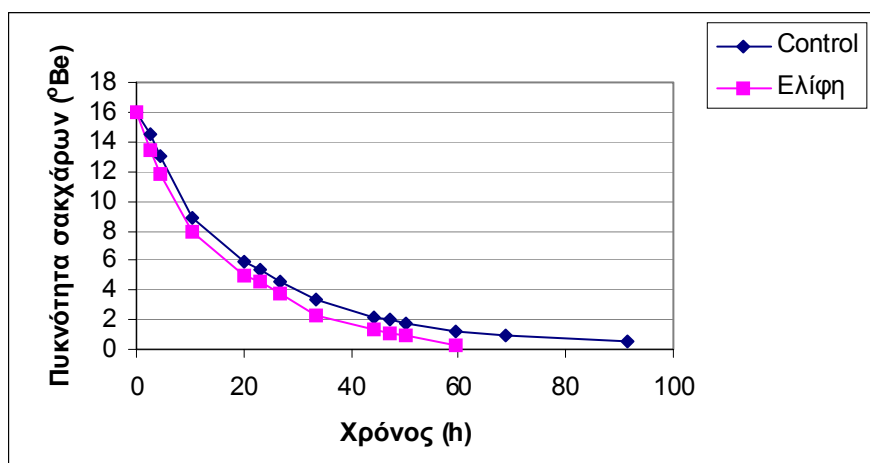
1.6. ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΟΡΓΟ ΚΑΙ ΣΤΑΦΙΔΑ, ΑΠΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΕΛΙΦΗΣ

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η μελάσα είναι μια πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην παραγωγή αιθανόλης και εμφανίζει υψηλές αποδόσεις. Ωστόσο η εκμετάλλευση νέων πηγών σακχάρων είναι ένας τομέας που διαρκώς εξελίσσεται. Δύο πρώτες ύλες που έχουν μελετηθεί για την παραγωγή αιθανόλης είναι το γλυκό σόργο και η σταφίδα. Παρουσιάζουν και οι δύο υψηλές αποδόσεις σε αλκοόλη και είναι σημαντικές για

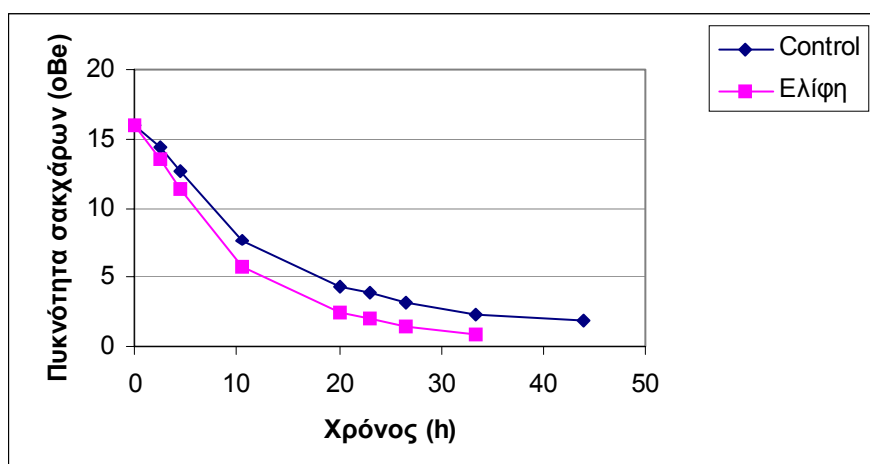
τον Ελλαδικό χώρο. Σε αυτή την ομάδα πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση της ελίφης σε ζυμώσεις εκχυλισμάτων σόργου και σταφίδας.

Πίνακας 1.6.1: Αποτελέσματα ζυμώσεων σε εκχυλίσματα σόργου και σταφίδας 16°Be , απουσία και παρουσία ελίφης.

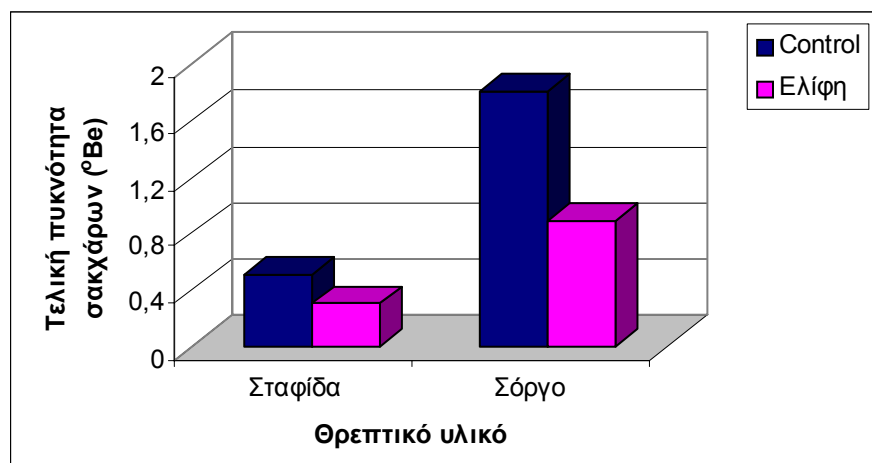
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα ($^{\circ}\text{Be}$) | Τελική πυκνότητα ($^{\circ}\text{Be}$) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα ($\cdot 10^6$ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα ($\cdot 10^6$ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|-----------------|--|--|--------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|
| Σταφίδα-Control | 16 | 0,5 | 91,5 | 120,87 | 1,321 | 16,8 | 22 | 4,69 | 3,61 |
| Σταφίδα-Ελίφη | 16 | 0,3 | 59,5 | 123,24 | 2,071 | 16,8 | 14,8 | 4,69 | 3,59 |
| Σόργο-Control | 16 | 1,8 | 44 | 112,18 | 2,550 | 16,8 | 18,2 | 4,69 | 4,20 |
| Σόργο-Ελίφη | 16 | 0,9 | 33,5 | 120,08 | 3,584 | 16,8 | 22,2 | 4,69 | 4,07 |



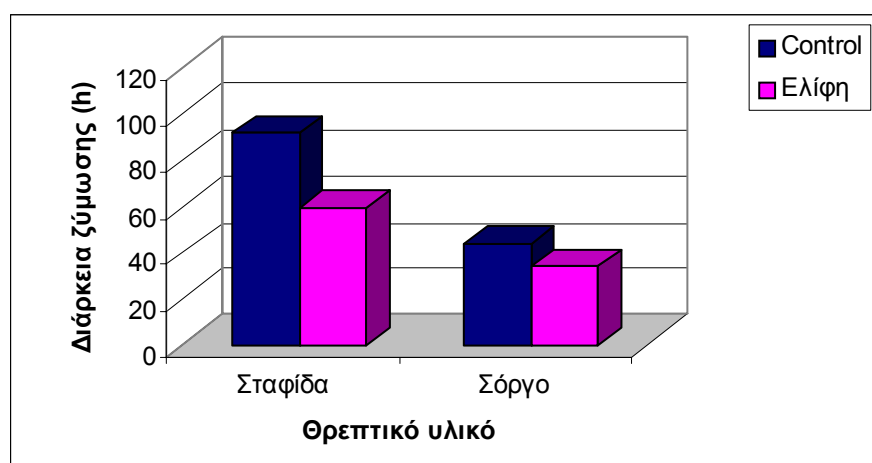
Γράφημα 1.6.1: Κινητική ζύμωσης εκχυλίσματος σταφίδας 16°Be , απουσία και παρουσία ελίφης.



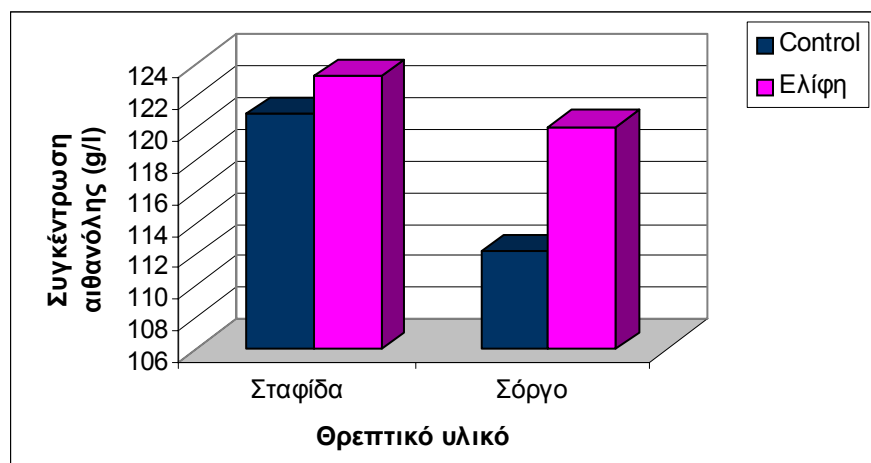
Γράφημα 1.6.2: Κινητική ζύμωσης εκχυλίσματος σόργου 16°Be , απουσία και παρουσία ελίφης.



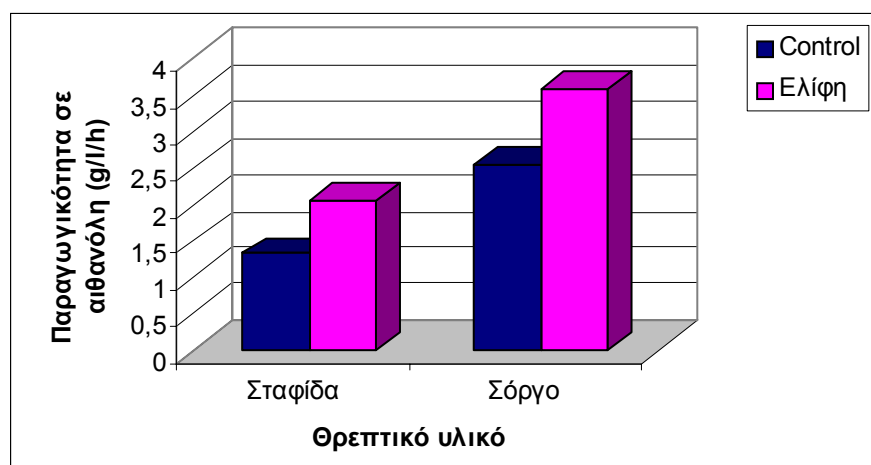
Γράφημα 1.6.3: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης, στα δυο θρεπτικά μέσα.



Γράφημα 1.6.4: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης, απουσία και παρουσία ελίφης και στα δυο θρεπτικά μέσα.



Γράφημα 1.6.5: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης, απουσία και παρουσία ελίφης και στα δυο θρεπτικά μέσα.



Γράφημα 1.6.6: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία ελίφης και στα δυο θρεπτικά μέσα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως και στις περιπτώσεις των πρότυπων σακχάρων και της μελάσας, έτσι και στο σόργο και την σταφίδα, η παρουσία της ελίφης βελτίωσε σημαντικά τις κινητικές των ζυμώσεων. Οι χρόνοι ζύμωσης αλλά και η ποσότητα των αζύμων σακχάρων μειώθηκαν σημαντικά. Το σημαντικότερο όμως είναι ότι η παραγωγικότητα σε σχέση με το control αυξήθηκε στην περίπτωση της σταφίδας κατά 55% και σ' εκείνη του σόργου κατά 40%.

Οι τελικές συγκεντρώσεις της αλκοόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με αυτές που απέδωσαν οι αντίστοιχες ζυμώσεις σε διαλύματα μελάσας. Σε όλες τις περιπτώσεις η παραγωγή αιθανόλης ήταν ιδιαίτερα σημαντική, της τάξης των 110-120 g/l.

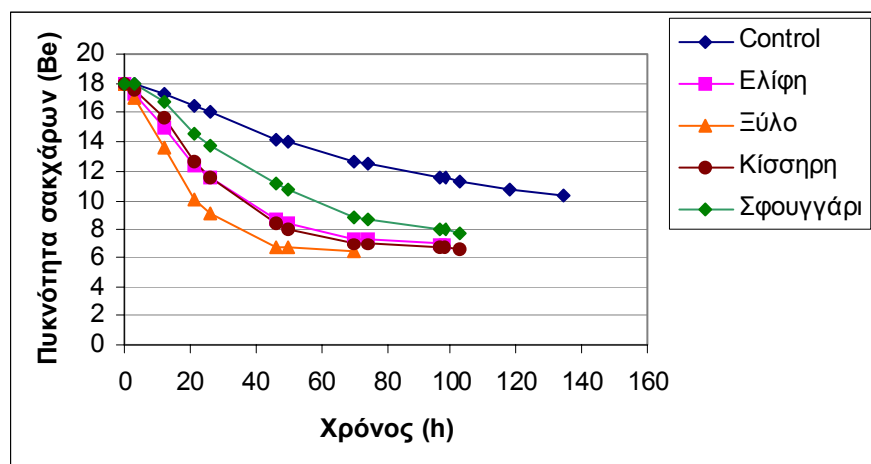
1.7. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΛΙΦΗΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Στην συγκεκριμένη ομάδα πειραμάτων, έγινε μια συγκριτική μελέτη ανάμεσα στην ελίφη και σε τρεις άλλους φορείς ακινητοποίησης οι οποίοι έχουν μελετηθεί από την

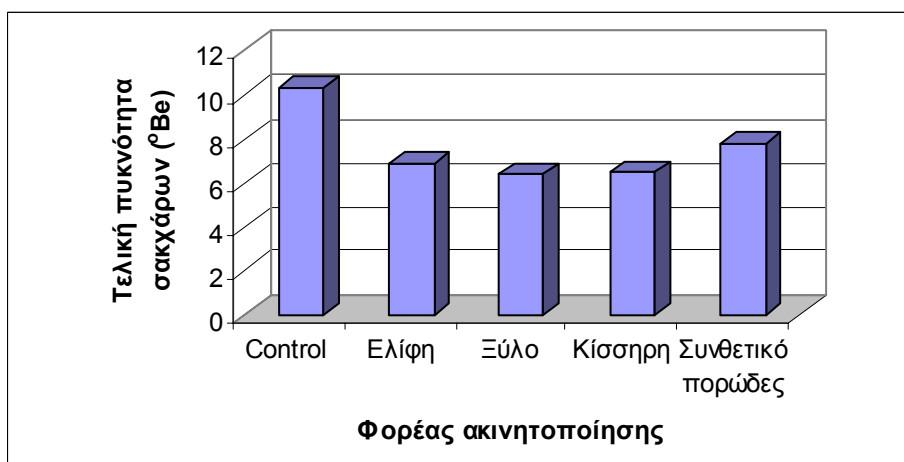
ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου και έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα. Οι φορείς αυτοί ήταν τεμάχια ξύλου, κίσηρης και συνθετικού πορώδους υλικού. Στον πίνακα 1.7.1 καταγράφονται τα αποτελέσματα και αναλύονται στα γραφήματα που ακολουθούν.

Πίνακας 1.7.1: Αποτελέσματα ζυμώσεων σε διαλύματα μελάσας 16 °Be, απουσία και παρουσία ελίφης, ξύλου, κίσηρης και σφουγγαριού.

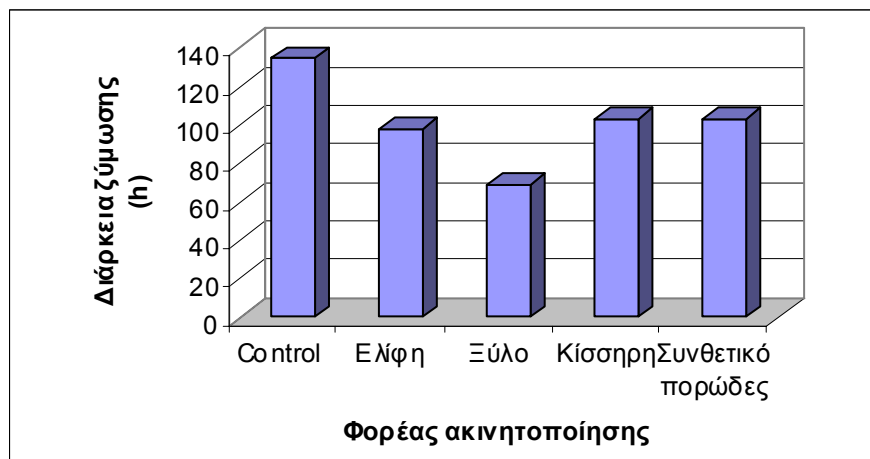
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|-------------------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|--|--|-----------|-----------|
| Control | 18 | 10,3 | 134,5 | 60,04 | 0,446 | 16,8 | 16,3 | 4,69 | 4,85 |
| Ελίφη | 18 | 6,9 | 98 | 87,69 | 0,895 | 16,8 | 10,5 | 4,69 | 4,89 |
| Ξύλο | 18 | 6,4 | 69 | 90,06 | 1,305 | 16,8 | 16,6 | 4,69 | 4,88 |
| Κίσηρη | 18 | 6,5 | 103 | 88,48 | 0,859 | 16,8 | 12 | 4,69 | 4,95 |
| Συνθετικό πορώδες | 18 | 7,8 | 103 | 79,79 | 0,775 | 16,8 | 8,4 | 4,69 | 4,94 |



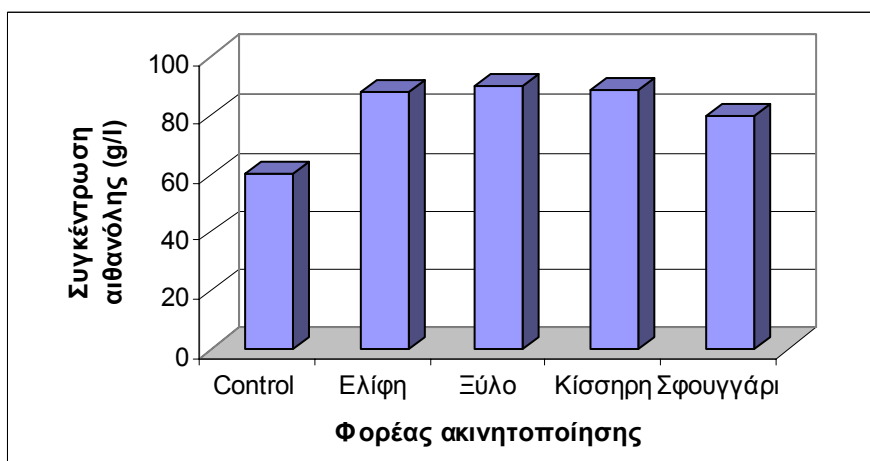
Γράφημα 1.7.1: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 18 °Be απουσία και παρουσία των τεσσάρων φορέων.



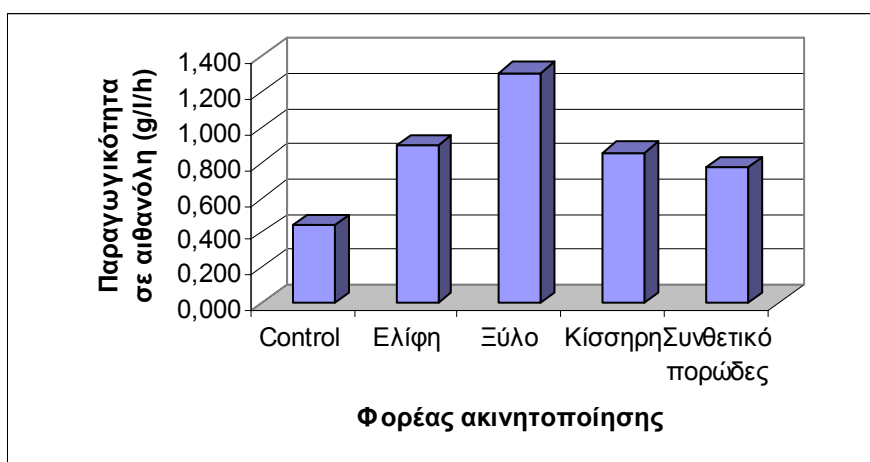
Γράφημα 1.7.2: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία των τεσσάρων φορέων.



Γράφημα 1.7.3: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης, απουσία και παρουσία των τεσσάρων φορέων.



Γράφημα 1.7.4: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης, απουσία και παρουσία των τεσσάρων φορέων.



Γράφημα 1.7.5: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία των τεσσάρων φορέων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως συμπεραίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα η παρουσία και των τεσσάρων φορέων ήταν καταλυτική και η παραγωγικότητα των ζυμώσεων αυξήθηκε σημαντικά. Συγκρίνοντας τις επιδόσεις των τριών φορέων με την ελίφη, το ξύλο φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματικό, η κίσηρη ήταν στο ίδιο περίπου επίπεδο και το συνθετικό πορώδες ήταν το λιγότερο αποτελεσματικό από όλα. Αξίζει όμως να σημειωθεί πως αν και το ξύλο έδωσε καλύτερα αποτελέσματα είναι πολύ πιο δύσκολο στον χειρισμό απ' ότι η ελίφη. Η ελίφη είναι πολύ πιο ελαφριά και συνεπώς μπορεί να εφαρμοστεί πολύ πιο εύκολα σε έναν βιομηχανικό αντιδραστήρα. Επιπλέον ο φορέας ελίφη πλεονεκτεί τόσο του οργανικού (ξύλο) όσο και του ανόργανου (κίσηρη) καθώς το διάτρητο της μάζας του δεν απασχολεί λειτουργικό χώρο του βιοαντιδραστήρα.

1.8. ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ

Από τα έως τώρα αποτελέσματα είναι σαφές πως η παρουσία της ελίφης μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την διαδικασία παραγωγής βιοαιθανόλης. Ο φορέας αυτός είναι επίσης μη τοξικός, ελαφρύς, εύχρηστος και η διάταξη της δομής του δεν εμποδίζει την απομάκρυνση του CO₂, αλλά και δεν απασχολεί παρά ελάχιστο ποσοστό της χωρητικότητας του ζυμωτήρα. Στην προσπάθεια όμως της μέγιστης μείωσης του κόστους παραγωγής, ενδιαφέρον παρουσιάζει η σταθερότητα και η βιωσιμότητα του φορέα, δηλαδή κατά πόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς να αλλοιωθεί και παρέχοντας την ίδια ενεργητική δράση. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δυο σειρές πειραμάτων.

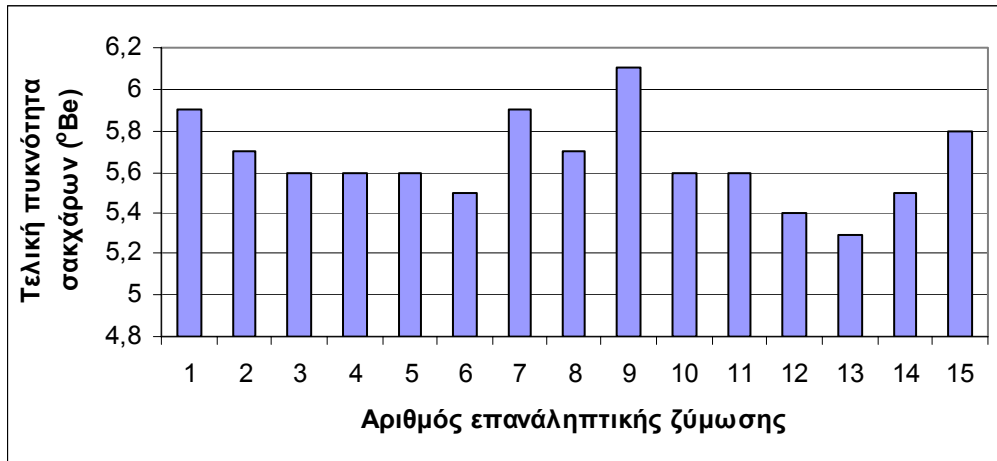
1.8.1. Επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις με τη χρήση του ίδιου φορέα και την προσθήκη βιομάζας.

Στην πρώτη ομάδα πειραμάτων και για δεκαπέντε διαδοχικές ζυμώσεις χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος φορέας και προστέθηκε 20 g/l μόνο καινούργια βιομάζα. Πριν από κάθε καινούρια ζύμωση τα ακινητοποιημένα στην ελίφη κύτταρα απομακρύνονταν μετά από κατεργασία με H₂O θερμοκρασίας 90-100 °C για 15'.

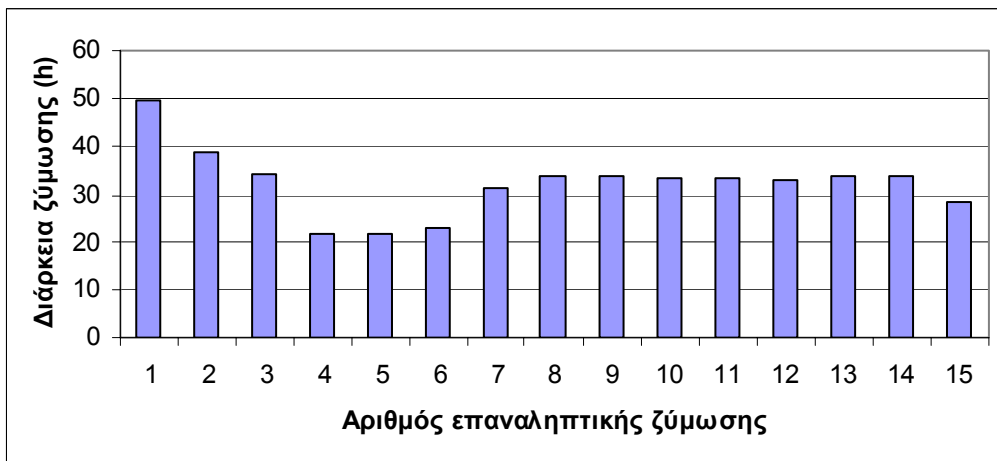
Πίνακας 1.8.1: Αποτελέσματα επαναλαμβανόμενων ζυμώσεων με τη χρήση του ίδιου φορέα και την προσθήκη βιομάζας.

| Αριθμός επαναληπτικής ζύμωσης | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|--|--|-----------|-----------|
| 1 | 16 | 5,9 | 49,5 | 81,37 | 1,644 | 16,8 | 11,7 | 4,69 | 4,99 |
| 2 | 16 | 5,7 | 39 | 80,58 | 2,066 | 16,8 | 16,7 | 4,69 | 5,10 |
| 3 | 16 | 5,6 | 34,5 | 81,37 | 2,359 | 16,8 | 10,6 | 4,69 | 5,15 |
| 4 | 16 | 5,6 | 21,5 | 80,58 | 3,748 | 16,8 | 15,9 | 4,69 | 5,12 |
| 5 | 16 | 5,6 | 22 | 81,37 | 3,699 | 16,8 | 10,2 | 4,69 | 5,10 |
| 6 | 16 | 5,5 | 23 | 82,95 | 3,607 | 16,8 | 11,6 | 4,69 | 5,13 |
| 7 | 16 | 5,9 | 31,5 | 77,42 | 2,458 | 16,8 | 10,2 | 4,69 | 5,12 |
| 8 | 16 | 5,7 | 34 | 79,79 | 2,347 | 16,8 | 13,9 | 4,69 | 5,13 |
| 9 | 16 | 6,1 | 34 | 78,21 | 2,300 | 16,8 | 14,8 | 4,69 | 5,16 |
| 10 | 16 | 5,6 | 33,5 | 80,58 | 2,405 | 16,8 | 9,1 | 4,69 | 5,13 |
| 11 | 16 | 5,6 | 33,5 | 82,16 | 2,453 | 16,8 | 13,7 | 4,69 | 5,13 |

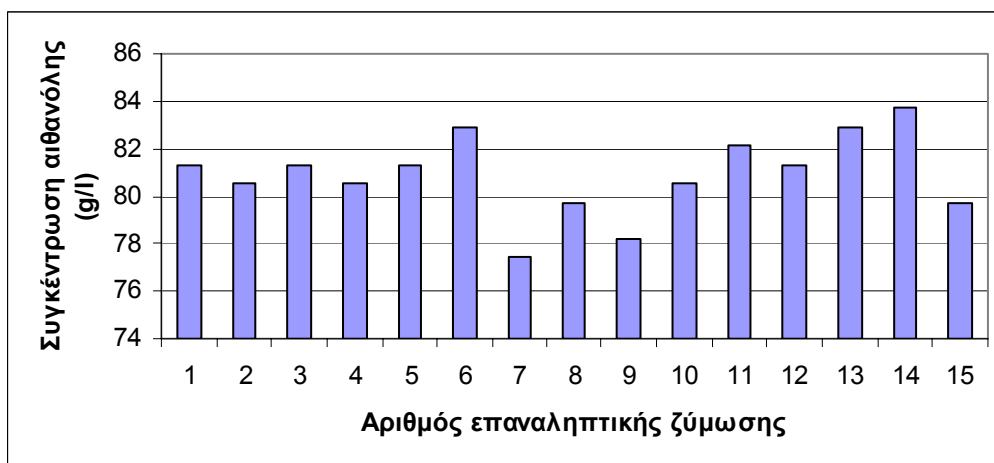
| | | | | | | | | | |
|----|----|-----|------|-------|-------|------|------|------|------|
| 12 | 16 | 5,4 | 33 | 81,37 | 2,466 | 16,8 | 11,2 | 4,69 | 5,14 |
| 13 | 16 | 5,3 | 34 | 82,95 | 2,440 | 16,8 | 13 | 4,69 | 5,15 |
| 14 | 16 | 5,5 | 34 | 83,74 | 2,463 | 16,8 | 11,9 | 4,69 | 5,21 |
| 15 | 16 | 5,8 | 28,5 | 79,79 | 2,800 | 16,8 | 12,5 | 4,69 | 5,19 |



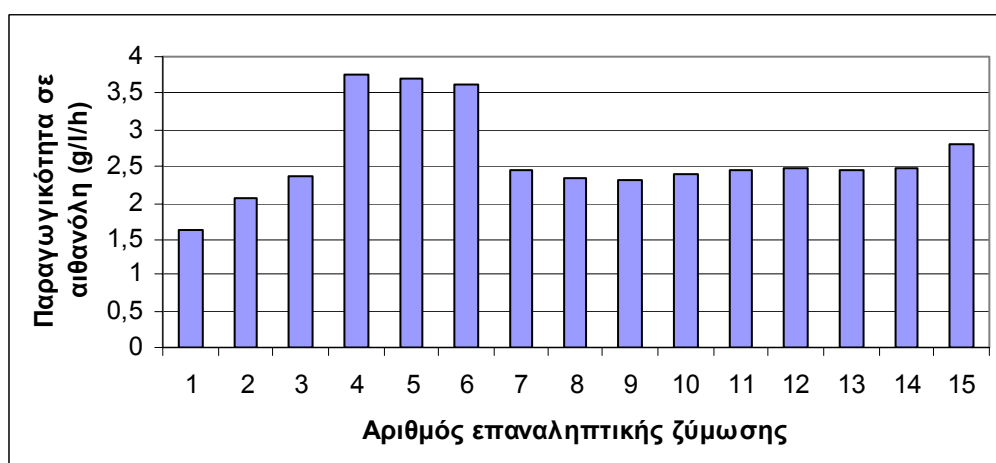
Γράφημα 1.8.1: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης των επαναλαμβανόμενων παρτίδων με τον ίδιο φορέα.



Γράφημα 1.8.2: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης κάθε παρτίδας με τη χρήση του ίδιου φορέα.



Γράφημα 1.8.3: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης κάθε παρτίδας της επαναλαμβανόμενης σειράς.



Γράφημα 1.8.4: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη κάθε πειράματος ζύμωσης κατά την επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου φορέα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παραγωγικότητα αλλά και οι άλλοι παράμετροι των επαναλαμβανόμενων ζυμώσεων με την χρήση του ίδιου φορέα παρέμειναν σχεδόν σταθερές και δεν φάνηκε να μεταβάλλονται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου (περίπου 500 ώρες ζύμωσης). Το pH του μίγματος σε όλες τις επαναληπτικές ζυμώσεις αυξήθηκε σε σχέση με την πρώτη στην οποία ο φορέας δεν είχε ξαναχρησιμοποιηθεί.

1.8.2. Επαναλαμβανόμενες ζυμώσεις με τη χρήση του ίδιου φορέα και των ακινητοποιημένων σε αυτόν κύτταρων χωρίς προσθήκη νέας βιομάζας

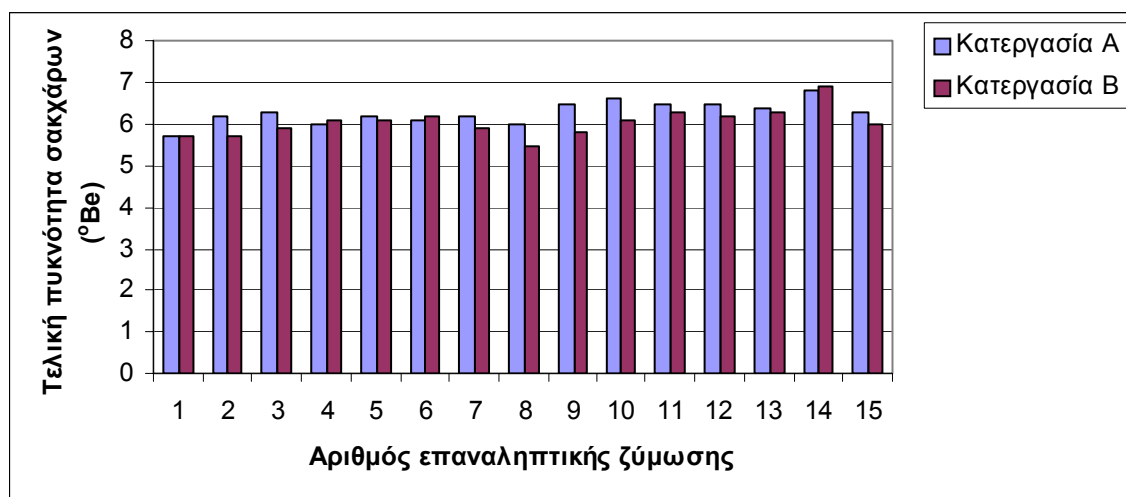
Στην συγκεκριμένη ομάδα πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν δεκαπέντε διαδοχικές ζυμώσεις μιας παρτίδας. Στην πρώτη κατά σειρά ζύμωση προστέθηκε καινούρια ελίφη και 20 g/l βιομάζα. Στις επόμενες δεκατέσσερις ζυμώσεις χρησιμοποιήθηκε η ίδια ελίφη και χωρίς την προσθήκη βιομάζας. Συνεπώς τα κύτταρα που διεκπεραίωσαν τις ζυμώσεις 2-15

ήταν αυτά που είχαν ακινητοποιηθεί στην ελίφη κατά την πρώτη ζύμωση. Πριν η ελίφη ξαναχρησιμοποιηθεί είτε αφηνόταν λίγο χρόνο μέχρι να αποστραγγιστεί το ζυμωμένο με τα κύτταρα υγρό (κατεργασία Α), είτε ξεπλενόταν με αποστειρωμένο διάλυμα μελάσας 16 °Be (κατεργασία Β). Στον παρακάτω πίνακα 1.8.2 καταγράφονται τα αποτελέσματα.

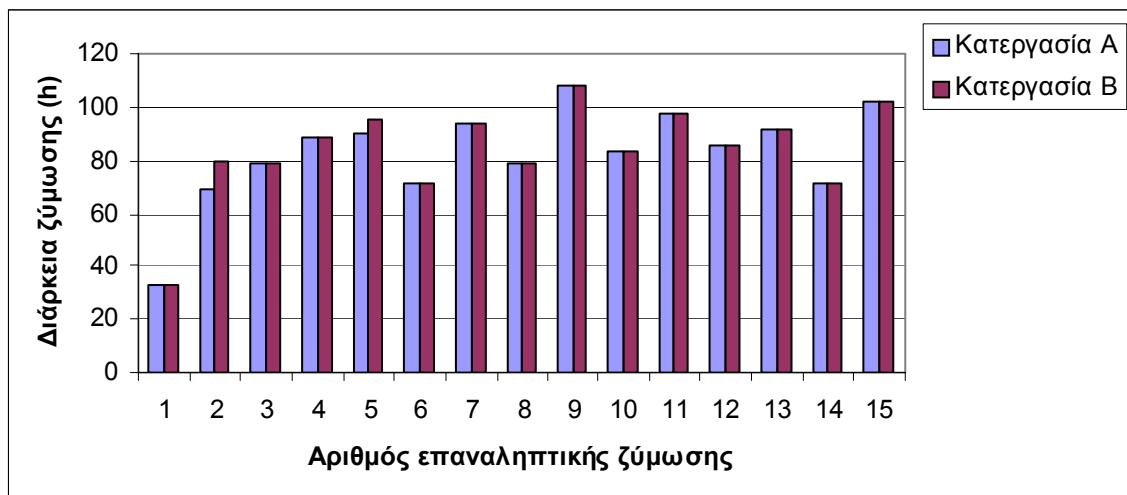
Πίνακας 1.8.2: Αποτελέσματα επαναλαμβανόμενων ζυμώσεων με την χρήση του ίδιου φορέα και των ακινητοποιημένων σε αυτόν κυττάρων.

| Αριθμός επαναληπτικής ζύμωσης | Μέθοδος επεξεργασίας ελίφης | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|--|--|-----------|-----------|
| 1 | Κατεργασία Α | 16 | 5,7 | 33 | 79,79 | 2,418 | 16,8 | 14,5 | 4,69 | 4,93 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 5,7 | 33 | 81,37 | 2,466 | - | 11,8 | 4,69 | 4,94 |
| 2 | Κατεργασία Α | 16 | 6,2 | 69 | 77,42 | 1,122 | - | 5,8 | 4,69 | 4,95 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 5,7 | 80 | 82,16 | 1,027 | - | 5,7 | 4,69 | 4,83 |
| 3 | Κατεργασία Α | 16 | 6,3 | 79 | 77,42 | 0,980 | - | 5,4 | 4,69 | 4,83 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 5,9 | 79 | 79,00 | 1,000 | - | 2,8 | 4,69 | 4,80 |
| 4 | Κατεργασία Α | 16 | 6 | 88,5 | 80,58 | 0,911 | - | 5,8 | 4,69 | 4,73 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 6,1 | 88,5 | 79,79 | 0,902 | - | 3,4 | 4,69 | 4,75 |
| 5 | Κατεργασία Α | 16 | 6,2 | 90,5 | 77,42 | 0,855 | - | 4,4 | 4,69 | 4,83 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 6,1 | 95,5 | 77,42 | 0,811 | - | 2,7 | 4,69 | 4,81 |
| 6 | Κατεργασία Α | 16 | 6,1 | 71,5 | 78,21 | 1,094 | - | 4,6 | 4,69 | 4,83 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 6,2 | 71,5 | 79,00 | 1,105 | - | 4,5 | 4,69 | 4,81 |
| 7 | Κατεργασία Α | 16 | 6,2 | 94 | 77,42 | 0,824 | - | 1,2 | 4,69 | 4,86 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 5,9 | 94 | 79,00 | 0,840 | - | 2,7 | 4,69 | 4,85 |
| 8 | Κατεργασία Α | 16 | 6 | 79 | 79,00 | 1,000 | - | 6,2 | 4,69 | 4,81 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 5,5 | 79 | 80,58 | 1,020 | - | 3,8 | 4,69 | 4,85 |
| 9 | Κατεργασία Α | 16 | 6,5 | 108 | 76,63 | 0,710 | - | 2,8 | 4,69 | 4,83 |
| | Κατεργασία Β | 16 | 5,8 | 108 | 79,79 | 0,739 | - | 2,4 | 4,69 | 4,75 |
| 10 | Κατεργασία Α | 16 | 6,6 | 83,5 | 74,26 | 0,889 | - | 2,9 | 4,69 | 4,79 |

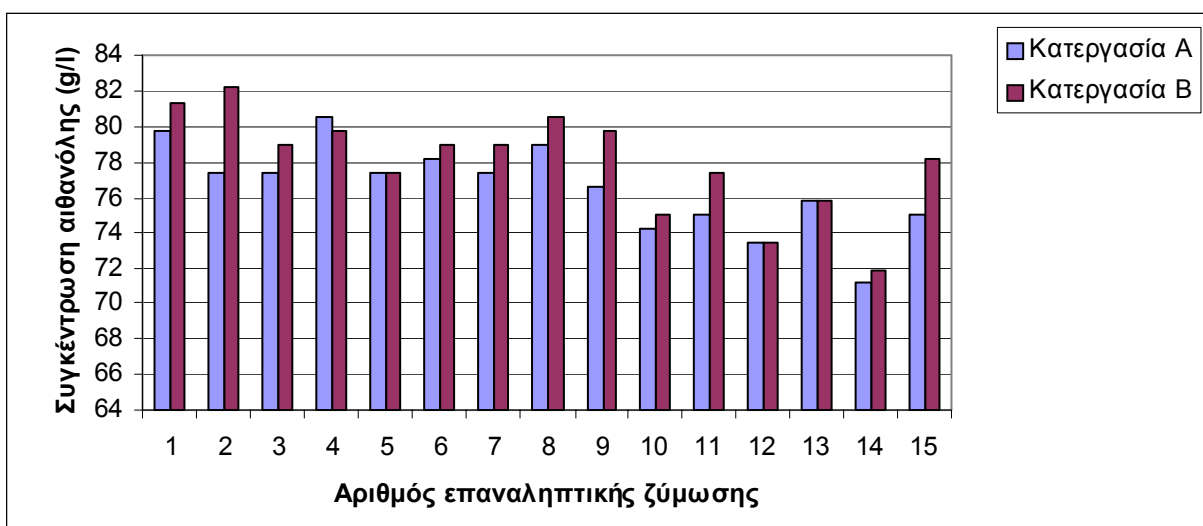
| | | | | | | | | | | |
|----|----------------|----|-----|------|-------|-------|---|-----|------|------|
| | Κατεργασία α Β | 16 | 6,1 | 83,5 | 75,05 | 0,899 | - | 2,6 | 4,69 | 4,74 |
| 11 | Κατεργασία α Α | 16 | 6,5 | 98 | 75,05 | 0,766 | - | 2,4 | 4,69 | 4,83 |
| | Κατεργασία α Β | 16 | 6,3 | 98 | 77,42 | 0,790 | - | 1,5 | 4,69 | 4,79 |
| 12 | Κατεργασία α Α | 16 | 6,5 | 85,5 | 73,47 | 0,859 | - | 4,5 | 4,69 | 4,85 |
| | Κατεργασία α Β | 16 | 6,2 | 85,5 | 73,47 | 0,859 | - | 2,2 | 4,69 | 4,72 |
| 13 | Κατεργασία α Α | 16 | 6,4 | 91,5 | 75,84 | 0,829 | - | 3,3 | 4,69 | 4,83 |
| | Κατεργασία α Β | 16 | 6,3 | 91,5 | 75,84 | 0,829 | - | 1,2 | 4,69 | 4,69 |
| 14 | Κατεργασία α Α | 16 | 6,8 | 71,5 | 71,10 | 0,994 | - | 1 | 4,69 | 4,74 |
| | Κατεργασία α Β | 16 | 6,9 | 71,5 | 71,89 | 1,005 | - | 2,3 | 4,69 | 5,07 |
| 15 | Κατεργασία α Α | 16 | 6,3 | 102 | 75,05 | 0,736 | - | 4,9 | 4,69 | 4,85 |
| | Κατεργασία α Β | 16 | 6 | 102 | 78,21 | 0,767 | - | 0,6 | 4,69 | 4,67 |



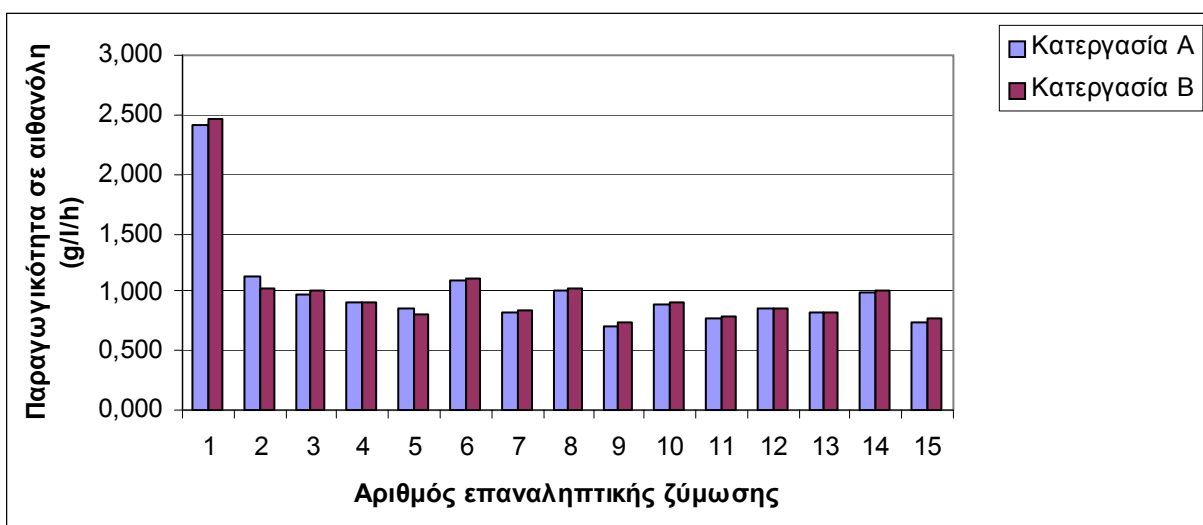
Γράφημα 1.8.5: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης.



Γράφημα 1.8.6: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης.



Γράφημα 1.8.7: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης.



Γράφημα 1.8.8: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση έτσι και σε αυτήν, με εξαίρεση την πρώτη ζύμωση η οποία έχει υψηλή παραγωγικότητα και οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση των κυττάρων, οι υπόλοιπες ζυμώσεις εμφάνισαν μειωμένη παραγωγικότητα, αλλά σχεδόν σταθερή. Δεν φάνηκε η παραγωγικότητα να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου (1250 ώρες ζύμωσης) και τις διαδοχικές χρήσεις του φορέα.

2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΗΣ ΜΕ ΦΟΡΕΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΛΑΣΤΟ ΚΑΛΑΜΙΟΥ

Η θετική δράση της χρήσης του πλέγματος ελίφης, ως φορέα ακινητοποίησης κυττάρων, στην βελτίωση της παραγωγής αλκοόλης, οδήγησε στον σχεδιασμό της επόμενης ομάδας πειραμάτων.

Στα πειράματα αυτά στόχος ήταν να διερευνηθεί η πιθανή χρήση και άλλων υλικών, από το ελληνικό φυσικό περιβάλλον, ως φορέων ακινητοποίησης. Το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην επιλογή υλικών φθινών και άφθονων με πορώδη επιφάνεια και κατά προτίμηση φυτικής προέλευσης, ώστε να αποκλειστεί η τοξικότητα τους. Επίσης ιδιαίτερα πλεονεκτικό θα ήταν ένα υλικό μικρού βάρους και μεγάλης επιφάνειας κατά το πρότυπο της ελίφης. Ξύλινοι κύλινδροι από οξιά και πεύκο που είχαν χρησιμοποιηθεί από την ερευνητική ομάδα στο παρελθόν, έδωσαν άριστα αποτελέσματα, αλλά το συμπαγές του υλικού μειονεκτούσε λόγω του μεγάλου ενεργού όγκου του αντιδραστήρα που καταλάμβανε.

Με βάση τα δεδομένα αυτά επιλέχθηκε ο βλαστός του φυτού *Arundo donax*, ο οποίος κατεργάζεται εύκολα, έχει μικρό βάρος σε σχέση με την επιφάνεια του και προέρχεται από καλλιέργειες που δεν απαιτούν παρά ελάχιστο χώρο και έξοδα.

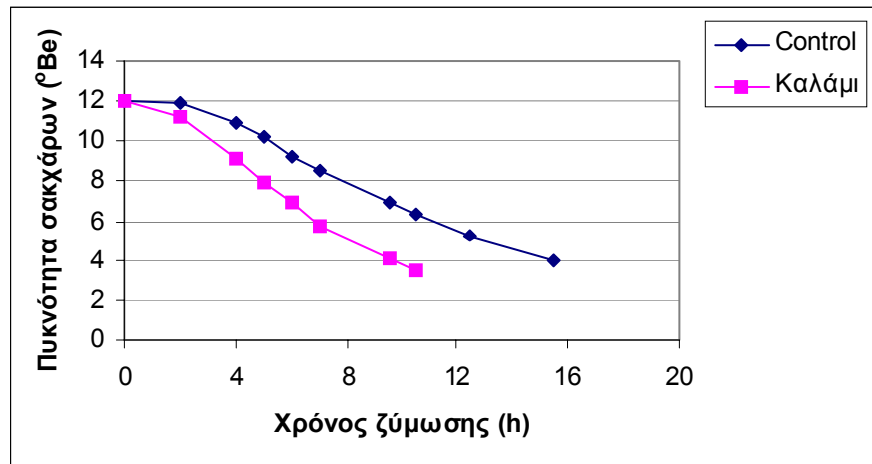
2.1. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΚΑΛΑΜΙΟΥ ΩΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΤΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΖΥΜΩΣΕΙΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕΛΑΣΑΣ

Στην συγκεκριμένη ομάδα πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας του καλαμιού, σε ζυμώσεις διαλυμάτων μελάσας αυξανόμενης αρχικής πυκνότητας σακχάρων. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ζυμώσεων, με πρώτη ύλη διαλύματα μελάσας διαφορετικών αρχικών πυκνοτήτων σακχάρων (12, 14, 16, 18 και 20 °Be). Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα και αναλύονται στα ακόλουθα διαγράμματα.

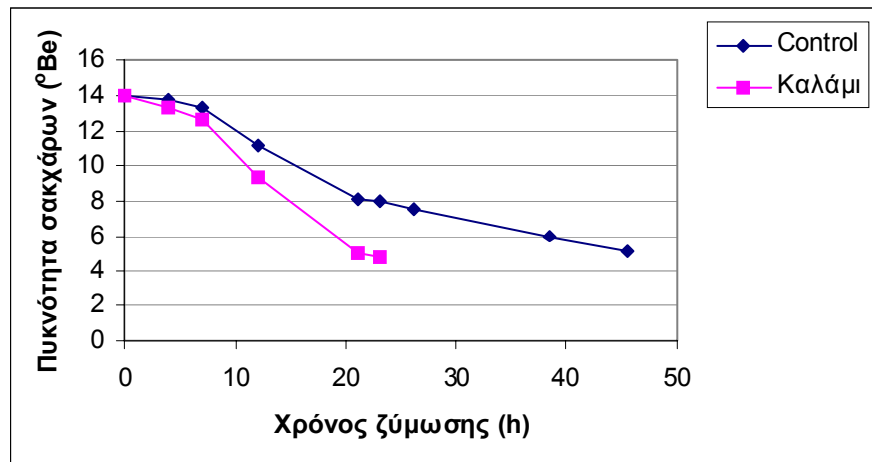
Πίνακας 2.2.1: Αποτελέσματα ζυμώσεων σε διαλύματα μελάσας με διαφορετική αρχική πυκνότητα σακχάρων, απουσία και παρουσία καλαμιού.

| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα σακχάρων (°Be) | Τελική πυκνότητα σακχάρων (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|--|--|-----------|-----------|
| Control | 12 | 4 | 15,5 | 63,99 | 4,128 | 16,8 | 14,7 | 4,69 | 4,56 |
| Καλάμι | 12 | 3,5 | 10,5 | 66,36 | 6,320 | 16,8 | 32,5 | 4,69 | 4,61 |
| Control | 14 | 5,1 | 45,5 | 71,89 | 1,580 | 16,8 | 16,7 | 4,69 | 5,00 |
| Καλάμι | 14 | 4,7 | 23 | 74,26 | 3,229 | 16,8 | 20,5 | 4,69 | 4,97 |
| Control | 16 | 6 | 71 | 78,21 | 1,102 | 16,8 | 14,9 | 4,69 | 4,83 |
| Καλάμι | 16 | 5,7 | 42 | 81,37 | 1,937 | 16,8 | 18,1 | 4,69 | 4,85 |
| Control | 18 | 12,6 | 101,5 | 44,24 | 0,436 | 16,8 | 17,7 | 4,69 | 4,81 |

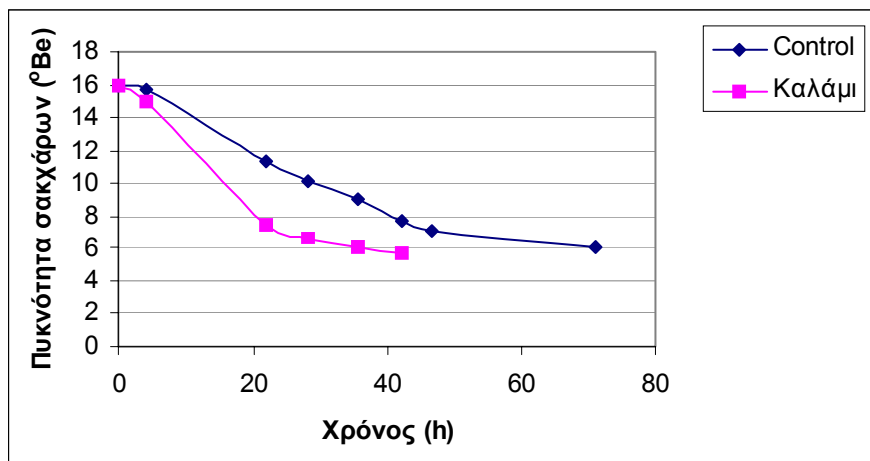
| | | | | | | | | | |
|---------|----|------|-----|-------|-------|------|------|------|------|
| Καλάμι | 18 | 8,3 | 81 | 74,26 | 0,917 | 16,8 | 16,4 | 4,69 | 4,94 |
| Control | 20 | 17,8 | 216 | 15,8 | 0,073 | 16,8 | 17,2 | 4,69 | 4,72 |
| Καλάμι | 20 | 11,6 | 191 | 67,15 | 0,352 | 16,8 | 16,2 | 4,69 | 4,92 |



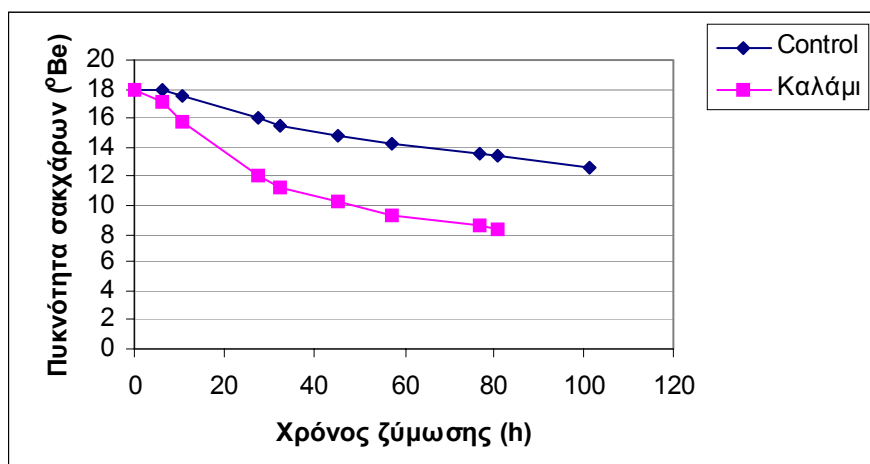
Γράφημα 2.1.1: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 12°Be , απουσία και παρουσία καλαμιού.



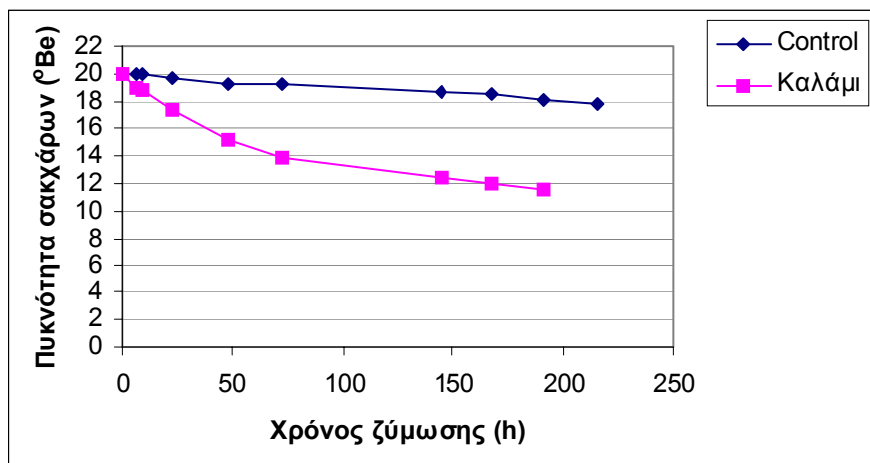
Γράφημα 2.1.2: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 14°Be απουσία και παρουσία καλαμιού.



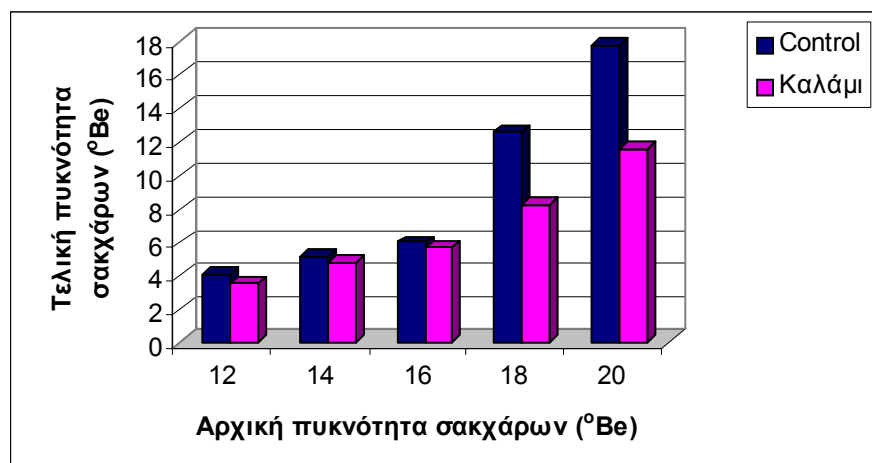
Γράφημα 2.1.3: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 16 °Be, απουσία και παρουσία καλαμιού



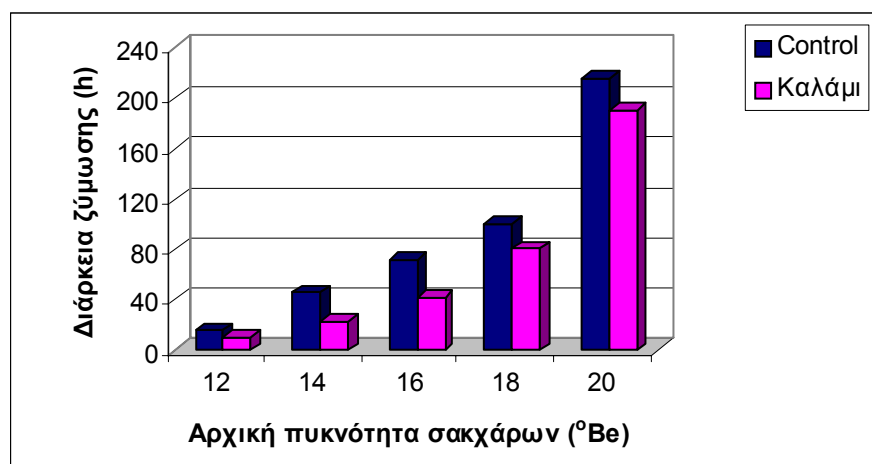
Γράφημα 2.1.4: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 18 °Be, απουσία και παρουσία καλαμιού.



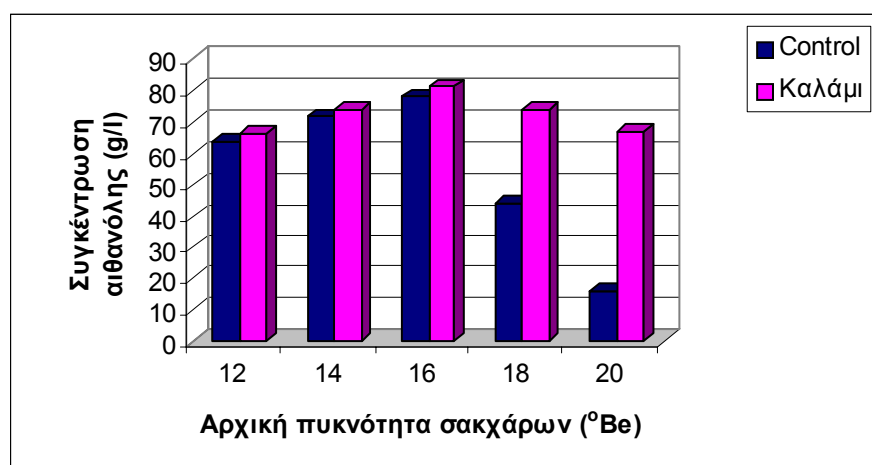
Γράφημα 2.1.5: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 20 °Be, απουσία και παρουσία καλαμιού.



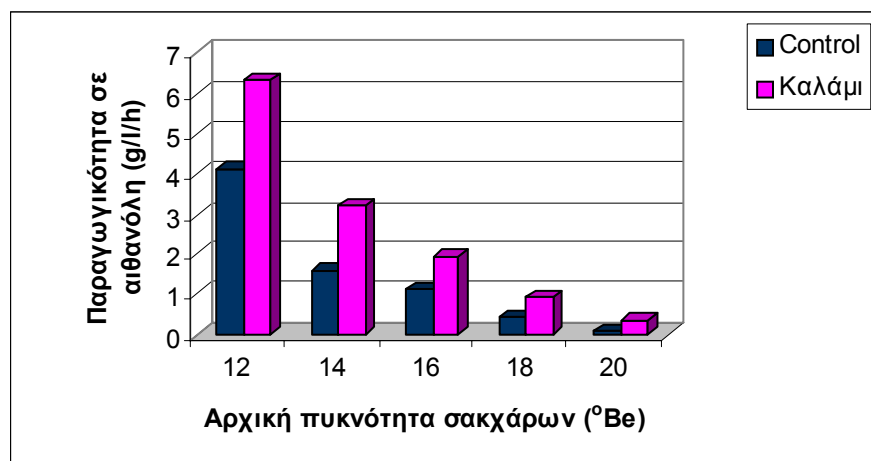
Γράφημα 2.1.6: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία καλαμιού.



Γράφημα 2.1.7: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ζύμωσης, απουσία και παρουσία καλαμιού.



Γράφημα 2.1.8: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης, απουσία και παρουσία καλαμιού.



Γράφημα 2.1.9: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία καλαμιού.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα έγινε φανερό ότι όπως και στην περίπτωση της ελίφης η παρουσία του καλαμιού ως φορέα ακινητοποίησης, επηρέασε θετικά τις αποδόσεις των ζυμώσεων, σε όλες τις περιπτώσεις.

Πιο συγκεκριμένα, η πυκνότητα των αζύμωτων σακχάρων παρουσία του φορέα, ήταν μειωμένη σε σχέση με τις ζυμώσεις απουσία φορέα. Στα πιο πυκνά διαλύματα μάλιστα (18 και 20 °Be) η παρουσία του καλαμιού είχε ως αποτέλεσμα την αξιοποίηση κατά 35% περίπου, περισσοτέρων ζυμώσιμων σακχάρων. Η διάρκεια των ζυμώσεων μειώθηκε σημαντικά παρουσία του φορέα, έως και 49% στα διαλύματα μελάσας 14 °Be. Συνεπώς και η παραγωγικότητα αυξήθηκε σημαντικά σε όλες τις περιπτώσεις. Η αύξηση της παραγωγικότητας ήταν τουλάχιστον της τάξης του 50 % (12 °Be). Μάλιστα στην περίπτωση των πυκνών διαλυμάτων των 20 °Be, η παραγωγικότητα σχεδόν τετραπλασιάστηκε. Η παραγωγικότητα στα πυκνά διαλύματα, παρόλο που αυξήθηκε θεαματικά παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα (0,352 g/l/h), λόγω της υψηλής οσμωτικής πίεσης του θρεπτικού μέσου. Εδώ όμως πρέπει να σημειωθεί ιδιαίτερα ο καταλυτικός ρόλος της παρουσίας του φορέα. Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι απουσία του συγκεκριμένου φορέα, ο βιοκαταλύτης αξιοποίησε μόνο το 10% των διαθέσιμων σακχάρων (γραφήματα 2.1.5 και 2.1.6) και παρήχθησαν 15,8 g/l αιθανόλης. Αντίθετα η παρουσία του φορέα οδήγησε στην παραγωγή 67,15 g/l, δηλαδή εμφανίστηκε μια αύξηση της τάξης του 300%.

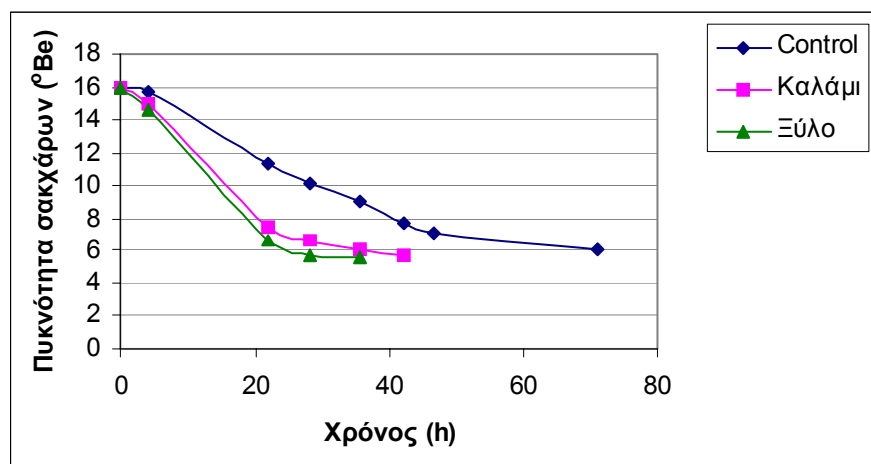
Παρατηρήθηκε επίσης πως η παρουσία του φορέα βελτιώνει την βιωσιμότητα και των πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αφού τα ελεύθερα κύτταρα μετά το τέλος των ζυμώσεων, ήταν περισσότερα στις ζυμώσεις που συμμετείχε ο φορέας.

2.2. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΟΡΕΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

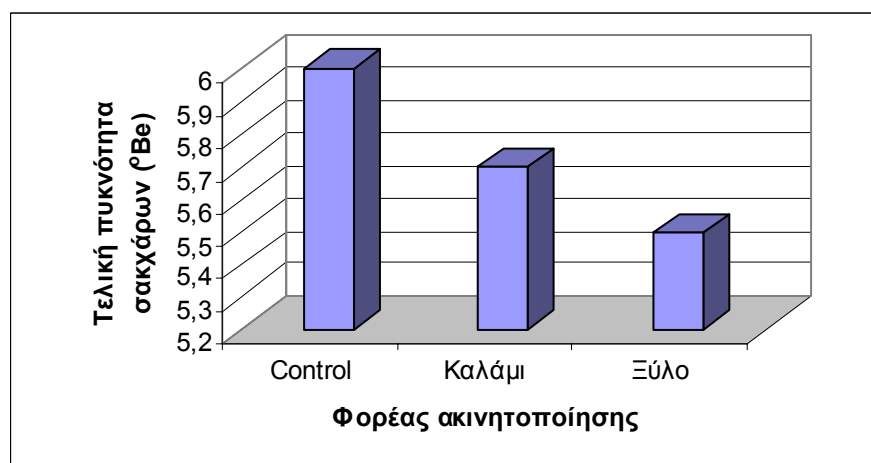
Με τα πειράματα αυτά μελετήθηκε το καλάμι ως φορέας ακινητοποίησης συγκριτικά με το ξύλο. Επιλέχθηκε το ξύλο γιατί όπως και στην περίπτωση της ελίφης είναι ένας φορέας με ικανοποιητικές αποδόσεις και το βασικό δομικό συστατικό και των τριών υλικών είναι η κυτταρίνη.

Πίνακας 2.2.1: Αποτελέσματα ζυμώσεων διαλυμάτων μελάσας 16 °Be, απουσία και παρουσία καλαμιού και ξύλου.

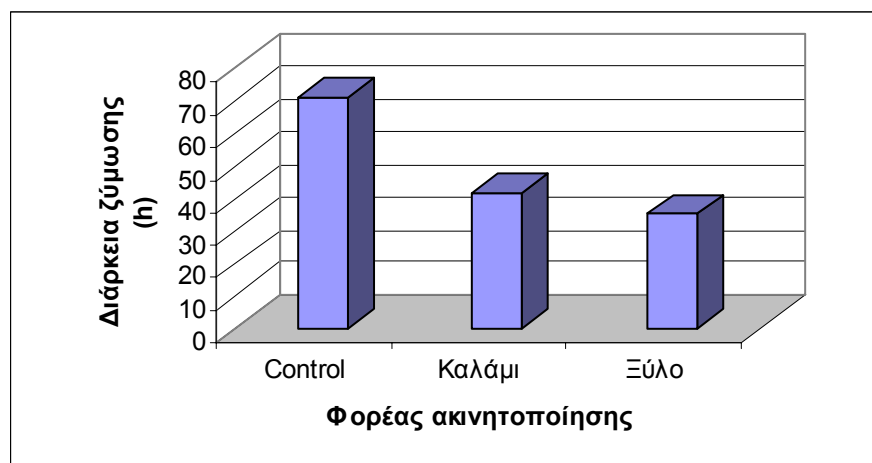
| Πείραμα | Αρχική πυκνότητα σακχάρων (°Be) | Τελική πυκνότητα σακχάρων (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h/) | Αρχική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Τελική βιομάζα (*10 ⁶ κυτ/ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|---------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|--|-----------|-----------|
| Control | 16 | 6 | 71 | 78,21 | 0,937 | 16,8 | 14,9 | 4,69 | 5,00 |
| Καλάμι | 16 | 5,7 | 42 | 81,37 | 2,141 | 16,8 | 18,1 | 4,69 | 5,01 |
| Ξύλο | 16 | 5,5 | 35,5 | 79 | 2,225 | 16,8 | 19,7 | 4,69 | 4,95 |



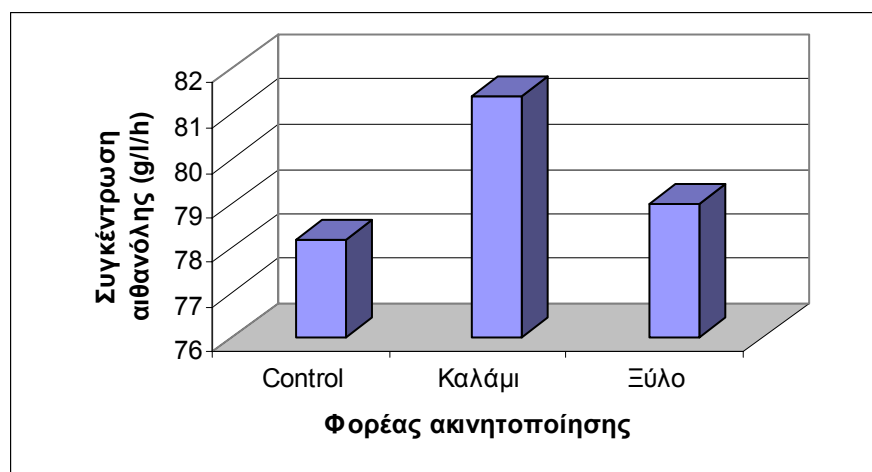
Γράφημα 2.2.1: Κινητική ζύμωσης διαλύματος μελάσας 16 °Be, απουσία και παρουσία φορέων ακινητοποίησης.



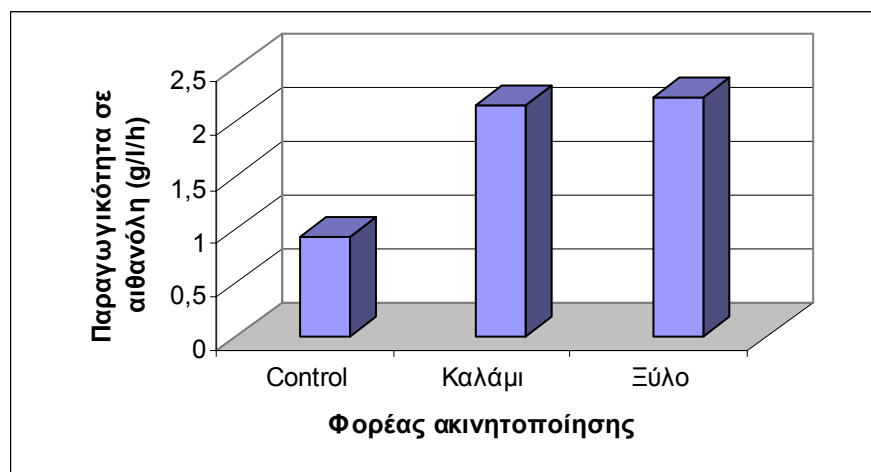
Γράφημα 2.2.2: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης, απουσία και παρουσία φορέων ακινητοποίησης.



Γράφημα 2.2.3: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης, απουσία και παρουσία φορέων ακινητοποίησης.



Γράφημα 2.2.4: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης, απουσία και παρουσία φορέων ακινητοποίησης.



Γράφημα 2.2.5: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία φορέων ακινητοποίησης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως γίνεται φανερό από την μελέτη των αποτελεσμάτων της σύγκρισης των δυο υλικών, η παρουσία τους στις ζυμώσεις μιας παρτίδας είναι καταλυτική. Δηλαδή, και τα δυο υλικά αποτελούν πολύ ικανοποιητικούς φορείς δέσμευσης κυττάρων. Ειδικότερα:

- Η διάρκεια της ζυμωτικής διεργασίας μειώθηκε από 42 έως 50%, όταν ο βιοαντιδραστήρα περιείχε τον φορέα.
- Αυξήθηκε η ποσότητα της παραγόμενης αλκοόλης και
- Η παραγωγικότητα, παράγοντας ιδιαίτερα σημαντικός για παραγωγή αιθανόλης σε μεγάλη κλίμακα, υπερδιπλασιάστηκε (αύξηση 110 έως 120%).

Επιπλέον, μεταξύ των δυο υλικών φαίνεται ότι πλεονεκτεί σε πρώτη φάση ο προερχόμενος από το κατεργασμένο καλάμι. Είναι ελαφρύτερος, διαθέτει μεγαλύτερη επιφάνεια ανά g μάζας και καταλαμβάνει ελάχιστο όγκο σε σχέση με τους κυλίνδρους ξύλου, ενώ και η παραγωγικότητα παρουσία του εμφανίζεται βελτιωμένη.

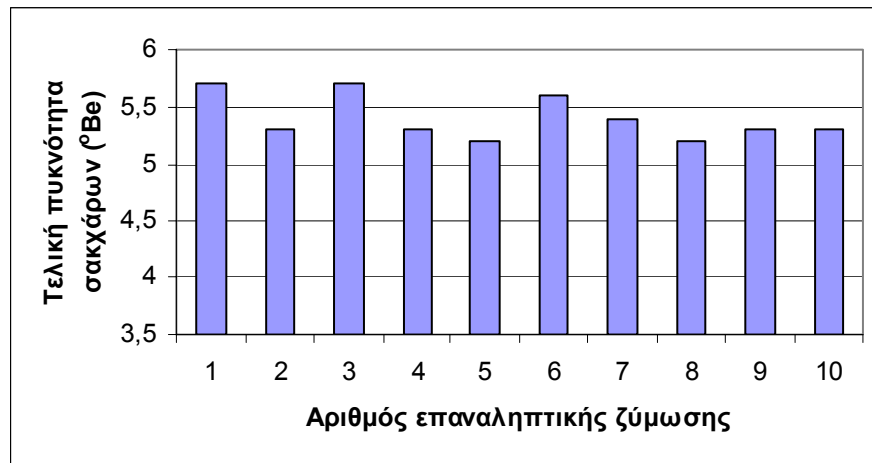
2.3. ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΦΟΡΕΑ

Όπως στην περίπτωση της ελίφης έτσι και σε αυτήν του καλαμιού, μελετήθηκε η δυνατότητα χρήσης του φορέα σε βάθος χρόνου. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν δέκα διαδοχικές ζυμώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος φορέας και κάθε φορά προστέθηκαν 20 g/l βιομάζας.

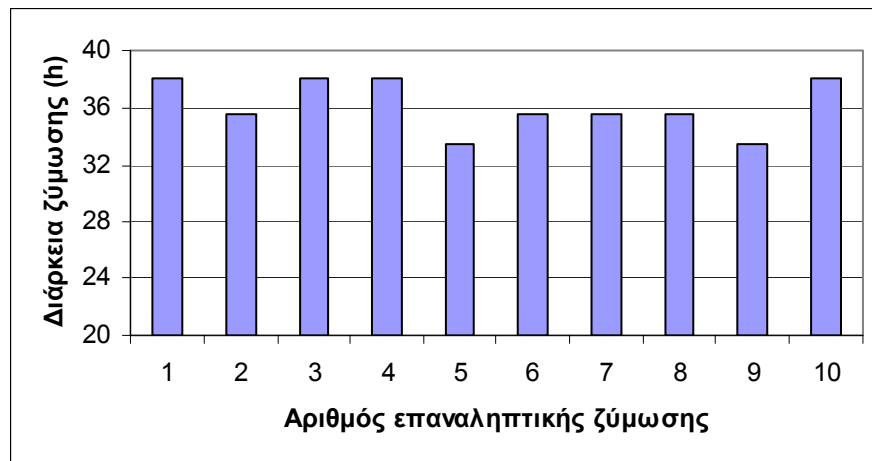
Πίνακας 2.3.1: Αποτελέσματα επαναλαμβανόμενων ζυμώσεων με τη χρήση του ίδιου φορέα και την προσθήκη βιομάζας.

| Επανάληψη | Αρχική πυκνότητα (°Be) | Τελική πυκνότητα (°Be) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Συγκέντρωση αιθανόλης (g/l) | Παρ/τα σε αιθανόλη (g/l/h) | Αρχική βιομάζα (κυτ./ml) | Τελική βιομάζα (κυτ./ml) | Αρχικό pH | Τελικό pH |
|-----------|------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| 1 | 16 | 5,7 | 38 | 81,37 | 2,141 | 16,8 | 18,1 | 4,69 | 5,0 1 |
| 2 | 16 | 5,3 | 35,5 | 83,74 | 2,359 | 16,8 | 13,9 | 4,69 | 4,9 5 |
| 3 | 16 | 5,7 | 38 | 82,16 | 2,162 | 16,8 | 15,8 | 4,69 | 5,0 3 |

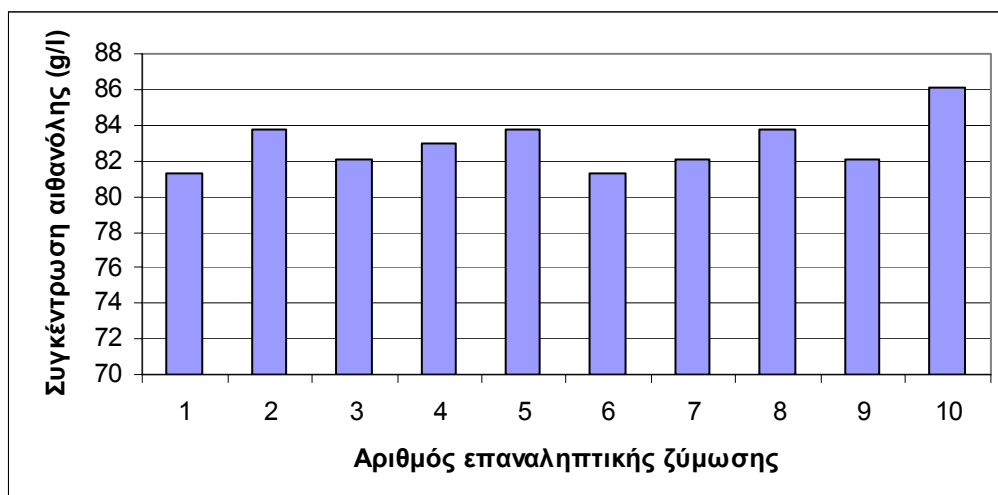
| | | | | | | | | | |
|----|----|-----|------|-------|-------|------|------|------|----------|
| 4 | 16 | 5,3 | 38 | 82,95 | 2,183 | 16,8 | 13,5 | 4,69 | 4,8 5 |
| 5 | 16 | 5,2 | 33,5 | 83,74 | 2,500 | 16,8 | 15,1 | 4,69 | 4,7 5 |
| 6 | 16 | 5,6 | 35,5 | 81,37 | 2,292 | 16,8 | 13,4 | 4,69 | 4,9 2 |
| 7 | 16 | 5,4 | 35,5 | 82,16 | 2,314 | 16,8 | 16,1 | 4,69 | 4,9 2 |
| 8 | 16 | 5,2 | 35,5 | 83,74 | 2,359 | 16,8 | 16,9 | 4,69 | 4,9 2 |
| 9 | 16 | 5,3 | 33,5 | 82,16 | 2,453 | 16,8 | 16 | 4,69 | 5,0 1 |
| 10 | 16 | 5,3 | 38 | 86,11 | 2,266 | 16,8 | 14,6 | 4,69 | 4,9 8 |



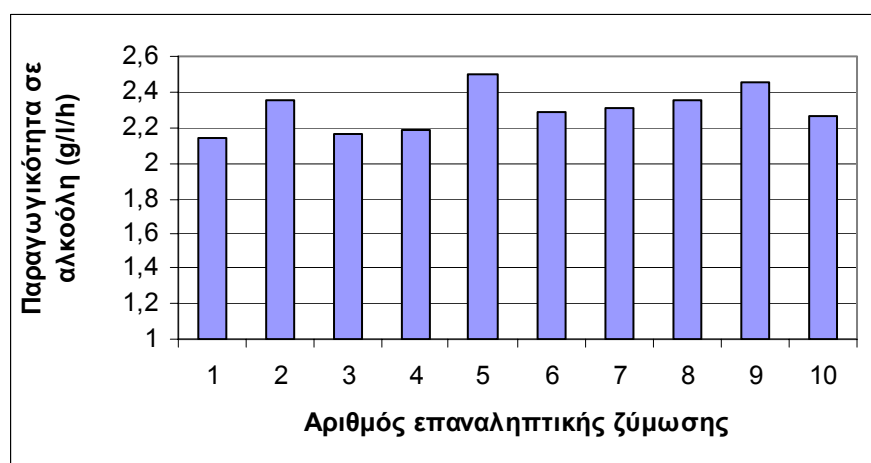
Γράφημα 2.3.1: Συγκριτικό διάγραμμα της πυκνότητας των σακχάρων που παραμένουν μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης.



Γράφημα 2.3.2: Συγκριτικό διάγραμμα του χρόνου ολοκλήρωσης της ζύμωσης.



Γράφημα 2.3.3: Συγκριτικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της παραγόμενης αιθανόλης.



Γράφημα 2.3.4: Συγκριτικό διάγραμμα της παραγωγικότητας σε αιθανόλη, απουσία και παρουσία ελίφης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

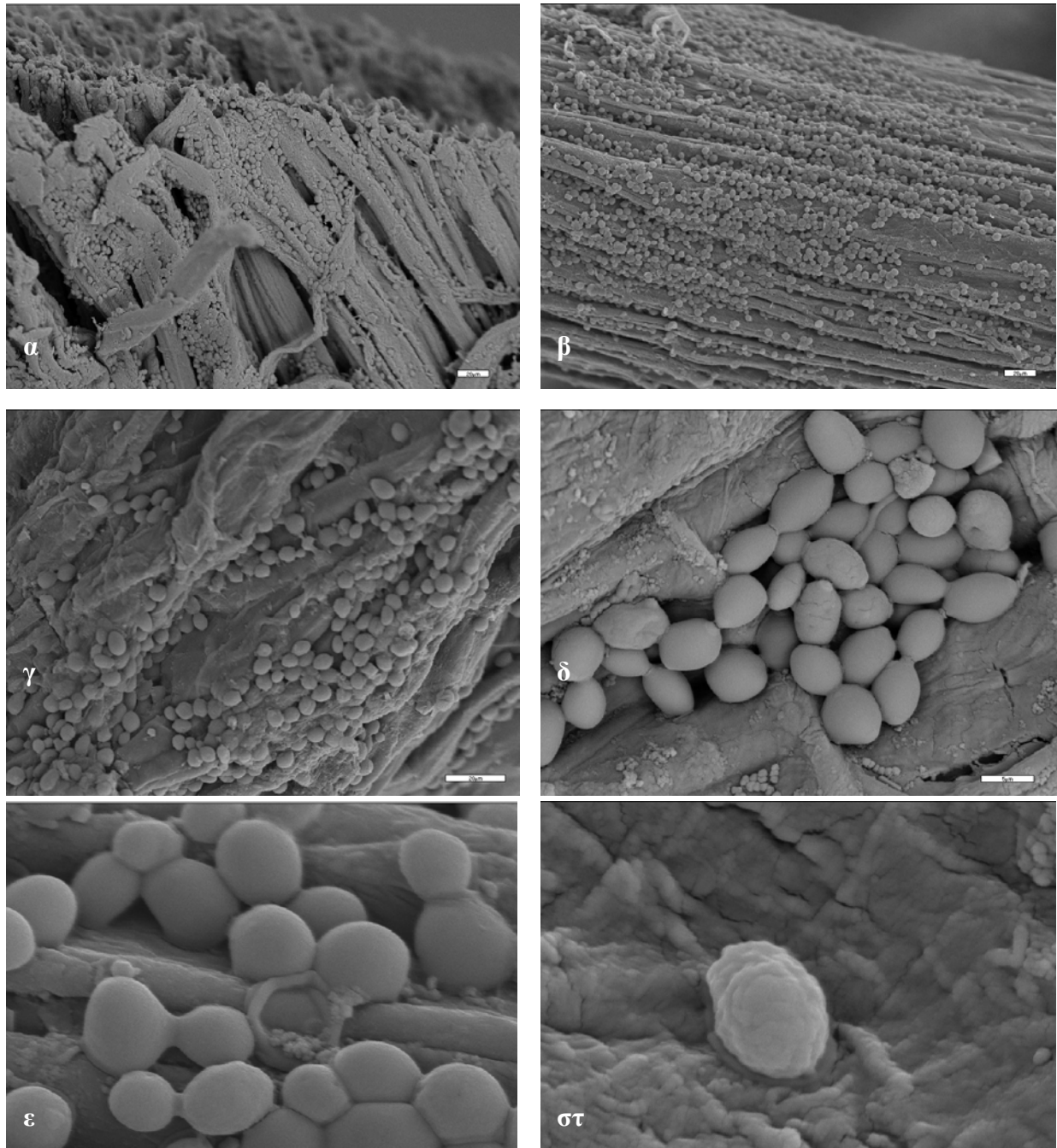
Όπως ήδη αναφέρθηκε, ένα προτεινόμενο υλικό για χρήση σε παραγωγική διαδικασία οφείλει να εμφανίζει σταθερότητα σε βάθος χρόνου. Ο εξεταζόμενος λοιπόν φορέας, χρησιμοποιήθηκε για 360 περίπου ώρες συνεχούς χρήσης του ίδιου υλικού για να δοκιμαστεί η αντοχή του και η σταθερή δράση του στην λειτουργία της ζύμωσης.

Από την μελέτη των αποτελεσμάτων που καταγράφονται στα παραπάνω διαγράμματα, προκύπτει ότι το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα χρήσης οι παράμετροι της ζύμωσης εμφανίστηκαν ιδιαίτερα σταθερές. Ειδικότερα, η πυκνότητα του αζύμωτου σακχάρου κυμάνθηκε από 5,3 έως 5,7 °Be, ενώ ο χρόνος διάρκειας της ζύμωσης διαφοροποιήθηκε ελάχιστα από την πρώτη έως την δέκατη επανάληψη. Επίσης, τόσο η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης όσο και η παραγωγικότητα του συστήματος εμφάνισαν μικρές αποκλίσεις, γεγονός που αποτελεί μια καλή ένδειξη για τη βιωσιμότητα του εξεταζόμενου υλικού ως φορέα.

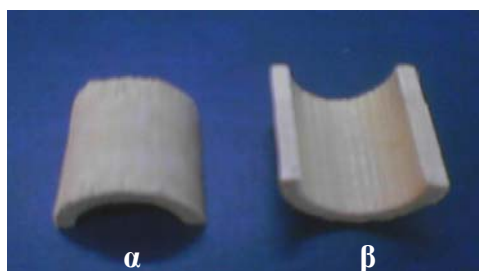
3. ΜΕΛΕΤΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM)

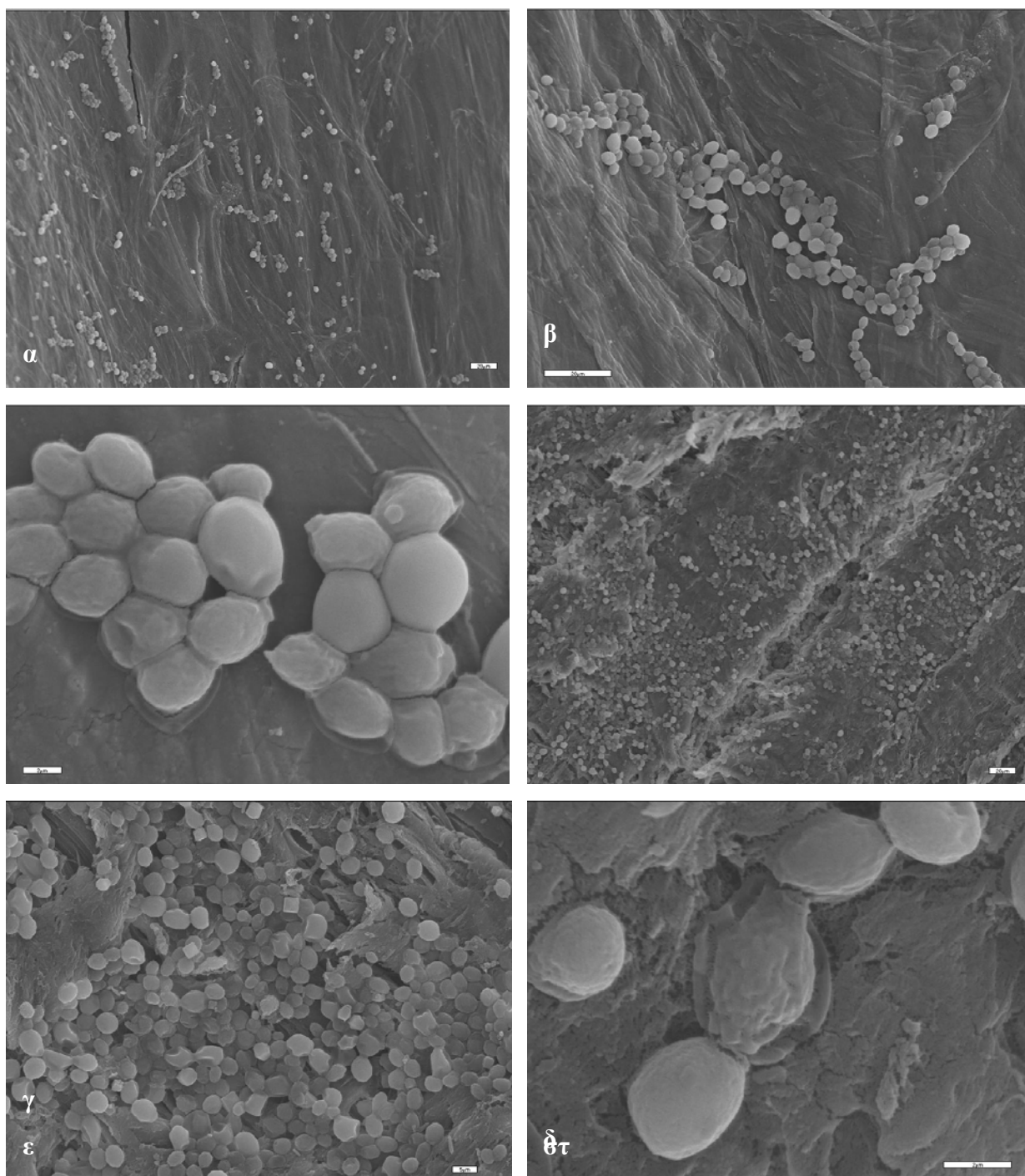
Με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ακινητοποίηση των κυττάρων του χρησιμοποιούμενου βιοκαταλύτη στους φορείς, εξετάστηκαν δείγματα των φορέων μετά από χρήση τους σε ζυμωτικές διαδικασίες, σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM).



Εικόνα 3.1: Ηλεκτρονιογραφίες τεμαχίου ελίφης που χρησιμοποιήθηκε ως φορέας ακινητοποίησης μετά από πείραμα ζύμωσης σε διαφορετικές μεγεθύνσεις. α) x 350, β) x 350, γ) x 650, δ) x 2300, ε) x 4500.



Εικόνα 3.2: Φωτογραφία της εξωτερικής (α) και της εσωτερικής (β) επιφάνειας τεμαχίου καλαμιού.



Εικόνα 3.3: Ηλεκτρονιογραφία της εσωτερικής (α, β, γ) και της εξωτερικής (δ, ε, στ) επιφάνειας τεμαχίων καλαμιού μετά από πείραμα ζύμωσης με ακινητοποιημένα κύτταρα. α) x 300, β) x 750, γ) x 4300, δ) x 300, ε) x 1100, στ) x 7500.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη των ηλεκτρονιογραφιών επιβεβαίωσε τα προηγούμενα αποτελέσματα. Σε όλες τις ηλεκτρονιογραφίες διακρίνονται καθαρά μονόστιβες στρώσεις του βιοκαταλύτη καθλωμένες στην επιφάνεια και σε εσοχές των φορέων. Τα κύτταρα αυτά φαίνονται ακινητοποιημένα, δηλαδή προσκολλημένα με δυνάμεις φυσικής προσρόφησης, στα τοιχώματα του φορέα, γεγονός που εξηγεί σε ένα βαθμό τις βελτιωμένες αποδόσεις των ζυμώσεων. Με την διάταξή τους δημιουργούν βιολογικό υμένιο (biofilm) το οποίο ευνοεί την καλύτερη εκμετάλλευση της διαθέσιμης επιφάνειας βιομάζας καθώς αποκτούν σταθερότητα δημιουργώντας μικροπεριβάλλοντα, στα οποία η επαφή με το υπόστρωμα και η απομάκρυνση των προϊόντων της ζύμωσης λειτουργούν καλύτερα. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι, όπως αποδείχθηκε και με τα δύο υλικά, η αντοχή των κυττάρων του βιοκαταλύτη σε υπεροσμωτικά διαλύματα (>16 °Be), βελτιώνεται σημαντικά οδηγώντας σε διεκπεραίωση ζυμώσεις οι οποίες με συνθήκες ελεύθερων κυττάρων είναι αδύνατο να πραγματοποιηθούν.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η διαδικασία και οι παράμετροι διεξαγωγής της αλκοολικής ζύμωσης σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου με τις εξής συνθήκες και διαφοροποιήσεις:

- Στην πλειοψηφία των ζυμώσεων για την παραγωγή βιοαιθανόλης χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα διάλυμα μελάσας, ενός φθηνού και διαθέσιμου σε μεγάλες ποσότητες βιομηχανικού παραπροϊόντος. Σε ορισμένες ομάδες πειραμάτων ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα γλυκόζης ή σακχαρόζης, εκχύλισμα σταφίδας και εκχύλισμα σόργου.
- Όλες οι ζυμωτικές διαδικασίες διεξήχθησαν σε αντιδραστήρα παρουσία κατάλληλα επεξεργασμένων υλικών ανόργανων, οργανικών ή συνθετικών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς ακινητοποίησης του βιοκαταλύτη (*S. cerevisiae*).
- Ως φορέας ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε, πλην των ήδη εξετασθέντων υλικών (ξύλο, κίσηρη, συνθετικό πορώδες), ένα νέο και ελάχιστα μελετημένο, η ελίφη, που προκύπτει μετά από ειδική κατεργασία του καρπού του φυτού *Luffa cylindrica*, καθώς και επεξεργασμένος βλαστός καλαμιού (*Arundo donax*). Και τα δύο αποτελούν προϊόντα της ελληνικής χλωρίδας.

Από την σύνθεση και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, συνάγονται τα εξής:

1. Η παρουσία των φορέων ακινητοποίησης ήταν καταλυτική ώστε, ο χρόνος ζύμωσης τόσο των διαλυμάτων μελάσας, όσο και των υπόλοιπων υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, μειώθηκε σημαντικά. Ιδιαίτερης σημασίας ήταν η μείωση του χρόνου της ζύμωσης που παρατηρήθηκε στις υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων 18°Be, 20°Be και 22°Be και έφθασε έως και 100%.
2. Σημαντικά μειωμένο ήταν επίσης και το ποσοστό αζύμων υδατανθράκων που παρέμεναν μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Μάλιστα, στις υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων (20 και 22°Be) απουσία των φορέων ελάχιστα από τα διαθέσιμα ζυμώσιμα σάκχαρα αξιοποιήθηκαν.
3. Οι τελικές συγκεντρώσεις της αιθανόλης αυξήθηκαν στις ζυμώσεις παρουσία των φορέων, ενώ ταυτόχρονα σημαντικά αυξημένη ήταν η παραγωγικότητα σε σχέση με τις τιμές που επιτυγχάνει η βιομηχανία σήμερα.
4. Από τη μελέτη επίσης προέκυψε ότι και οι δύο φορείς (ελίφη, καλάμι) είναι φυσικοχημικά σταθεροί και βιώσιμοι καθώς η χρήση τους σε επανειλημμένες ζυμώσεις δεν εμφάνισε μειωμένες αποδόσεις.
5. Οι βελτιωμένες αποδόσεις των ζυμώσεων, εξηγούνται σε ένα βαθμό από την ακινητοποίηση των κυττάρων στους φορείς, όπως αυτή αποδείχθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).
6. Επιπλέον και οι δύο φορείς εμφάνισαν συγκριτικά με τους ήδη μελετημένους φορείς βελτιωμένες αποδόσεις.

Η σημαντική δράση των εξετασθέντων φορέων ακινητοποίησης, σε συνδυασμό με το αμελητέο βάρος, τα βιολογικά και φυσικά τους χαρακτηριστικά, αλλά και το μικρό κόστος τους, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η χρήση τους μπορεί να αποτελέσει μια ουσιαστική πρόταση για την βελτίωση της βιοτεχνολογικής παραγωγής αιθανόλης, ιδιαίτερα στον ελλαδικό χώρο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ☞ Alexopoulos C. J., Mims C. W., Blackwell M. (1996): Introductory Mycology. 4th edition, John Wiley and Sons INC, p. 869.
- ☞ Brewster, J.L., De Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., Gustin, M.C. (1993): An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259:1760-1763.
- ☞ Bullock, J.D., Comberbach, D.M. (1981): A practical system for high productivity ethanol fermentation. 2nd European Cong. Biotechnol., Eastbourne, England, p.204.
- ☞ Crueger, W., Crueger, A. (1989): International student edition. *Biotechnology. A textbook of Industrial Microbiology*, 2nd edition, p. 357.
- ☞ Cysewski, G.R., Wikle, C.R. (1978): Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 20:1421-1444.
- ☞ Esser, K., Schmidt, U., Stahl, U. (1982): Ethanol and biomass production of wild strains and respiratory deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 16:161-164.
- ☞ Faaij, A., P., C. (2006): Bio-energy in Europe: changing technology choices. *Energy Policy*, 34: 322–342.
- ☞ Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (1990): *Microbial Enzymes And Biotechnology*. 2nd edition, Elsevier Applied Science, p. 472.
- ☞ Freeman, A. (1984) Gel entrapment of whole cells and enzymes in cross-linked, prepolymerized polyacrylamide hydrazide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 434:418–426.
- ☞ Ghose, T.K., Tyagi, R.D. (1979): Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering*, 21:1401-1420.
- ☞ Glazer, A. N., Nikaido, H. (1995): *Microbial Biotechnology. Fundamentals Of Applied Microbiology*. W. H. Freeman and Company, New York, p. 662.
- ☞ Gryta, M. (2002): The assessment of microorganism growth in the membrane distillation system. *Desalination*, 142:79–88.
- ☞ Hall, D. O., Scrase, J. I. (1998): Will biomass be the environmentally friendly fuel of the future? *Biomass and Bioenergy*, 15:357-367.
- ☞ Hawtman, A.C., Duplessis, C.S. (1986): The effect of grape cultivar and yeast strain on fermentation rate and concentrations of volatile components in wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 7:14-20.
- ☞ Hilge-Rotmann, B., Rehm, H.J. (1991): Relationship between fermentation capacity and fatty acid composition of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34:502-508.

- ↵ Hirayama, T., Maeda, T., Saito, H., Shinozaki, K. (1995): Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, 249:127-138.
- ↵ Huang, J., Hooijmans, C.M., Briasco, C.A., Geraats, S.G.M., Luyben, K.C.A.M., Thomas, D., Barbotin, J.N. (1990): Effect of free-cell growth parameters on oxygen concentration profiles in gelimmobilized recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:619–623.
- ↵ Jackson, R. S. (1994): *Wine Science. Principles And Applications*. Academic Press, a division of Harcourt Brace and Company, New York, p. 474.
- ↵ Jin, Y.L., Speers, R.A. (1998): Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 31:421–440.
- ↵ Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A. (2004): Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21 (4):377-397.
- ↵ Koutinas, A.A., Gourdoupis, C., Psarianos, C., Kaliafas, A., Kanellaki, M. (1991): Continuous potable alcohol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on mineral kissiris. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30:203-216.
- ↵ Krishna, S. H., Reddy, T. J., Chowdary, G. V. (2001): Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*, 77:19-196.
- ↵ Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.A. (1998): Diffusion of sugars and alcohols through composite membrane structures immobilising viable yeast cells. *Enzyme Microb. Technol.*, 22:434–438.
- ↵ Lynd, L. (1996): Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, and policy. *Annual Review of Energy & Environment*, 21:403-465.
- ↵ Λιακοπούλου – Κυριακίδου, Μ. (2004): Βιοτεχνολογία με στοιχεία Βιοχημικής Μηχανικής. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, p. 213.
- ↵ Marechal, P.A., Gervais, P. (1994): Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42:617-622.
- ↵ Margaritis, A., Merchant, F.J.A. (1984): Advances in ethanol production using immobilized cell systems. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 1(4):339-393.
- ↵ Martin, A.M. (1991): *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. Elsevier Applied Science, pp. 63–116.
- ↵ Mazmanci, M.A., Ünyayar, A. (2005): Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. *Process Biochemistry*, 40:337–342.

- ☞ Meikle, A.J., Reed, R.H., Gadd, G. M. (1988): Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 134:3049-3060.
- ☞ Navarro, J.M., Durand, G. (1977): Modification of yeast metabolism by immobilization on to porous glass. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 4:243–254.
- ☞ Norton, S., D'Amore, T. (1994): Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme Microb. Technol.*, 16:365–375.
- ☞ Ogonna, J.C., Matsumura, M., Kataoka, H. (1991): Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameters: a review. *Process Biochemistry*, 26:109–121.
- ☞ Park, J.K., Chang, H.N. (2000): Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18:303–319.
- ☞ Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I. (1998): Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *J. Inst. Brew.* 104, 19–31.
- ☞ Ramon-Portugal, F., Silva, S., Taillandier, P., Strehaiano, P. (2003): Immobilized yeasts: actual oenologic utilizations. *Wine Internet Technical Journal*. (1), (www.vinidea.net).
- ☞ Rose, D. (1976): Yeast for molasses alcohol. *Process Biochemistry*, 11(3):3.
- ☞ Rose, A.H., Harrison, J.S. (1993): *The Yeasts*. 2nd edn. Vol.5: Yeast Technology. Academic Press, London. pp. 41-48.
- ☞ Rosevear, A., Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. (1987): *Immobilized Enzymes And Cells*. Adam Hilger, p. 264.
- ☞ Roukas, T. (1995): Ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells on the mineral kissiris. *Food Biotechnology*, 9(3): 175-188.
- ☞ Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C., Ruis, H. (1994): The HOG pathway controls osmotic regulations of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae CTT1* gene. *EMBO Journal*, 13:4382-4389.
- ☞ Stryer L. (1997): *Βιοχημεία*. Τόμος 1^{ος}. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, p. 596.
- ☞ Suresh, K., Kiran Sree, N., Venkateswer Rao, L. (1999): Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 68:301-304.
- ☞ Taillandier, P., Cazottes, M.L., Strehaiano, P. (1994): Deacidification of grape musts by *Schizosaccharomyces* entrapped in alginate beads: a continuous-fluidised-bed process. *Chem. Eng. J. Bioch. Eng.*, 55:B29–B33.
- ☞ Tanaka, H., Irie, S., Ochi, H. (1989): A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, 68:216–219.

- ↪ Valcineide, O.A. Tanobea, Thais H.D., Sydenstrickera, Marilda Munarob, Sandro C. Amicoa. (2005): A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). *Polymer Testing*, 24:474–482.
- ↪ Walker, G. M. (1998): *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons, New York, pp. 350.
- ↪ Webb, A. D., Ingraham, J. L. (1963): Fusel oil. *Advances in applied microbiology*, 5:317-353.
- ↪ Winkelmann, G. (1992): *Microbial Degradation of Natural Products*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, p. 420.
- ↪ Wyman, C. (1994): Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45–46:897-915.
- ↪ Wyman, C. (1999): Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Review of Energy & Environment*, 24:189-226.
- ↪ Χριστιάς Χ. (1999): *Μυκητολογία*. Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα, σελ. 208.
- ↪ Yoshioka, K., Hashimoto, N. (1984): Ester formation by brewer's yeast during sugar fermentation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48 (2):333-340.
- ↪ You, K.M., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C. (2003): Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and environmental microbiology*, 69(3):1499-1503.