



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΜΣ: Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: Επεξεργασία, Συντήρηση Και Βιοτεχνολογικές
Διεργασίες Τροφίμων –Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-Οικονομίας**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη της παραγωγής βιοαιθανόλης κατά την ανάπτυξη νέων
στελεχών του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*
καλλιεργούμενων σε ανανεώσιμες σακχαρούχες πρώτες ύλες υπό
αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες**

Ιωάννης Α. Καράλης

**Επιβλέπων Καθηγητής:
Σεραφείμ Παπανικολάου**

**Αθήνα
2020**



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της παραγωγής βιοαιθανόλης κατά την ανάπτυξη νέων στελεχών του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* καλλιεργούμενων σε ανανεώσιμες σακχαρούχες πρώτες ύλες υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

“Study of bioethanol production during the development of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* grown under renewable sugar raw materials under aerobic and anaerobic conditions”

Ιωάννης Α. Καράλης

Εξεταστική Επιτροπή:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Αράπογλου Δημήτρης, Ερευνητής ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

Μάρκου Γεώργιος, Ερευνητής ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ



Μελέτη της παραγωγής βιοαιθανόλης κατά την ανάπτυξη νέων στελεχών του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* καλλιεργούμενων σε ανανεώσιμες σακχαρούχες πρώτες ύλες υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

Τμήμα επιστήμης τροφίμων & διατροφής του ανθρώπου
Εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αυξανόμενη τιμή των προϊόντων πετρελαίου σε συνδυασμό με την αύξηση της απειλής για το περιβάλλον λόγω των εκπομπών καυσαερίων και της υπερθέρμανσης του πλανήτη έχει δημιουργήσει έντονο διεθνές ενδιαφέρον για την ανάπτυξη εναλλακτικών καυσίμων πετρελαίου για κινητήρες κι η αιθανόλη προσδιορίζεται ως ένα από τα πιθανά εναλλακτικά καύσιμα. Η αιθανόλη μπορεί να παράγεται από καλλιέργειες με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, άμυλο ή κυτταρίνη. Μερικές από αυτές τις καλλιέργειες περιλαμβάνουν: ζαχαροκάλαμο, σόργο, καλαμπόκι, κριθάρι, μανιόκα, ζαχαρότευτλα. Εκτός του ότι είναι ανανεώσιμο καύσιμο με βάση τη βιομάζα, η αιθανόλη έχει καθαρότερη καύση και υψηλότερο βαθμό οκτανίων από τα διάφορα φυτικά έλαια. Τα τελευταία χρόνια γίνονται εντατικές προσπάθειες από τους ερευνητές για παραγωγή βιοαιθανόλης που θεωρείται μία υποσχόμενη ανανεώσιμη και ταυτόχρονα εναλλακτική πηγή ενέργειας. Η παρούσα ερευνητική εργασία ειδικότερα, διασφαλίζει κατ' αρχήν σημαντικές πληροφορίες για την συμπεριφορά νέων στελεχών του *S. cerevisiae* στην κατεύθυνση παραγωγής βιοαιθανόλης αλλά παράλληλα, αποτελεί συμβολή στον τομέα της αξιοποίησης με τον ίδιο στόχο ενός φυτού όπως το φραγκόσουκο (*Opuntia ficus indica*, L.), που θεωρείται μία από τις εναλλακτικές καλλιέργειες που προωθούνται τα τελευταία χρόνια και στη χώρα μας. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν φαινόμενα ζύμωσης σε μία προσπάθεια παραγωγής κατά το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας βιοαιθανόλης σε μικρή (αναδευόμενες φιάλες) και μετέπειτα σε μεγάλη κλίμακα (σχετικά μεγάλης κλίμακας εργαστηριακός βιοαντιδραστήρας) με χρήση των νέων, προσφάτως απομονωμένων στελεχών B1, Γ2, Δ3, E1A & Θ1 του *S. cerevisiae* σε υποστρώματα ποικίλης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων (50, 70, 100 & 150 g/L γλυκόζης) σε αερόβιες κι αναερόβιες συνθήκες. Τα δεδομένα που ελήφθησαν, κατ' αρχήν καθορίζουν το προφίλ των στελεχών του σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω συνθήκες. Γενικότερα, το **στέλεχος E1A** καθώς και όλα τα υπόλοιπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν εδώ εκτιμάται πως είναι **ανταγωνιστικά** σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Αυτό προκύπτει, πέρα από το ότι κάνουν αλκοολική ζύμωση, επίσης κι απ' το ότι αποδίδουν σχετικά υψηλές αποδόσεις στο σύνολο τους. Μετά την επιλογή του στελέχους E1A, απ' τα αποτελεσματικότερα στελέχη που μελετήθηκαν, διερευνήθηκε η παραγωγή βιοαιθανόλης στον εργαστηριακό αντιδραστήρα σε μέρη

φυτού προερχόμενα από καλλιέργεια φραγκοσουκιάς (για τα οποία η βιβλιογραφία είναι ανεπαρκής) με τη χρήση του ενζύμου Termamyl στους 30°C σε 150 rpm σε μικροαερόφιλες συνθήκες σε pH ~4,0. Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι: Η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα βιοαιθανόλης σε συγκέντρωση γλυκόζης 150 g/L στις αερόβιες συνθήκες ανήλθε στα 48,24 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,34$ g EtOH/ g υποστρώματος(S) από τον μικροοργανισμό E1A. Ενώ στις αναερόβιες συνθήκες για την ίδια συγκέντρωση σακχάρων η μέγιστη ποσότητα σε αιθανόλη ανήλθε στα 63,44 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,49$ g EtOH/ g υποστρώματος(S) από τον μικροοργανισμό B1. Όσον αφορά στη ζύμωση στον **αντιδραστήρα**, σ' αυτήν επετεύχθηκε μια αρκετά ικανοποιητική ποσότητα **σακχάρων** (~48 g/L) για τα δεδομένα που αφορούν στη φραγκοσουκιά (απ' τα οποία τα 28,5 g/L ήταν γλυκόζη και τα 19,1 g/L φρουκτόζη) τα οποία καταναλώνοντάς τα ο μικροοργανισμός παράγαγε 21,54 g/L **αιθανόλη** με απόδοση: $Y_{EtOH/S}=0,49$ g EtOH/ g υποστρώματος(S). Η μέγιστη ποσότητα **βιομάζας** για το μικροοργανισμό είναι τα 4,35 g/L αποτέλεσμα το οποίο έχει εμφανιστεί αρκετές φορές και στα συνθετικά υποστρώματα με γλυκόζη γεγονός που δείχνει ότι ο μικροοργανισμός δεν παρεμποδίζεται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα ενώ η μέγιστη ποσότητα παραγόμενης γλυκερόλης ήταν 2,02 g/L. Σχετικά με το φυτό της φραγκοσουκιάς θα προτεινόταν περαιτέρω μελέτες προκειμένου να εκτιμηθεί ευρύτερα η βιωσιμότητα της παραγωγής βιομάζας σαν δυναμική για παραγωγή αιθανόλης, ειδικά σε νεοεμφανιζόμενες ποικιλίες φραγκόσουκου.

Επιστημονική περιοχή: Παραγωγή βιοκαυσίμων

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:

Στελέχη *Saccharomyces cerevisiae*, ενζυμική υδρόλυση, βιοαιθανόλη, ένζυμα, φραγκόσουκο (*Opuntia ficus-indica*(L.)).

Study of bioethanol production during the development of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* grown under renewable sugar raw materials under aerobic and anaerobic conditions

Department of food science and human nutrition
Laboratory of food microbiology and biotechnology

ABSTRACT

The rising price of petroleum products combined with the increasing threat to the environment due to exhaust emissions and global warming has generated strong international interest in the development of alternative petroleum fuels for engines and ethanol is identified as one of the possible alternative fuels. Ethanol can be produced from crops high in sugar, starch or cellulose. Some of these crops include: sugar cane, sorghum, corn, barley, cassava, sugar beet. Apart from being a renewable biomass-based fuel, ethanol has a cleaner combustion and a higher octane rating than various vegetable oils. In recent years, intensive efforts have been made by researchers to produce bioethanol, which is considered a promising renewable and at the same time alternative energy source. The present research work, in particular, provides important information in principle about the behavior of new strains of *S. cerevisiae* in the direction of bioethanol production. At the same time, it is a contribution to the field of utilization with the same goal of a plant such as prickly pear (*Opuntia ficus indica*, L.), which is considered one of the alternative crops promoted in recent years in our country. In the present dissertation, fermentation phenomena were studied in an attempt to produce as much bioethanol as possible. The experiments were performed in small (stirred flasks) and later on a large scale (relatively large scale laboratory bioreactor) using the new, recently isolated strains B1, Γ2, Δ3, E1A & Θ1 of *S. cerevisiae* on substrates of varying initial concentration (50, 70, 100 & 150 g/L glucose) in aerobic and anaerobic conditions. The data obtained determine the profile of the fungal strains in the above conditions. In general, the E1A strain as well as all the other strains used in the present study are estimated to be competitive in relation to the literature results. This is due not only to the fact that they do alcoholic fermentation, but also to the fact that they give relatively high yields as a whole. After selection of strain E1A, one of the most effective strains studied, the production of bioethanol in the laboratory reactor in plant parts derived from prickly pear cultivation (for which the literature is insufficient) was investigated using Termamyl enzyme at 30°C at 150 rvm microaerophilic conditions at pH 4. The study of the results showed that: The maximum amount of bioethanol produced at a glucose concentration of 150 g/L in aerobic conditions was 48.24 g/L with a yield $Y_{EtOH/S} = 0.34$ g EtOH / g substrate (S) by the microorganism E1A. While under anaerobic conditions for the same concentration of sugars the maximum amount in ethanol was 63.44 g/L with yield $Y_{EtOH/S} = 0.49$ g EtOH / g of substrate (S) from microorganism B1. Regarding the fermentation in the reactor, a sufficiently satisfactory amount of sugars (~ 48 g/L)

was obtained for the prickly pear data (of which 28.5 g/L was glucose and 19.1 g/L fructose) which by consuming them the microorganism produced 21.54 g / L ethanol with yield: $Y_{EtOH / S} = 0.49 \text{ g EtOH / g substrate (S)}$. The maximum amount of biomass for the microorganism is 4.35 g/L, an effect which has occurred several times in synthetic substrates with glucose, which shows that the microorganism is not inhibited by this substrate while the maximum amount of glycerol produced was 2.02 g/L. Regarding the prickly pear plant, further studies would be proposed in order to assess more broadly the viability of biomass production as a potential for ethanol production, especially in emerging prickly pear varieties.

Scientific area : Biofuels production

KEY WORDS

Saccharomyces cerevisiae strains, enzymatic hydrolysis, bioethanol, enzymes, prickly pear (*Opuntia ficus – indica* (L.)).

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή υλοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ) «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων» του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στην κατεύθυνση «Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων - Ανάπτυξη Προϊόντων Βιοοικονομίας».

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε εν μέρει στο ΓΠΑ στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων αλλά κυρίως στο ΙΤΑΠ (Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων) και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Τροφίμων & Αξιοποίησης Γεωργικών Υποπροϊόντων.

Στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής συνέβαλαν καθοριστικά αρκετά άτομα τα οποία θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως.

Κατ'αρχήν, ευχαριστώ τον κ. Παπανικολάου, καθηγητή στο ΓΠΑ κι επιβλέποντα της διπλωματικής μου για τη διδασκαλία του στη διάρκεια του μεταπτυχιακού, για την συνεργασία μας συνολικά, καθώς και την εμπιστοσύνη του σε μένα ώστε να μου αναθέσει το παρόν, εξαιρετικά ενδιαφέρον θέμα.

Ιδιαίτερα, πρέπει να σταθώ στον ερευνητή του ΕΛΓΟ Δρ. Αράπογλου Δημήτρη για την καθοδήγησή του στο επιστημονικό κομμάτι, τις αξιόλογες παρατηρήσεις του, τη διασφάλιση της αναγκαίας εργαστηριακής υποδομής για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων και το φιλικό κλίμα που μαζί με τα λοιπά μέλη του εργαστηρίου συντέλεσαν να υπάρξει.

Επίσης, ευχαριστώ τον ερευνητή Δρ. Μάρκου Γιώργο για την πολύτιμη και πολλαπλή στήριξη και τις χρήσιμες επιστημονικές υποδείξεις στη διενέργεια των πειραμάτων κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Τον κ. Ηλιόπουλο Χρήστο, Γεωπόνο, υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου για τη βοήθειά του όπου απαιτήθηκε.

Επίσης, το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γ.Π.Α (υπεύθυνοι συλλογής : Καθηγητής Ε. Δροσινός και Δρ. Σ. Παραμυθιώτης) για την προσφορά σε μας των στελεχών που μελετήθηκαν στα πειράματά μας καθώς και τις κ. Βιβή Μερκούρη & Ελένη Λαμπρινέα του εργαστηρίου φυσικοχημικών αναλύσεων του ΙΤΑΠ και την κ. Ουρανία Καλατζή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων στο ΓΠΑ για τη βοήθειά τους στην πραγματοποίηση των αναλύσεων στην HPLC.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την στήριξη στην προσπάθειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιοκαύσιμα	18
1.1. Ιστορική Αναδρομή	18
1.1.1. Φαινόμενο θερμοκηπίου	19
1.1.2. Πρωτόκολλο Κιότο	21
1.1.3. Νομικό πλαίσιο της Ε.Ε για τα βιοκαύσιμα	22
1.2. Είδη βιοκαυσίμων	23
1.2.1. Βιοαιθανόλη	24
1.3. Βιομάζα που προορίζεται για την παραγωγή βιοκαυσίμων	28
1.4. Πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης	30
1.5. Μέθοδοι επεξεργασίας-προεπεξεργασίας πρώτων υλών	36
1.5.1. Προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας	36
1.5.2. Φυσικές μέθοδοι	37
1.5.3. Φυσικοχημικές μέθοδοι	38
1.5.4. Χημικές μέθοδοι	38
1.5.5. Βιολογικές μέθοδοι	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ζύμες	42
2.1. Χημική σύσταση των ζυμών	43
2.2. Φάσεις αυξητικού κύκλου ζωής των ζυμών	43
2.3. Προσαρμοστικότητα των ζυμομυκήτων στο περιβάλλον ανάπτυξής τους	44
2.4. Φυσιολογία ζυμομυκήτων	45
2.5. Χαρακτηριστικά του είδους του <i>S.cerevisiae</i>	46
2.6. Φαινόμενα που σχετίζονται με τις συνθήκες ζύμωσης	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιοχημικοί κύκλοι	49
3.1. Γλυκόλυση EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS	49
3.2. Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση	51
3.3. Κυτταρική αναπνοή-Κύκλος κιτρικού οξέος ή κύκλος Krebs	52
3.4. Αλκοολική ζύμωση	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Φραγκοσουκιά (<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.): Μία εναλλακτική καλλιέργεια	54

4.1. Ιστορική αναδρομή	54
4.2. Η καλλιέργεια της φραγκοσυκιάς στην Ελλάδα	55
4.3 Στρεμματικές αποδόσεις	56
4.4. Χημική σύσταση κλαδωδίου, καρπού φραγκοσυκιάς & των σπόρων του	56
4.5. Αξιοποίηση διαφόρων μερών της φραγκοσυκιάς	57
4.6. Βοτανικά χαρακτηριστικά φυτού φραγκοσυκιάς	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Πειραματικό μέρος	62
5.1. Υλικά και μέθοδοι	63
5.2. Μικροοργανισμοί	71
5.3. Χρήσεις τμημάτων του φυτού φραγκοσυκιάς (<i>Opuntia ficus indica</i> , L., κλαδωδίων & φρούτων)	75
5.3.1. Διαχείριση κλαδωδίων φραγκοσυκιάς	75
5.3.2. Μέθοδοι εξαγωγής αναγόντων σακχάρων σε υπόστρωμα φραγκοσυκιάς	76
5.3.3. Επεξεργασία με υδρόλυση	76
5.4. Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα-Συζήτηση	80
6.1. Αερόβιες συνθήκες (για συγκέντρωση γλυκόζης 150 g/L)	81
6.2. Αναερόβιες συνθήκες (για συγκέντρωση γλυκόζης 150 g/L)	92
6.3. Συγκριτικά κινητικά αποτελέσματα στις λοιπές συγκεντρώσεις (50, 70, 100 g/L) στις αερόβιες & αναερόβιες συνθήκες (max Ethanol, max Glycerol)	103
7. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά μερών του φυτού της φραγκοσυκιάς (<i>Opuntia ficus indica</i>, L.)	109
7.1. Διάφοροι χειρισμοί στα μέρη του φυτού φραγκοσυκιάς	111
7.2 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού <i>S.cerevisiae</i> E1A σε υπόστρωμα με τμήματα του φυτού της φραγκοσυκιάς (<i>Opuntia ficus indica</i> , L.) σε αερόβιες συνθήκες στον αντιδραστήρα	114
7.3. Συμπεράσματα	117
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	122
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (Αποτελέσματα λοιπών συγκεντρώσεων σακχάρων)	133
8.1. Αερόβιες συνθήκες	134
8.2. Αναερόβιες συνθήκες	162
ΠΙΝΑΚΕΣ	
1.2.1.2 1. Χαρακτηριστικά αιθανόλης	27
1.3.2. Μετατροπή αγροτικών πρώτων υλών σε υγρά βιοκαύσιμα	29
3.3.3. Αντιδράσεις του Krebs και τα αντίστοιχα ένζυμα	53

4.4.4. Συστατικά των κλαδωδίων & του καρπού της φραγκοσουκιάς (g/g)	56
4.4.5. Συστατικά των σπόρων του καρπού της φραγκοσουκιάς (g/g)	57
5.1.6.6. Αραιώσεις δείγματος	69
5.1.6.2.7: Διαδικασία εύρεσης αιθανόλης στο δείγμα	69
5.2.3.8. Σύσταση θρεπτικού υλικού για την καλλιέργεια	74
5.3.3.2.9. Συνθήκες κατά τη χρήση ενζύμων	77
5.3.3.2.10. Συνδυασμοί ενζύμων – υποστρώματος	78
6.3.11. Αλκοολική ζύμωση των στελεχών του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αερόβιες συνθήκες	103
6.3.12. Αλκοολική ζύμωση των στελεχών του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αναερόβιες συνθήκες	103
6.3.13. Αλκοολική ζύμωση των στελεχών του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αερόβιες συνθήκες	104
6.3.14. Αλκοολική ζύμωση στελεχών του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αναερόβιες συνθήκες	105
6.3.15. Αλκοολική ζύμωση των μικροοργανισμών <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αερόβιες συνθήκες	106
6.3.16. Αλκοολική ζύμωση των μικροοργανισμών <i>S. cerevisiae</i> σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αναερόβιες συνθήκες	107
7.17. Σύσταση σε σάκχαρα χυμού κλαδωδίου φραγκοσουκιάς (% w/ FM)	110
7.18. (%) Μ.Ο Πρωτεϊνών, Τέφρας, Ινωδών (επί ξηρού) & υγρασίας	111
7.1.1.19. Μέτρηση σακχάρων μετά από διάφορες επεξεργασίες	112
7.1.2.20. Συνδυασμοί ενζύμων-υποστρώματος	113
7.3. 21. Συγκριτικά αποτελέσματα με άλλες μελέτες	119
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ -Πίνακες	
8.1.1.22. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> E1A σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	135
8.1.1.23. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. Cerevisiae</i> Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	137
8.1.3.24. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	139
8.1.4.25. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	141
8.1.5.26. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Β1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	143
8.1.1.1.27. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> E1A σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	145
8.1.1.1.28. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε	147

υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	
8.1.1.3.29. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	149
8.1.1.4.30. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	151
8.1.1.5.31. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Β1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	152
8.1.1.1.32. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Ε1Α σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	154
8.1.1.1.2.33. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	156
8.1.1.1.3.34. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	158
8.1.1.1.4.35. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	159
8.1.1.1.5.36. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Β1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αερόβιες συνθήκες.	161
8.2.1.37. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Ε1Α σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	163
8.2.2.38. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	164
8.2.3.39. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	166
8.2.4.40. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	167
8.2.5.41. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Β1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (50 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	169
8.2.1.1.42. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Ε1Α σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	170
8.2.1.2.43. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	172
8.2.1.3.44. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	173
8.2.1.4.45. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	175
8.2.1.5.46. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Β1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (70 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	176
8.2.1.1.1.47. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Ε1Α σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	178
8.2.1.1.1.2.48. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	179
8.2.1.1.1.3.49. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	181
8.2.1.1.1.4.50. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	182
8.2.1.1.1.5.51. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου <i>S. cerevisiae</i> Β1 σε υπόστρωμα γλυκόζης (100 g/L γλυκόζη) υπό αναερόβιες συνθήκες.	184
ΕΙΚΟΝΕΣ	
1.1.1.1. Κατανομή ηλιακής ακτινοβολίας στη γήινη ατμόσφαιρα & έδαφος.	20

1.1.1.2. Αέρια που συμβαλλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου.	20
1.3.2.3. Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από διάφορες κατηγορίες βιομάζας.	30
1.4.4. Σακχαροκάλαμο	31
1.4.5. Σακχαρότευτλο	31
1.4.6. Γλυκό σόργο	32
1.4.7. Αραβόσιτος	33
1.4.8. Κενάφ	33
1.4.9. Αγριαγκινάρα	34
1.4.10. Ευκάλυπτος	34
1.4.11. Ψευδακακία	35
1.4.12. Βιοαντιδραστήρες πολυαιθυλενίου μίας χρήσης 300L για καλλιέργεια μικροφυκών Plagton S.A.	36
1.5.1.13. Επίτευξη σπασίματος της δομής βιομάζας στα επιμέρους συστατικά μετά από προκατεργασία της: κυτταρίνη (πορτοκαλί χρώμα), ημικυτταρίνη (πράσινο χρώμα) και λιγνίνη (κόκκινο χρώμα)	37
2.2.14. Αυξητικοί κύκλοι ζωής ζυμών	44
3.1.15. Γλυκόλυση	51
3.3.16. Κύκλος Krebs	52
4.1.17. Φραγκοσουκιά (<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.)	55
4.6.18. Τρία είδη του φραγκόσουκου (βάση του χρώματος)	60
5.2.19. Χρησιμοποιούμενα στελέχη μικροοργανισμού	71
5.2.1.20. Παρασκευή προκαλλιέργειας	72
5.2.2.21. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλία	73
5.2.2.22. Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας σε αναερόβιες συνθήκες	75
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	
6.1.1.1. Παραγωγή βιομάζας & κατανάλωση γλυκόζης από το στέλεχος E1A του <i>S.cerevisiae</i>	81
6.1.1.2. Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη από το E1A του <i>S.cerevisiae</i>	82
6.1.1.3. Ενδοπολυσακχαρίτες (%) κατά αλκοολική ζύμωση του E1A με C=150 g/L γλυκόζη	82
6.1.2.4. Παραγωγή βιομάζας & κατανάλωση γλυκόζης από το στέλεχος G2 του <i>S.cerevisiae</i>	83
6.1.2.5. Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη από το G2 του <i>S.cerevisiae</i>	84
6.1.2.6. Ενδοπολυσακχαρίτες (%) κατά την αλκοολική ζύμωση του G2 με C=150 g/L γλυκόζη	84
6.1.3.7. Παραγωγή βιομάζας & κατανάλωση γλυκόζης από το στέλεχος Θ1 του <i>S.cerevisiae</i>	85
6.1.3.8. Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για Θ1 του <i>S.cerevisiae</i>	86
6.1.3.9. Ενδοπολυσακχαρίτες (%) κατά την αλκοολική ζύμωση του Θ1 με C=150 g/L γλυκόζη	87
6.1.4.10. Παραγωγή βιομάζας & κατανάλωση γλυκόζης από στέλεχος Δ3 του <i>S.cerevisiae</i>	87
6.1.4.11. Παραγόμενη αιθανόλη & γλυκερόλη για το στέλεχος Δ3 του <i>S.cerevisiae</i>	88
6.1.4.12. Ποσοστά ενδοπολυσακχαριτών κατά την αλκοολική ζύμωση του	89

<i>S.cerevisiae</i> Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L (Γλυκόζη).	
6.1.5.13: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> B1	90
6.1.5.14: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο B1	90
6.1.5.15: Ποσοστά ενδοπολυσακχαριτών κατά την αλκοολική ζύμωση του <i>S. cerevisiae</i> B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L(Γλυκόζη).	91
6.2.1.16: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> E1A	92
6.2.1.17: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο E1A	93
6.2.1.18: Ποσοστά ενδοπολυσακχαριτών κατά την αλκοολική ζύμωση του <i>S. cerevisiae</i> E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g /L(Γλυκόζη)	93
6.2.2.19: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Γ2	94
6.2.2.20: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Γ2	95
6.2.2.21: Ποσοστά ενδοπολυσακχαριτών κατά την αλκοολική ζύμωση του <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L (Γλυκόζη)	95
6.2.3.22: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Θ1	96
6.2.3.23: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Θ1	97
6.2.3.24: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S.cerevisiae</i> Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη).	97
6.2.4.25: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Δ3	98
6.2.4.26: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Δ3	99
6.2.4.27: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη)	99
6.2.5.28: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> B1	100
6.2.5.29: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο B1	101
6.2.5.30: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη)	101
7.31: Χρωματογράφημα ανάλυσης σακχάρων με HPLC χυμού κλαδωδίου	110
7.2.32: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> E1A	114
7.2.33: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο E1A	115
7.2.34: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα από μέρη Φραγκοσυκιάς.	116
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-Διαγράμματα	
8.1.1.34: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ος <i>S. cerevisiae</i> E1A	134

8.1.1.35: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	135
8.1.2.36: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Γ2	136
8.1.2.37: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	137
8.1.3.38: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Θ1	138
8.1.3.39: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	139
8.1.4.40: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Δ3	140
8.1.4.41: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	141
8.1.5.42: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> B1	142
8.1.5.43: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	143
8.1.1.1.44: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> E1A	144
8.1.1.1.45: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L(Γλυκόζη)	145
8.1.1.2.46: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Γ2	146
8.1.1.2.47: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)	147
8.1.1.3.48: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Θ1	148
8.1.1.3.49: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)	149
8.1.1.4.50: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Δ3	150
8.1.1.4.51: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L(Γλυκόζη)	150
8.1.1.5.52: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> B1	151
8.1.1.5.53: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)	152
8.1.1.1.1.54: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> E1A	153
8.1.1.1.1.55: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών % στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	154

8.1.1.1.2.56: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Γ2	155
8.1.1.1.2.57: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	156
8.1.1.1.3.58: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Θ1	157
8.1.1.1.3.59: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	157
8.1.1.1.4.60: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Δ3	158
8.1.1.4.61: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	159
8.1.1.1.5.62: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> B1	160
8.1.1.1.5.63: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών (%) στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	161
8.2.1.64: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. Cerevisiae</i> E1A	162
8.2.1.65: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	162
8.2.2.66: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Γ2	163
8.2.2.67: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	164
8.2.3.68: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Θ1	165
8.2.3.69: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	165
8.2.4.70: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Δ3	166
8.2.4.71: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	167
8.2.5.72: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> B1	168
8.2.5.73: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)	168
8.2.1.1.74: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> E1A	169
8.2.1.1.75: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)	170
8.2.1.2.76: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Γ2	171
8.2.1.2.77: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική	171

συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)	
8.2.1.3.78: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Θ1	172
8.2.1.3.79: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)	173
8.2.1.4.80: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Δ3	174
8.2.1.4.81: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)	174
8.2.1.5.82: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> B1	175
8.2.1.5.83: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)	176
8.2.1.1.1.84: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> E1A	177
8.2.1.1.1.85: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	177
8.2.1.1.1.86: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Γ2	178
8.2.1.1.1.87: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	179
8.2.1.1.1.3.88: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Θ1	180
8.2.1.1.1.3.89: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	180
8.2.1.1.1.4.90: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> Δ3	181
8.2.1.1.1.4.91: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	182
8.2.1.1.1.5.92: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο <i>S. cerevisiae</i> B1	183
8.2.1.1.1.5.93: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού <i>S. cerevisiae</i> B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)	184

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο άνθρωπος, όντας δραστήριο ον, επιδιώκει να εξελίσσεται για την επιβίωσή του καθώς και για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του. Έτσι, στο πέρασμα των αιώνων, προκειμένου να καλύψει όλες τις ανάγκες για εξέλιξη, έκανε χρήση όλων των αγαθών που του παρείχε η φύση, επιτυγχάνοντας να κάνει τεράστιες ανακαλύψεις προς όφελος της ανθρωπότητας. Όμως, απόρροια αυτών των προσπαθειών ήταν η εκμετάλλευση όλων των πόρων να γίνεται υπέρμετρα κι αλόγιστα, γεγονός το οποίο οδήγησε ώστε πολλοί απ' αυτούς να μη βρίσκονται πλέον σε αφθονία. Πέραν της ελάττωσης των φυσικών πόρων, τη χρήση και καύση πόρων, όπως το πετρέλαιο κι άλλων ουσιών με βάση τον άνθρακα, συντέλεσε στην εκπομπή καταστρεπτικών για το ανθρώπινο είδος αλλά και για το περιβάλλον ουσιών, με χαρακτηριστικότερο και πιο γνωστό παράδειγμα αυτό του διοξειδίου του άνθρακα. Όσον αφορά στην ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα πριν τη βιομηχανική επανάσταση η συγκέντρωσή του στην ατμόσφαιρα ήταν περίπου 280 ppm και η μέση θερμοκρασία της γης ήταν περίπου στους 15 βαθμούς. Μετά την έναρξη χρήσης των ορυκτών καυσίμων και σταδιακά, οι συγκεντρώσεις του διοξειδίου του άνθρακα αυξήθηκαν κι από 315 ppm τη δεκαετία του '50 ανήρθαν στην σημερινή εποχή στα 380 ppm. Παρατηρείται δηλαδή μια ετήσια αύξηση περίπου 2ppm ανά χρόνο. Με την αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα εξαιτίας του φαινομένου του θερμοκηπίου προκλήθηκε ταυτόχρονα κι αύξηση της μέσης θερμοκρασίας της γης. Υπολογίζεται πλέον ότι στην επιφάνεια της γης παγιδεύεται ενέργεια σε θερμότητα από το διοξείδιο του άνθρακα η οποία αντιστοιχεί περίπου σε 2 Watt ανά τετραγωνικό μέτρο επιφάνειας της γης.

Σαν αποτέλεσμα, μεταβάλλονται οι ισορροπίες στον πλανήτη όσον αφορά στο κλίμα και να προκαλούνται ακραία καιρικά φαινόμενα, όπως λιώσιμο πάγων, ξηρασίες, πυρκαγιές κλπ επιφέροντας τεράστιες περιβαλλοντικές, οικονομικές και κοινωνικές μεταβολές.

Τα περισσότερα περιβαλλοντικά προβλήματα ξεκινούν από τη χρήση παραδοσιακών πηγών ενέργειας. Όταν έγινε αντιληπτό το μέγεθος της καταστροφής που προκαλείται στο περιβάλλον από την αποκλειστική χρήση του πετρελαίου σαν πηγή ενέργειας στο συνολικό όγκο των ανθρώπινων δραστηριοτήτων σε καθημερινή βάση, οδήγησε επειγόντως τις κυβερνήσεις καθώς και την επιστημονική κοινότητα να ερευνήσουν και να εφαρμόσουν καινούριες μεθόδους για την παραγωγή ενέργειας (Sarris & Παπανικόλαου, 2016).

Άμεσο ενδιαφέρον δόθηκε στα μέσα μεταφοράς καθώς αποτελούν τον κυριότερο παράγοντα ρύπανσης του περιβάλλοντος επειδή χρησιμοποιούν ορυκτά καύσιμα για την κίνησή τους. Η Ε.Ε. έχει θέσει σαν στόχο μέχρι το 2021 να μειώσει τις εκπομπές στα αέρια του θερμοκηπίου μέχρι το επίπεδο των 95 g/km, έπειτα στοχεύουν στην περαιτέρω μείωση των αερίων σε επίπεδα που φτάνουν τα 68 με 78 g/km μέχρι το 2025.

Η ευθύνη αντιμετώπισης τέτοιων θεμάτων μαζί με τη μείωση των πόρων ορυκτής ενέργειας οδήγησε διεθνώς στην αναζήτηση εναλλακτικών ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, όπως οι φυτικές, εστιάζοντας στη βιομηχανία παραγωγής βιοκαυσίμων.

Ο στόχος της Ευρωπαϊκής Κοινότητας ειδικότερα, είναι μέχρι το 2030 να έχουν μειωθεί οι εκπεμπόμενες ποσότητες του διοξειδίου του άνθρακα στο 22%

(European Commission, Climate Action) (Χατζηαντωνίου και Δαβόρας, 2012; Γεντίκης, 2017).

Σκοπός και αντικείμενο μελέτης: Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση δυνατότητας παραγωγής βιοαιθανόλης σε εργαστηριακή (αναδευόμενες φιάλες) και μετέπειτα σε μεγαλύτερη κλίμακα (σχετικά μεγάλης κλίμακας εργαστηριακός βιοαντιδραστήρας) με τη χρήση νέων, προσφάτως απομονωμένων στελεχών σακχαρομυκήτων σε συνθετικά υποστρώματα γλυκόζης και κατόπιν σε μέρη του φυτού προερχόμενα από καλλιέργεια φραγκόσουκου.

Η αιθανόλη θεωρείται μια πολύ σημαντική μορφή ενέργειας χάρη στα περιβαλλοντικά και κοινωνικό-οικονομικά οφέλη που προσφέρει. Η παραγωγή της αιθανόλης σε βιομηχανική κλίμακα από τοπικές παραγωγικές μονάδες μπορεί να μειώσει την εξάρτηση από τις εισαγωγές πετρελαίου, δημιουργώντας παράλληλα νέες επαγγελματικές προοπτικές. Επιπρόσθετα, σημαντικό πλεονέκτημα της αιθανόλης είναι το γεγονός ότι σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα, αποτελεί μια ανεξάντλητη φυσική πηγή ενέργειας καθώς οποιοδήποτε υλικό που περιέχει σάκχαρα μπορεί να αποτελέσει πηγή παραγωγής της.

Επομένως, η παρούσα διατριβή κυρίως στοχεύει στο να μελετηθεί η ζύμωση διαφορετικών νέων στελεχών σακχαρομυκήτα σε υποστρώματα ποικίλης αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Επίσης, μελετάται και η δυνατότητα παραγωγής βιοαιθανόλης από χυμό αλλά και κλαδώδια φραγκοσουκιάς (για τα οποία η βιβλιογραφία είναι περιορισμένη), με το επιλεγμένο στο πρώτο στάδιο, στέλεχος *S. cerevisiae*. Η βιομάζα των κλαδωδίων και φρούτων φραγκοσουκιάς αποτελεί μια δυναμική πρώτη ύλη για ζυμώσεις με ιδιαίτερη σημασία για ημι-και άνυδρες περιοχές. Με δεδομένο το πρόβλημα της διαρκούς μείωσης του νερού διεθνώς, η επέκταση της καλλιέργειας φραγκοσουκιάς θα μπορούσε να είναι ενδιαφέρουσα για την τόνωση της αγροτικής οικονομίας στις αναπτυσσόμενες χώρες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιοκαύσιμα

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Η χρησιμοποίηση των βιοκαυσίμων σαν καύσιμο για τα μεταφορικά μέσα δεν είναι ένα πρόσφατο εγχείρημα καθώς η ιστορία αυτών αρχίζει πριν από περίπου έναν αιώνα όταν ο Δρ. Rudolf Diesel κατασκεύασε τον Αύγουστο του 1893 τον κινητήρα diesel χρησιμοποιώντας ως καύσιμο το αραχιδέλαιο. Το 1912 ο Δρ Rudolf Diesel δήλωσε ότι: "Η χρήση φυτικών ελαίων σαν καύσιμα μηχανών φαίνεται ασήμαντη σήμερα. Όμως τέτοια έλαια μπορεί να γίνουν με την πάροδο του χρόνου τόσο σημαντικά όσο σήμερα το πετρέλαιο και το κάρβουνο». Τελικά, καθιερώθηκε η χρήση του πετρελαίου (diesel) καθώς βρισκόταν σε μεγαλύτερες ποσότητες αλλά ταυτόχρονα η παραγωγή του ήταν πιο οικονομική αλλά και πιο εύκολη σε σχέση με αυτή των φυτικών ελαίων. Ο Nikolaus August Otto εφηύρε τον κινητήρα Otto ο οποίος λειτουργούσε μόνο με αιθανόλη. Ο Henry Ford κατασκεύασε το αμάξι Ford Mode IT με σκοπό να καταναλώνει αποκλειστικά αιθανόλη. Κατά το διάστημα του δεύτερου παγκοσμίου πολέμου οι δυνάμεις του άξονα αντιμετώπιζαν ελλείψεις στα υγρά καύσιμα (κυρίως πετρελαίου) που τους

δυσκόλευε στην επίτευξη των σχεδίων τους, οπότε αναγκάστηκαν να στραφούν σε έρευνες έτσι ώστε να αντικαταστήσουν το πετρέλαιο με φυτικά έλαια. Η εύρεση κοιτασμάτων πετρελαίου στην Αμερική μείωσε σημαντικά την τιμή του πετρελαίου οδηγώντας τις αυτοκινητοβιομηχανίες στη δημιουργία οχημάτων που χρησιμοποιούν καύσιμα πετρελαϊκής προέλευσης. Μέχρι το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο τα βιοκαύσιμα χρησιμοποιούνταν ως εναλλακτικό καύσιμο του πετρελαίου στα οχήματα. Όμως, μετά το τέλος του πολέμου το φθηνότερο πετρέλαιο της Μέσης Ανατολής μείωσε τη ζήτηση των βιοκαυσίμων. Οι πετρελαϊκές κρίσεις του 1973 και 1979 επανέφερε στο προσκήνιο τα βιοκαύσιμα γεγονός που διήρκεσε μέχρι το 1996 και οδήγησε σε σημαντική μείωση της τιμής του πετρελαίου. Ο υπερδιπλασιασμός της τιμής του πετρελαίου στο διάστημα από 1998 - 2006 αλλά και οι περιβαλλοντικές απαιτήσεις που δημιουργήθηκαν από το πρωτόκολλο του Κιότο δημιούργησαν χώρο για την εδραίωση μιας πολλά υποσχόμενης βιομηχανίας παραγωγής βιοκαυσίμων σε παγκόσμια κλίμακα (Αρχοντοπούλου, 2010).

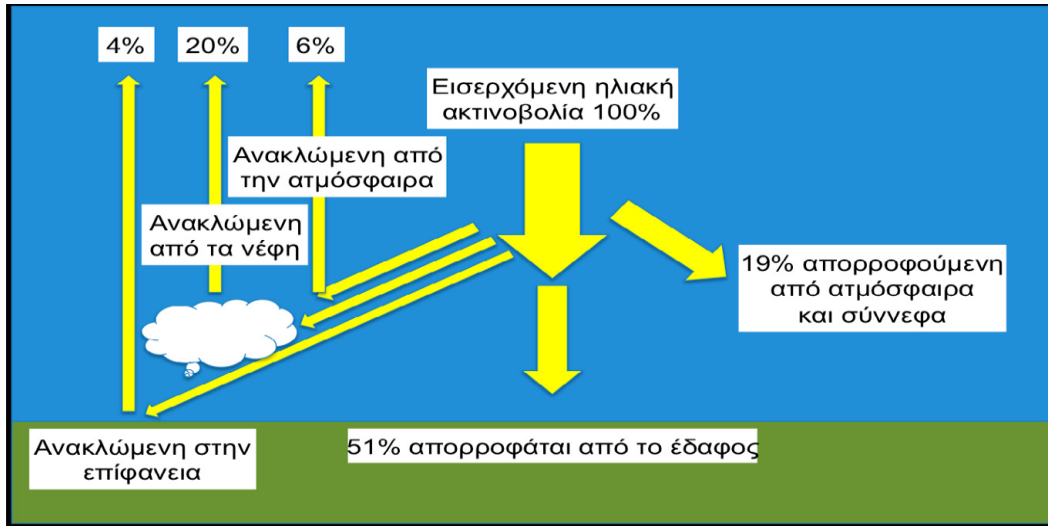
1.1.1. Φαινόμενο του θερμοκηπίου

Ο ανθρώπινος πολιτισμός στην πορεία της βιομηχανικής ανάπτυξης, άντλησε από τη γη κοιτάσματα πετρελαίου και άνθρακα και τα χρησιμοποίησε ως πρώτη ύλη για να κινήσει τον βιομηχανικό πολιτισμό. Με την καύση των κοιτασμάτων αυτών αύξησε την ποσότητα του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα σε σχέση μ' αυτήν που φυσιολογικά υπάρχει από τη διαδικασία της αναπνοής των φυτών και των ζώων.

Από την επιφάνεια της γης και σε απόσταση 25km απ' αυτήν (στρατόσφαιρα) βρίσκεται ένα λεπτό στρώμα το οποίο αποτελείται κυρίως από διοξείδιο του άνθρακα το οποίο συμπεριφέρεται σαν γυαλί θερμοκηπίου δηλαδή ενώ εισέρχεται η θερμότητα που μεταφέρεται με την υπεριώδη ακτινοβολία του ηλίου εμποδίζεται η έξοδος της προς το διάστημα συνθέτοντας έτσι το **φαινόμενο του θερμοκηπίου** (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015).

Η υπεριώδης ακτινοβολία θερμαίνει την επιφάνεια της γης, η οποία τελικά εκπέμπει υπέρυθη ακτινοβολία αντί για υπεριώδη, έτσι μόνο ένα μέρος αυτής μπορεί και περνά αυτό το στρώμα. Με αυτό τον τρόπο η γη δεσμεύει μια ποσότητα θερμότητας και διατηρεί έτσι τη μέση θερμοκρασία της σταθερή γύρω στους 15°C με αποτέλεσμα να δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για την ύπαρξη ζωής στην επιφάνεια της. Η γήινη ατμόσφαιρα συμπεριφέρεται με τον τρόπο αυτό ως μία δεύτερη, μαζί με τον Ήλιο, πηγή θερμότητας. Ειδικότερα, η γη δέχεται συνολικά ηλιακή ακτινοβολία που φθάνει περίπου τα 1366 Watt ανά τετραγωνικό μέτρο, στο όριο της ατμόσφαιρας. Ένα μέρος αυτής απορροφάται από το σύστημα Γης-ατμόσφαιρας, ενώ το υπόλοιπο διαφεύγει στο διάστημα. Περίπου το 30% της εισερχόμενης ηλιακής ακτινοβολίας ανακλάται, σε ποσοστό 6% από την ατμόσφαιρα, 20% από τα νέφη και 4% από την επιφάνεια της Γης.

Το 70% της ηλιακής ακτινοβολίας απορροφάται, κατά 16% από την ατμόσφαιρα (συμπεριλαμβανομένου και του στρατοσφαιρικού στρώματος του όζοντος), κατά 3% από τα νέφη και κατά το μεγαλύτερο ποσοστό (51%) από την επιφάνεια και τους ωκεανούς (εικόνα 1.1.2.1).

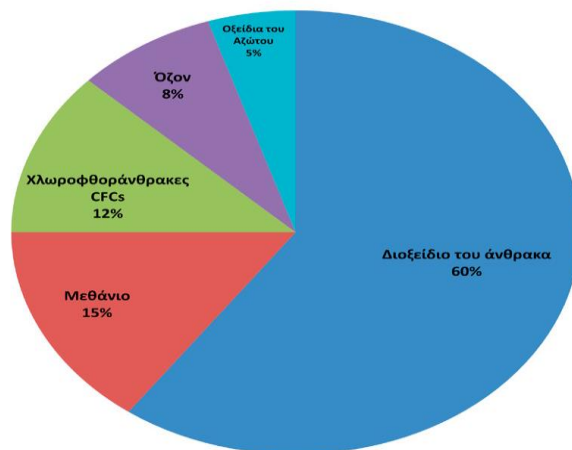


Εικόνα 1.1.1.1: Κατανομή ηλιακής ακτινοβολίας στη γήινη ατμόσφαιρα και έδαφος (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015)

Η συσσώρευση καυσαερίων στο στρώμα ανάκλασης της υπέρυθρης ακτινοβολίας που εκπέμπει η γη λόγω της θερμοκρασίας που έχει η επιφάνεια της, αναγκάζει την ακτινοβολία αυτή να παγιδεύεται μεταξύ στρώματος καυσαερίων και εδάφους.

Πλέον η επιφάνεια αλλά και η ατμόσφαιρα της γης δεν ψύχονται λόγω του ότι ένα μικρό ποσοστό ακτινοβολίας διέρχεται από το στρώμα με αποτέλεσμα να αυξάνεται η θερμοκρασία τους λόγω της υπέρυθρης ακτινοβολίας που παγιδεύεται σ αυτό.

Όλα τα αέρια συστατικά της ατμόσφαιρας που συμβάλλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου, αναφέρονται συνολικά με τον όρο **αέρια του θερμοκηπίου**. Αυτά απορροφούν την υπέρυθρη ακτινοβολία θερμαίνοντας έτσι την επιφάνεια της γης.



Εικόνα 1.1.1.2: Αέρια που συμβαλλουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015)

Ορισμένα αέρια, όπως το όζον, παρουσιάζουν αδιαφάνεια και στην ηλιακή ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να απορροφούν ένα μέρος της, συμβάλλοντας σε ένα βαθμό και στην ψύξη της γήινης επιφάνειας. Περίπου το 86% της κατακρατούμενης από την ατμόσφαιρα γήινης ακτινοβολίας, οφείλεται στην παρουσία υδρατμών (H₂O), διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και νεφών. Οι υδρατμοί αποτελούν το πλέον ενεργό συστατικό, κατά ποσοστό 60%, ενώ μικρότερη συνεισφορά έχουν και τα αέρια μεθανίου (CH₄), οξειδίου του αζώτου (N₂O) και όζοντος (O₃) (περίπου 8%).

Αυτό είναι απολύτως φυσικό αλλά εντείνεται από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες οι οποίες συντελούν στην υπερμετρη αύξηση των αερίων του θερμοκηπίου καθώς και την απελευθέρωση άλλων ενώσεων όπως είναι οι χλωροφθοράνθρακες που συγκεντρώνονται στην ατμόσφαιρα (CFC's). Τα τελευταία χρόνια, καταγράφεται μία αύξηση στην συγκέντρωση αρκετών αερίων του θερμοκηπίου, και έτσι τα επίπεδα των θερμοκηπικών αερίων στην ατμόσφαιρα είναι τα υψηλότερα των τελευταίων 500.000 ετών. Πιο συγκεκριμένα, το διοξείδιο του άνθρακα αυξήθηκε κατά 80 % τα τελευταία 40 χρόνια. Το 75% του διοξειδίου του άνθρακα προέρχεται από τη χρήση ορυκτών καυσίμων ενώ το υπόλοιπο μέρος προέρχεται από διαφοροποιήσεις που γίνονται στο έδαφος και κυρίτερα με την αποψίλωση των δασών. Είναι τρομακτικό το γεγονός ότι μέσα σε μερικές δεκαετίες ανθρωπογενών δραστηριοτήτων καταστράφηκαν τόσο μεγάλες ποσότητες όζοντος στην στρατόσφαιρα όσο χρειάστηκε να παράξει η φύση μέσα σε 1 δισεκατομμύριο χρόνια, ενώ απελευθέρωσε τόσο διοξείδιο του άνθρακα, όσο απορρόφησε η φύση με τη φωτοσύνθεση περίπου στο πρώτο ενάμισι δισεκατομμύριο χρόνια από τη δημιουργία (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015).

1.1.2. Πρωτόκολλο του Κιότο

Το **Πρωτόκολλο του Κιότο** ([https:// el.wikisource.org / wiki](https://el.wikisource.org/wiki/unfccc.int); [https:// unfccc.int](https://unfccc.int); <https://el.wikipedia.org/wiki>) αποτελεί «οδικό χάρτη», στον οποίο περιλαμβάνονται τα απαραίτητα βήματα για τη μακροπρόθεσμη αντιμετώπιση της αλλαγής του κλίματος που προκαλείται λόγω της αύξησης των ανθρωπογενών εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου. Με βάση αυτό και με την υπογραφή της συμφωνίας δεσμεύονται κατά την πρώτη περίοδο 2008-2012 να μειώσουν τις εκπομπές των αερίων που είναι υπεύθυνα για το φαινόμενο του θερμοκηπίου κατά ένα συγκεκριμένο στόχο σε σχέση με αυτές του 1990 ή του 1995. Αυτές οι προσπάθειες πρέπει να γίνουν με έναν τρόπο που να συμφέρει οικονομικά με σκοπό να μην επιβαρυνθεί η παγκόσμια οικονομία. Έτσι, το Πρωτόκολλο αυτό λειτουργεί στη βάση τριών ευέλικτων μηχανισμών :

1. την *εμπορία δικαιωμάτων εκπομπών*,
2. την *κοινή εφαρμογή* και
3. το *μηχανισμό καθαρής ανάπτυξης*.

Ο πρώτος μηχανισμός προβλέπει την αγοραπωλησία δικαιωμάτων εκπομπών μεταξύ των ενδιαφερόμενων μερών (όπως για παράδειγμα κράτη και υπόχρεες εγκαταστάσεις) κατά τη θεωρία των property rights, ενώ οι άλλοι δύο βασίζονται σε προγράμματα έργων .

Οι πρώτοι που άρχισαν να κρούουν τον κώδωνα του κινδύνου για την κλιματική μεταβολή που οφείλεται σε ανθρωπογενείς αιτίες ήταν οι επιστήμονες. Στοιχεία από τις δεκαετίες του 1960 και 1970 έδειχναν ότι οι συγκεντρώσεις CO₂ στην

ατμόσφαιρα αυξάνονταν σημαντικά, γεγονός που οδήγησε τους κλιματολόγους αρχικά και στην συνέχεια και άλλους επιστήμονες να πιέσουν για δράση. Δυστυχώς, πήρε πολλά χρόνια στη διεθνή κοινότητα για να ανταποκριθεί στο αίτημα αυτό.

Το 1988, δημιουργήθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Μετεωρολογίας και το Περιβαλλοντικό Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών (UNEP) μία Διακυβερνητική Επιτροπή για την Αλλαγή του Κλίματος. Αυτή η ομάδα παρουσίασε μια πρώτη έκθεση αξιολόγησης το 1990, η οποία απεικόνιζε τις απόψεις 400 επιστημόνων. Σύμφωνα με την αναφορά αυτή, το πρόβλημα της αύξησης της θερμοκρασίας ήταν υπαρκτό και όφειλε να αντιμετωπιστεί άμεσα. Τα συμπεράσματα της Διακυβερνητικής Επιτροπής ώθησαν τις κυβερνήσεις να δημιουργήσουν την Σύμβαση-Πλαίσιο των Ηνωμένων Εθνών για τις Κλιματικές Μεταβολές (UNFCCC). Σε σχέση με τα δεδομένα για τις διεθνείς συμφωνίες, η διαπραγμάτευση της Σύμβασης ήταν σχετικά σύντομη. Ήταν έτοιμη προς υπογραφή στη Διάσκεψη των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον και την Ανάπτυξη (γνωστότερη ως συνάντηση κορυφής για την προστασία της Γης) το 1992 στο Ρίο ντε Τζανέιρο.

Η Σύμβαση-Πλαίσιο των Ηνωμένων Εθνών για την αλλαγή του κλίματος, καθώς και το πρωτόκολλο του Κιότο που ακολούθησε, αποτελούν το μόνο διεθνές πλαίσιο για την καταπολέμηση των κλιματικών αλλαγών.

Σύμφωνα με τις ρυθμίσεις του Πρωτοκόλλου του Κιότο, οι βιομηχανικές χώρες συνολικά υποχρεούνται να μειώσουν τις εκπομπές των αερίων του φαινομένου του θερμοκηπίου κατά 5,2% κατά μέσο όρο σε σχέση με τα επίπεδα του 1990, κατά τη διάρκεια της πρώτης «περιόδου δέσμευσης», η οποία καλύπτει τα έτη 2008-2012. Για τις αναπτυσσόμενες χώρες δεν καθορίζονται στόχοι ως προς τις εκπομπές. Αναφέρεται ότι προτιμήθηκε ο καθορισμός πενταετούς περιόδου δέσμευσης αντί ενός έτους στόχου για να εξομαλυνθούν οι ετήσιες διακυμάνσεις των εκπομπών αερίων που οφείλονται σε ανεξέλεγκτους παράγοντες, όπως ο καιρός (Ποϊκλή και Μαύρου, 2012).

1.1.3. Νομικό πλαίσιο της Ε.Ε για τα βιοκαύσιμα

Ο κύριος στρατηγικός ενεργειακός στόχος της νέας Ευρωπαϊκής Ενεργειακής πολιτικής είναι ότι η Ε.Ε θα πρέπει να ελαττώσει τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου κατά 20% μέχρι το 2020, σε σχέση με τα επίπεδα του 1990. Για την επίτευξη αυτού του στόχου η Ευρωπαϊκή Επιτροπή προτείνει τρεις σχετικούς στόχους μέχρι το 2020 που αποτελεί εθνικό στόχο: Βελτίωση της ενεργειακής απόδοσης κατά 20%, αύξηση του ποσοστού διείσδυσης των ανανεώσιμων μορφών ενέργειας στο ενεργειακό μείγμα σε επίπεδο του 20% και αύξηση του ποσοστού των βιοκαυσίμων στις μεταφορές στο 10%. Αρχίζοντας στις 14 Μαΐου του 2003 η Ευρωπαϊκή κοινότητα χρησιμοποίησε την οδηγία (2003/30/ΕΚ) που αφορούσε την προώθηση βιοκαυσίμων στις μεταφορές που είχε να κάνει με την αύξηση του ποσοστού των βιοκαυσίμων στην αγορά σε 2% το 2005, 5,75% το 2010 και το 2020 10%. Σύμφωνα με αυτά τα ποσοστά το βιοντίζελ θα πάρει τη θέση του ντίζελ, ενώ η βιοαιθανόλη αυτή της βενζίνης. Ενώ σύμφωνα με τις οδηγίες, 2009/28/ΕΚ που θέτει πλέον κριτήρια αειφορίας για την παραγωγή καυσίμων θα πρέπει: η τρέχουσα μείωση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου που πραγματοποιείται με τη χρήση βιοκαυσίμων να είναι τουλάχιστον 35%. Ενώ από την 1^η Ιανουαρίου 2017, η μείωση των εκπεμπόμενων αερίων του θερμοκηπίου που πετυχαίνονται με τη

χρήση βιοκαυσίμων πρέπει να είναι τουλάχιστον 50% και από την 1^η Ιανουαρίου 2018 η μείωση των εκπομπών θα είναι τουλάχιστον 60% (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015).

1.2. Είδη βιοκαυσίμων

Η παραγωγή βιοκαυσίμων στηρίζεται στη βιομάζα, που αποτελεί την πρώτη ύλη παραγωγής τους. Με τον όρο **βιομάζα** αναφερόμαστε στο βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα προϊόντων, βιομηχανικών αποβλήτων, αστικών λυμάτων και απορριμμάτων, καταλοίπων από γεωργικές και δασοκομικές δραστηριότητες συμπεριλαμβανομένων φυτικών και ζωικών ουσιών ή ακόμα και μια ομάδα μικροοργανισμών (μικροβιακή βιομάζα) (Hintz et al., 2003; Κατσαμάς, 2013). Σε παγκόσμιο επίπεδο το συνολικό δυναμικό βιομάζας ισοδυναμεί με το 200πλάσιο της φυτικής ενέργειας που χρησιμοποιείται για παραγωγή τροφής, χωρίς περιβαλλοντικές επιπτώσεις σχετικά με το φαινόμενο του θερμοκηπίου. Ενώ **βιοκαύσιμα** είναι τα υγρά, στερεά ή αέρια καύσιμα τα οποία παράγονται από βιομάζα. Βασική διαφορά τους με τα συμβατικά καύσιμα είναι ότι η παραγωγή και η χρήση τους είναι εξαιρετικά φιλική προς το περιβάλλον, είναι βιοαποικοδομήσιμα, μη τοξικά και έχουν χαμηλές εκπομπές ρύπων (Βασιληάς, 2012; Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015; Πατρινού, 2017).

Σύμφωνα με την οδηγία 2003/30/EK (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2003) τα παραγόμενα βιοκαύσιμα είναι:

- **Βιοαιθανόλη:** αιθανόλη η οποία παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων.
- **Βιομεθανόλη:** μεθανόλη η οποία παράγεται από βιομάζα.
- **Βιοντίζελ:** μεθυλεστέρας ο οποίος παράγεται από φύκη, φυτικά ή ζωικά έλαια, ποιότητας ντίζελ.
- **Βιοαέριο:** καύσιμο αέριο το οποίο παράγεται από βιομάζα ή/και από το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί φτάνοντας την ποιότητα φυσικού αερίου, για χρήση ως βιοκαύσιμο ή ξυλαέριο.
- **Βιοδιμεθυλαιθέρας:** διμεθυλαιθέρας ο οποίος παράγεται από βιομάζα.
- **Βιο-ETBE :** αιθυλοτριτοβουτυλαιθέρας ο οποίος παράγεται από βιοαιθανόλη.
- **Βιο-MTBE:** μεθυλοτριτοβουτυλαιθέρας, καύσιμο το οποίο παράγεται από βιομεθανόλη.

Τα βιοκαύσιμα ανάλογα με τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τους χωρίζονται:

1^ης Γενιάς Βιοκαύσιμα: Αυτά παράγονται από τη ζύμωση της γλυκόζης που περιέχεται στο άμυλο και στα σακχαρώδη φυτά (Ribeiro, 2013; Jambo et al., 2016). Ως πρώτες ύλες αυτής της γενιάς που χρησιμοποιούνται συχνά είναι το καλαμπόκι, το ζαχαροκάλαμο, η πατάτα, το σιτάρι και τα ζαχαρότευτλα (Havlik et al., 2011; Jambo et al., 2016). Ένα από τα βασικά μειονεκτήματα της παραγωγής βιοαιθανόλης πρώτης γενιάς είναι ο περιορισμός των τροφίμων που μπορεί να έχει

άμεση επίδραση στον παγκόσμιο πληθυσμό καθώς αυτές οι ύλες προέρχονται από φυτά που χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα (Arifin, 2014; Jambo et al., 2016). Η παραγωγή αυτού του είδους καυσίμων μπορεί να μειώσει σε μεγάλο βαθμό τις καλλιέργειες που είναι διαθέσιμες για την παραγωγή τροφίμων καθώς επίσης και σε άνοδο των τιμών στα τρόφιμα (Goh and Lee, 2010; Gomez et al., 2010; Jambo et al., 2016).

2^{ος} Γενιάς Βιοκαύσιμα: Αυτά παράγονται από λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες (όπως αγροτικά και δασικά προϊόντα καθώς και υπολείμματα, βιομηχανικά και αστικά οργανικά απόβλητα και ενεργειακές καλλιέργειες). Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα και τα αμυλώδη απόβλητα, συμπεριλαμβανομένων των υπολειμματικών καλλιεργειών όπως χόρτα, πριονίδι, ξύλα, και ζωική κοπριά, αποτελούν εναλλακτικές και άφθονες πρώτες ύλες, οι οποίες μπορούν να υδρολυθούν σε ζυμώσιμα σάκχαρα για την επακόλουθη παραγωγή βιοαιθανόλης (John et al., 2010; Τριανταφυλλίδης, 2012).

3^{ος} Γενιάς Βιοκαύσιμα: Αυτά παράγονται από μικροφύκη (<http://www.agroenergy.gr / categories>). Η βιοαιθανόλη τρίτης γενιάς παρέχει πιο πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την πρώτη και τη δεύτερη γενιά και εστιάζεται στη χρήση θαλάσσιων οργανισμών όπως τα μικροφύκη. Η βιομάζα τους μπορεί να περιορίσει τον ανταγωνισμό με τις ενεργειακές καλλιέργειες (Carriquiry and Timilsina, 2011; Jambo et al., 2016) καθώς αποτελούν μια ελπιδοφόρα εναλλακτική πρώτη ύλη λόγω του υψηλού λιπιδιακού και υδατανθρακικού τους περιεχομένου, της εύκολης καλλιέργειας σε διαφορετικά υδατικά περιβάλλοντα, της μικρής απαίτησης σε καλλιεργήσιμη γη καθώς και της υψηλής απορρόφησης CO₂ (Singh and Olsen, 2011; Jambo et al., 2016).

1.2.1. Βιοαιθανόλη

1.2.1.1. Παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων χημικών ουσιών, καυσίμων (βιοαιθανόλης), ποτών, φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών (Najafrou, 2006). Η πλειοψηφία (90-95%) του ποσοστού αιθανόλης που παράγεται παγκοσμίως προέρχεται από την τεχνολογία βιολογικής ζύμωσης (βιοαιθανόλη), ενώ το υπόλοιπο παράγεται χρησιμοποιώντας αιθένιο (προέρχεται από κοιτάσματα αργού πετρελαίου ή / και φυσικού αερίου) χρησιμοποιώντας ατμό και φωσφορικό οξύ ως καταλύτη (συνθετική αιθανόλη). Η αντίδραση της παραγωγής συνθετικής αιθανόλης παράγει επίσης τοξικά υποπροϊόντα, επομένως δεν χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση. Η βιοαιθανόλη ως προϊόν ζύμωσης υποβάλλεται σε επεξεργασία με επακόλουθο εμπλουτισμό με απόσταξη / διόρθωση και αφυδάτωση. Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, όταν οι συνθήκες του πολέμου άλλαξαν την οικονομία και τις προτεραιότητες, κατασκευάστηκαν αρκετά εργοστάσια αιθανόλης από κυτταρίνη (EFC) στη Γερμανία, τη Ρωσία, την Κίνα, την Κορέα, την Ελβετία και τις ΗΠΑ, μεταξύ άλλων χωρών, για να παρέχουν μια εναλλακτική πηγή καυσίμου. Από το τέλος του πολέμου, ο ανταγωνισμός από την συνθετικά παραγόμενη

αιθανόλη ανάγκασε πολλά από αυτά τα εργοστάσια να κλείσουν (Lin and Tanaka, 2006). Από τον Απρίλιο του 2004, λειτουργεί το πρώτο εργοστάσιο επίδειξης που χρησιμοποιεί λιγνοκυτταρινικές πρώτες ύλες στον Καναδά (Tampier, 2004). Το 2006, για την παγκόσμια αγορά αιθανόλης, η Βραζιλία διέθεσε περισσότερα από 300 εργοστάσια παραγωγής βιοαιθανόλης, παράγοντας 15 δισεκατομμύρια λίτρα ετησίως και προμηθεύοντας 3 εκατομμύρια αυτοκίνητα με καθαρή αιθανόλη (Lin and Tanaka, 2006; Sarris and Paranikolaou, 2016). Στις ΗΠΑ, υπήρχαν περισσότερα από 80 εργοστάσια που παράγουν 10 δισεκατομμύρια λίτρα ετησίως (Lin and Tanaka, 2006). Ωστόσο, οι ΗΠΑ το περασμένο έτος πήραν το προβάδισμα παρουσιάζοντας μια εντυπωσιακή αύξηση στην ετήσια παραγωγή αιθανόλης. Παρόλα αυτά, στις ΗΠΑ μόνο το 2% των οχημάτων χρησιμοποιεί αιθανόλη, άρα στόχος είναι η αύξησή της χρήσης της αιθανόλης κατά 30% μέχρι το 2025 στα οχήματα μεταφοράς (Ragauskas et al., 2006; Korsahelis et al., 2009). Από την άλλη πλευρά, η παραγωγή αιθανόλης στην Ευρώπη αντιπροσώπευε το 5% της παγκόσμιας παραγωγής το 2008, με τη Γερμανία και τη Γαλλία να είναι οι κύριοι παραγωγοί (Wang et al., 2012). Παρά το γεγονός ότι υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση εναλλακτικών πηγών για ζύμωση αιθανόλης (όπως παραπροϊόντα), οι κύριες πηγές παραγωγής αιθανόλης στην Ευρώπη είναι τα δημητριακά και τα ζαχαρότευτλα (Demirbas, 2009). Από την άλλη πλευρά, οι ΗΠΑ παρήγαγαν περίπου 50 δισεκατομμύρια λίτρα μόνο το 2012. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η πλειοψηφία της παγκόσμιας αιθανόλης παράγεται από τις ΗΠΑ και τη Βραζιλία, φτάνοντας μαζί 62 έως 87% της παγκόσμιας παραγωγής αιθανόλης (Balat and Balat, 2008; Kim and Dale, 2006). Η συντριπτική πλειοψηφία της αμερικανικής αιθανόλης παράγεται από υδρολυμένο άμυλο που προέρχεται από καλαμπόκι, ενώ η βιοαιθανόλη στη Βραζιλία προέρχεται κυρίως από ζάχαρη με προέλευση το ζαχαροκάλαμο. Ακολουθούν η Κίνα, η Ινδία, η Ανατολική Ευρώπη, η Δυτική Ευρώπη και τελικά ο Καναδάς. Στην Κύπρο, Ελλάδα, Εσθονία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Πορτογαλία και Σλοβενία δεν έχουν γίνει ακόμη επενδύσεις στον τομέα της παραγωγής βιοαιθανόλης. Στην Ελλάδα, δεν λειτουργεί ούτε ένα εργοστάσιο παραγωγής βιοαιθανόλης. Παλαιότερα είχαν γίνει κάποιες ενέργειες από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης η οποία είχε ανακοινώσει το 2006 ότι θα εκανε μετατροπές σε δύο εργοστάσια ζάχαρης ώστε να γίνεται παραγωγή βιοαιθανόλης και ζωοτροφών αλλά αυτές οι προσπάθειες τελικά δεν ευοδώθηκαν (Ιωαννίδης, 2013). Σήμερα, στην Ελλάδα γίνεται εισαγωγή αιθανόλης κυρίως για χρήση στα αλκοολούχα ποτά και στην παραγωγή οινοπνεύματος.

1.2.1.2. Χαρακτηριστικά Αιθανόλης

- **Βιοκαύσιμα** όπως προαναφέρθηκε ονομάζονται τα στερεά, υγρά ή αέρια καύσιμα τα οποία προέρχονται από τη βιομάζα, το βιοδιασπώμενο δηλαδή κλάσμα προϊόντων ή αποβλήτων διαφόρων ανθρώπινων δραστηριοτήτων (Κιαχίδης, 2018).
- **Τα κυριότερα εναλλακτικά βιοκαύσιμα** είναι οι αλκοόλες και συγκεκριμένα η αιθανόλη και η μεθανόλη, οι οποίες αποτελούν πρωτογενείς πηγές ενέργειας. Είναι καύσιμα κατάλληλα για την αποθήκευση και τη μεταφορά ενέργειας. Αυτές οι αλκοόλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κινητήρες εσωτερικής καύσης (βενζινοκινητήρες και πετρελαιοκινητήρες).

- Ο χημικός τύπος για το καύσιμο αλκοόλης είναι $C_nH_{2n+1}OH$.
- Τα καύσιμα αλκοόλης λαμβάνονται συνήθως από βιολογικές παρά από πετρελαϊκές πηγές και είναι γνωστά ως **βιοαλκοόλες**. Δεν υπάρχει χημική διαφορά μεταξύ των αλκοολών που παράγονται βιολογικά και εκείνων που λαμβάνονται από άλλες πηγές. Ωστόσο, η αιθανόλη που παράγεται από το πετρέλαιο δεν πρέπει να θεωρείται ασφαλής για κατανάλωση καθώς περιέχει περίπου 5% μεθανόλη και μπορεί να προκαλέσει τύφλωση ή ακόμα και θάνατο.
- Τόσο η μεθανόλη όσο και η αιθανόλη περιέχουν διαλυτές και αδιάλυτες προσμίξεις. Ιόντα των διαλυτών προσμίξεων μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στη διαβρωτικότητα των καυσίμων αλκοολών. Οι υψηλής ποιότητας αλκοόλες θα πρέπει να έχουν χαμηλή συγκέντρωση ρύπων καθώς και να έχει προστεθεί σε αυτές το κατάλληλο αντιδιαβρωτικό.

• Χημικός Τύπος: C_2H_5OH

- Η αιθανόλη είναι, άχρωμο πτητικό υγρό με έντονη τοξικότητα. Οι ομοιότητες των δύο αλκοολών οφείλονται στη χημική τους σύνθεση καθώς αυτό που τα διαφοροποιεί όπως δείχνει και η ονομασία τους είναι ο αριθμός ατόμων άνθρακα στο μόριο τους.
- Η χρήση της βιοαιθανόλης διευρύνεται με την πάροδο του χρόνου και έχει ήδη επεκταθεί σε στρατηγικής σημασίας τομείς, όπως είναι ο ενεργειακός. Η βιοαιθανόλη είναι μια από τις πιο ελπιδοφόρες εναλλακτικές λύσεις για τα ορυκτά καύσιμα, τα οποία μπορούν να παραχθούν από διάφορες ανανεώσιμες πηγές πλούσιες σε υδατάνθρακες.

Τέλος, το δυναμικό παραγωγής βιοαιθανόλης υπό εντελώς μη ασηπτικές συνθήκες (Sarris et al., 2009; Sarris et al., 2013; Sarris et al., 2014; Roukas, 1995; Korsahelis, 2012) καθιστά αυτή τη βιοεπεξεργασία πολύ σημαντική με επικείμενες εφαρμογές στο βιομηχανικό τομέα. Το καύσιμο αιθανόλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μίγμα με βενζίνη σε ποσοστά από 5 έως 85%. Τα πιο δημοφιλή μίγματα είναι γνωστά ως E85 (85% βιοαιθανόλη, 15% βενζίνη), E20 (20% βιοαιθανόλη, 80% βενζίνη) και E10 (10% βιοαιθανόλη, 90% βενζίνη · ονομάζεται επίσης gasohol στην Αμερική) (Balat and Balat, 2008; Kim and Dale, 2006; Festel, 2008) τα οποία περιέχουν 3.5% κ.β. οξυγόνο.

Σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό πρότυπο ποιότητας EN 228, η βιοαιθανόλη χρησιμοποιείται σε μίγμα 5% με βενζίνη χωρίς να απαιτείται μετατροπή του κινητήρα. Μερικές εταιρείες κατασκευής αυτοκινήτων συστήνουν στις προδιαγραφές των οχημάτων τους να χρησιμοποιούν καύσιμα με μέγιστη περιεκτικότητα σε βιοαιθανόλη 5% ενώ άλλες εταιρείες 10%. Σε περίπτωση που το ποσοστό αυτό ξεπεραστεί οι καταναλωτές χάνουν τις εγγυήσεις των αμαξιών τους. Ακόμα υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί 100% βιοαιθανόλη σε αυτοκίνητα με τροποποιημένους κινητήρες τα οποία διαθέτουν ηλεκτρική ανάφλεξη παρ' όλο που για την επίλυση του προβλήματος εκκίνησης κατά τους χειμερινούς μήνες που επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες απαιτείται να γίνεται η χρήση ενός μικρού ποσοστού καυσίμου που συνήθως είναι η βενζίνη (Αρχοντόπουλος, 2010).

Πίνακας 1.2.1.2.1: Χαρακτηριστικά αιθανόλης

ΑΙΘΑΝΟΛΗ

Φυσικές Ιδιότητες	Χημικές Ιδιότητες
Σημείο Τήξης : -114° C	pKa: 15,9
Σημείο Βρασμού: 78° C	Βαθμός Οκτανίου: 113
Πυκνότητα: 789 kg/m ³	Ελάχιστη Θερμοκρασία Ανάφλεξης:13-14°C
Διαλυτότητα: Ανάμιξη σε κάθε αναλογία στο νερό	Σημείο Αυτανάφλεξης:362°C
Ιξώδες: 1,5mPa*s(20 C)	
Δείκτης Διάθλασης : 1,36	
Τάση Ατμών : 5,95 kPa(20 C)	

Η υψηλότερη θερμότητα εξάτμισης της αιθανόλης (840 kJ / kg) σε σχέση με αυτήν της βενζίνης (305 kJ / kg) διασφαλίζει ότι η ογκομετρική απόδοση του μίγματος αιθανόλης είναι υψηλότερη από την απόδοση της καθαρής βενζίνης, βελτιώνοντας έτσι την απόδοση ισχύος.

Η βιοαιθανόλη είναι ένα φιλικό προς το περιβάλλον οξυγονωμένο καύσιμο καθώς περιέχει 34,7% οξυγόνο, ενώ το οξυγόνο απουσιάζει από τη βενζίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα περίπου 15% υψηλότερη απόδοση καύσης αιθανόλης από εκείνη της βενζίνης (Kar and Devenc, 2006; Sanchez and Demain, 2008), διατηρώντας έτσι τις εκπομπές σωματιδίων και οξειδίων του αζώτου. Σε σύγκριση με τη βενζίνη, η αιθανόλη περιέχει αμελητέα ποσότητα θείου και η ανάμιξη αυτών των δύο καυσίμων συμβάλλει στη μείωση της περιεκτικότητας σε θείο στο καύσιμο, καθώς και στην εκπομπή οξειδίου του θείου, το οποίο είναι καρκινογόνο και μπορεί να συμβάλει στην όξινη βροχή (Pickett et al., 2008). Η βιοαιθανόλη είναι επίσης ένα ασφαλέστερο υποκατάστατο του μεθυλο-τριτοταγούς βουτυλαιθέρα (MTBE), ο οποίος χρησιμοποιείται συνήθως ως ενισχυτής οκτανίου για βενζίνη και προστίθεται στον τελευταίο για καθαρή καύση του έτσι ώστε η παραγωγή μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) μπορεί να μειωθεί. Έχει αναφερθεί ότι το MTBE μπαίνει στο υπόγειο νερό που μολύνει το πόσιμο νερό προκαλώντας σοβαρά επιζήμιες επιπτώσεις στην υγεία.

Πλεονεκτήματα

- Έχει διάφορες χρήσεις που αφορούν διάφορους τομείς μεταξύ αυτών τη βιομηχανία και τις μεταφορές. Στις μεταφορές η αιθανόλη δεν χρησιμοποιείται σαν καθαρό προϊόν αλλά η ίδια και τα παράγωγα της χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα της βενζίνης.
- Χρήση της αιθανόλης ως καύσιμο στις τουρμπίνες ατμού.
- Μείωση των οξειδίων του αζώτου (NO_x) και CO₂ κατά την παραγωγή ενέργειας με ορυκτά καύσιμα και καύσιμα για κίνηση.
- Είναι βιοαποικοδομήσιμη και προκαλεί πολύ μικρή περιβαλλοντική μόλυνση αν διαχυθεί στο περιβάλλον.
- Η αιθανόλη είναι ένα καύσιμο υψηλού αριθμού οκτανίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο αύξησης του αριθμού οκτανίου της βενζίνης. Η

αιθανόλη (C₂H₅OH) έχει διατεθεί ως μια πολλά υποσχόμενη πηγή ενέργειας έναντι της βενζίνης (C₇H₁₇) λόγω του ότι έχει πολλές πλεονεκτικές ιδιότητες. Παρόλο που ένα λίτρο αιθανόλης αποδίδει το 66% της ενέργειας που παρέχεται από την ίδια ποσότητα βενζίνης, το πρώτο έχει υψηλότερο αριθμό οκτανίων (106–110) από το δεύτερο (91–96), γεγονός που αυξάνει την απόδοση της βενζίνης όταν αναμιγνύεται με αιθανόλη (Nigam and Singh, 2011). Το υψηλότερο επίπεδο οκτανίου της αιθανόλης επιτρέπει επίσης να καεί σε υψηλότερο λόγο συμπίεσης με μικρότερο χρόνο καύσης, με αποτέλεσμα χαμηλότερο χτύπημα του κινητήρα.

- Δεν περιέχει επικίνδυνους αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως για παράδειγμα βενζένιο το οποίο είναι καρκινογόνο, ενώ πλεονεκτεί και στις εκπομπές μονοξειδίου του άνθρακα.

Μειονεκτήματα

- Η διαδικασία παραλαβής της αιθανόλης είναι το τελευταίο στάδιο παραγωγής και περιλαμβάνει απόσταση και αφυδάτωση με θέρμανση. Το τελευταίο αυτό στάδιο είναι από τα πλέον ενεργοβόρα άρα και πιο δαπανηρά στάδια της παραγωγικής διαδικασίας και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα της βιομηχανικής παραγωγής βιοαιθανόλης.

- Τα απόβλητα της βιομηχανίας αιθανόλης έχουν υψηλό ρυπαντικό φορτίο και είναι δύσκολα επεξεργάσιμα.

- Υψηλό σημείο τήξης της που οδηγεί σε εύκολη πήξη της κατά τους χειμερινούς μήνες όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη.

- Μπορεί να εισχωρήσει στο ανθρώπινο σώμα με την κατάποση, εισπνοή ή απορρόφηση μέσω του δέρματος και να αποβεί μοιραία εξαιτίας των κατασταλτικών ιδιοτήτων της.

1.3. Βιομάζα που προορίζεται για την παραγωγή βιοκαυσίμων

Στην πράξη υπάρχουν **δύο τύποι βιομάζας**:

α) Οι υπολειμματικές μορφές και

β) Η βιομάζα που παράγεται από ενεργειακές καλλιέργειες.

Οι υπολειμματικές μορφές βιομάζας διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- Αγροτικά υπολείμματα (άχυρα, κλαδέματα κ.ά.).

- Δασικά υπολείμματα (υλοτομία, καθαρισμοί).

- Υπολείμματα γεωργικών/δασικών βιομηχανιών (πυρηνόξυλο, πριονίδια, απόβλητα τυροκομείου κ.ά.).

- Απόβλητα κτηνοτροφίας (κοπριές, απόβλητα σφαγείων).

- Αστικά απόβλητα.

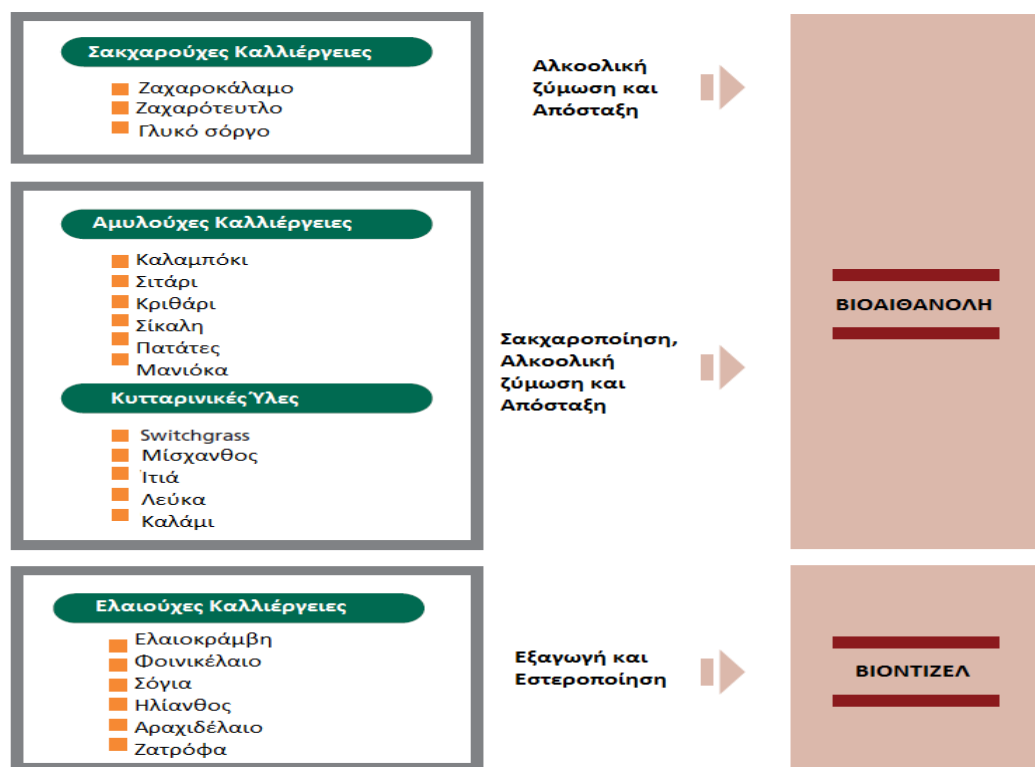
- Οργανικό κλάσμα απορριμμάτων.

Οι ενεργειακές καλλιέργειες περιλαμβάνουν:

- Παραδοσιακές καλλιέργειες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή βιοκαυσίμων/ενέργειας (π.χ. τεύτλα, σιτάρι, ηλίανθος, ευκάλυπτος).

- Φυτά που δεν καλλιεργούνται, προς το παρόν, εμπορικά και το τελικό προϊόν τους προορίζεται για την παραγωγή βιοκαυσίμων / ενέργειας (π.χ. σόργο, ελαιοκράμβη, κενάφ).

Πίνακας 1.3.2. Μετατροπή αγροτικών πρώτων υλών σε υγρά βιοκαύσιμα (Βαλιανάτου, 2013)



Αναλόγως της πρώτης ύλης – βιομάζας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιθανόλης διαφοροποιείται και η ακολουθούμενη διαδικασία επεξεργασίας της βιομάζας. Έτσι, όταν η πρώτη ύλη είναι ενεργειακά φυτά σακχαρούχου σύστασης, όπως το σακχαροκάλαμο, το σακχαρότευτλο ή το γλυκό σόργο που συνήθως μετά από χρήση φυσικών προκατεργασιών (κυρίως θέρμανσης, πίεσης) οδηγούνται σε άμεση ζύμωση προς αιθανόλη καθώς οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται (πχ. *S. cerevisiae*) φέρουν τη δυνατότητα παραγωγής του ενζύμου που υδρολύει την σακχαρόζη (ιμπερτάση) με αποτέλεσμα την άμεση ζύμωση της σακχαρόζης προς αιθανόλη. Στην περίπτωση που η πρώτη ύλη είναι τα ενεργειακά φυτά αμυλούχου σύστασης (όπως οι σπόροι σιτηρών το καλαμπόκι και το σιτάρι), είναι αναγκαίο πριν την ζύμωση για παραγωγή αιθανόλης να περάσει ένα στάδιο επεξεργασίας (συνήθως υδρόλυσης). Τέλος, όταν η πηγή της βιομάζας είναι διάφορα δασικά κατάλοιπα λιγνινοκυτταρινούχου σύστασης, απαιτείται ένα στάδιο φυσικής, χημικής, ενζυμικής ή ακόμα και συνδυασμός κάποιων διεργασιών προκειμένου να μετατραπεί η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα σε γλυκόζη που ζυμώνεται άμεσα από τη ζύμη *S. cerevisiae* σε αιθανόλη (εικόνα 1.3.2.3).



Εικόνα 1.3.2.3: Διεργασίες παραγωγής αιθανόλης από διάφορες κατηγορίες βιομάζας. (Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015)

1.4. Πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης

- **Σακχαροκάλαμο**

Στην σημερινή εποχή περίπου το 85% των αυτοκινήτων που πωλούνται στην Βραζιλία χρησιμοποιούν σαν καύσιμο την αιθανόλη. Το γεγονός ότι κάθε λίτρο αλκοόλης το οποίο χρησιμοποιείται κοστίζει περίπου 38 λεπτά πιο φτηνά από την βενζίνη μας δίνει να καταλάβουμε ότι πολλά από τα αυτοκίνητα αυτά έχουν περάσει χρόνια χωρίς να κάψουν συμβατικά καύσιμα. Το κλειδί για τη ραγδαία αύξηση της ζήτησης αιθανόλης στη Βραζιλία είναι το σακχαροκάλαμο, αυτό το γλυκό ταχείας ανάπτυξης τροπικό αγρωστώδες φυτό από το οποίο παράγεται η ζάχαρη, η οποία εξάγεται από τον 16^ο αιώνα (Γεντίκης, 2017; Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015). Σε σχέση με άλλα φυτά όπως το καλαμπόκι το 20% του σακχαροκάλαμου αποτελείται από ζυμώσιμα σάκχαρα, με αποτέλεσμα μετά την συγκομιδή να αρχίζει η ζύμωση με ταχύς ρυθμούς. Από 1 στρέμμα σακχαροκάλαμου παραλαμβάνονται περίπου 600-900 λίτρα αιθανόλης τιμή υπερδιπλάσια σε σχέση με αυτή του καλαμποκιού. Σύμφωνα με τον συντελεστή ορυκτής ενέργειας με την κατανάλωση μιας μονάδας ορυκτών καυσίμων παράγονται 8 μονάδες αιθανόλης. Τέλος, οι εκπομπές του CO₂ που προκύπτουν από την καύση αιθανόλης, η οποία προέρχεται από σακχαροκάλαμο, είναι 55-90% λιγότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές της βενζίνης. Και το σακχαροκάλαμο, όμως, συνοδεύεται από τα δικά του προβλήματα. Στη Βραζιλία τα περισσότερα φυτά συλλέγονται με τα χέρια γεγονός που καθιστά την εργασία αυτή εξουθενωτική καθώς γίνεται εκτός των άλλων κάτω από σκληρές συνθήκες ζέστης και βρωμιάς. Κάθε χρόνο πέρα από τους εργάτες που πεθαίνουν από την εξάντληση υπάρχουν και μεγάλες απώλειες σε ζώα (κυρίως ερπετά) τα οποία βρίσκουν καταφύγιο ανάμεσα στα σακχαροκάλαμα, για να σκοτωθούν τα φίδια και να διευκολυνθούν οι εργασίες συνήθως καίνε τα χωράφια πριν την συγκομιδή. Ένα επιπλέον πρόβλημα το οποίο έρχεται να προστεθεί μαζί με τα άλλα είναι ότι με την καύση γεμίζει ο αέρας καπνιά που με αυτόν τον τρόπο μολύνεται το περιβάλλον με μεθάνιο και πρωτοξειδίο του αζώτου. Τέλος, οι εκτάσεις σακχαροκάλαμου την επόμενη δεκαετία τείνουν να διπλασιαστούν βοηθώντας έτσι στην αποψίλωση των δασών.



Εικόνα 1.4.4.: Σακχαροκάλαμο (<https://www.google.com/search>)

- **Σακχαρότευτλο**

Τα σακχαρότευτλα είναι ένας διατητής τύπος τεύτλου που καλλιεργείται εμπορικά λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των ριζών του σε σάκχαρα γεγονός που το καθιστά ιδανικό για καλλιέργεια σ'όλο τον ελλαδικό χώρο. Η μέση τιμή απόδοσης για τις ελληνικές καλλιέργειες είναι 6,3 τόννοι ανά στρέμμα από τους οποίους προκύπτουν 600 λίτρα βιοαιθανόλης. Ο συντελεστής ορυκτής ενέργειας για την παραγωγή της αιθανόλης από σακχαρότευτλα έχει την τιμή 2, δηλαδή η ενέργεια από ορυκτά καύσιμα για την παραγωγή του καυσίμου (εισορή) συγκριτικά με αυτήν που αποδίδει (εκροή) είναι 1 προς 2 (Γεντίκης, 2017; Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015).



Εικόνα 1.4.5: Σακχαρότευτλο

- **Γλυκό σόργο**

Το γλυκό σόργο είναι ένα μονοετές φυτό με μεγάλη φωτοσυνθετική ικανότητα και υψηλές αποδόσεις σε βιομάζα. Προσαρμόζεται εύκολα σε διάφορα είδη εδαφών και σε ποικίλες κλιματικές συνθήκες. Το γλυκό σόργο είναι ένα μονοετές φυτό με μεγάλη φωτοσυνθετική ικανότητα και υψηλές αποδόσεις σε βιομάζα το οποίο έχει τη δυνατότητα να καλλιεργηθεί από τις βορειότερες μέχρι και τις πιο νότιες περιοχές της Ελλάδας, σε εύφορα αλλά και υποβαθμισμένα εδάφη. Οι

αποδόσεις σε παραγωγή αγγίζουν τους 10 τόνους ανά στρέμμα και μπορούν να παραχθούν θεωρητικά περίπου 600 λίτρα αιθανόλης ανά στρέμμα. Ο συντελεστής ορυκτής ενέργειας για την παραγωγή της αιθανόλης από σακχαρότευτλα έχει την τιμή 2,2, δηλαδή η ενέργεια από ορυκτά καύσιμα για την παραγωγή του καυσίμου (εισροή) συγκριτικά με αυτήν που αποδίδει (εκροή) είναι 1 προς 2,2. (Γεντίκης, 2017; Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015).



Εικόνα1.4.6: Γλυκό σόργο (<https://www.google.com/search>)

- **Αραβόσιτος**

Το μεγαλύτερο ποσό της αιθανόλης που παράγεται στις ΗΠΑ προέρχεται από αραβόσιτο (18,4 δισεκατομμύρια λίτρα το 2006) με ένα κόστος παραγωγής 0,21 € το λίτρο ενώ στην Ελλάδα η συνολική καλλιεργούμενη έκταση είναι περίπου 2 εκ. στρέμματα με ετήσια παραγωγή που ξεπερνά τους 2 εκατομμύρια τόνους. Οι ελληνικές μέσες αποδόσεις αραβόσιτου κυμαίνονται από 600 έως 1800 κιλά ανά στρέμμα, κάθε ένα από τα οποία δίδει, κατά μέσο όρο, 300 λίτρα αιθανόλης. Ο συντελεστής ορυκτής ενέργειας για την παραγωγή της αιθανόλης από σακχαρότευτλα έχει την τιμή 1,3, δηλαδή η ενέργεια από ορυκτά καύσιμα για την παραγωγή του καυσίμου (εισροή) συγκριτικά με αυτήν που αποδίδει (εκροή) είναι 1 προς 1,3. Η χρησιμοποίηση αιθανόλης από καλαμπόκι αντί για τη βενζίνη ως καύσιμο μεταφοράς μειώνει τις εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου κατά 21%. Η συνεχής αύξηση της ζήτησης του αραβόσιτου προκειμένου να παραχθεί αιθανόλη είχε σαν αποτέλεσμα να διπλασιαστεί η τιμή του από 150 € ανά τόνο το 2006 σε 300 € ανά τόνο το 2007. (Γεντίκης, 2017; Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015). Με δυσμενές αποτέλεσμα για την χρήση του αραβόσιτου σαν ζωοτροφή ή και για ανθρωπίνη κατανάλωση.



Εικόνα1.4.7: Αραβόσιτος (Καλαμπόκι)(<https://www.google.com/search>)

- **Κενάφ.**

Έχει αποδειχθεί πως καλλιεργώντας ένα στρέμμα κενάφ μπορούμε να παράγουμε 2,2 τόνους βιομάζας. Το κενάφ είναι ένα ετήσιο φυτό μικρής ημέρας, με κυτταρίνες υψηλής ποιότητας. Οι αποδόσεις σε ξηρή βιομάζα κυμαίνονται από 0,7 έως 2,4 τόνους/στρέμμα. Οι υψηλότερες αποδόσεις τόσο σε χλωρή βιομάζα όσο και σε ξηρή ουσία καταγράφονται στις όψιμες ποικιλίες, οι οποίες καλλιεργήθηκαν κάτω από τη μεγαλύτερη πυκνότητα φυτών.



Εικόνα1.4.8.: Κενάφ (<https://www.google.com/search>)

- **Αγριαγκινάρα.**

Η αγριαγκινάρα είναι ένα πολυετές είδος αγκαθίου, που καλλιεργείται παραδοσιακά σε κάποιες περιοχές της μεσογειακής ζώνης. Από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια, τόσο στην Ισπανία όσο και στην Ελλάδα, αποδεικνύεται ότι η αγριαγκινάρα είναι ένα φυτό με πολύ καλή προσαρμοστικότητα και υψηλές αποδόσεις. Σε πειράματα που διεξήχθησαν στην Ελλάδα, το τελικό ύψος του φυτού έφτασε τα 2,6 μέτρα. Η παραγωγή ξηράς ουσίας

ανάλογα με την πυκνότητα φύτευσης επί των γραμμών κυμάνθηκε από 1,7 έως 3,3 τόνους/στρέμμα.



Εικόνα 1.4.9.: Αγριαγκινάρα (<https://www.google.com/search>)

- **Ευκάλυπτος.**

Οι φυτείες ευκαλύπτων χαρακτηρίζονται από γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης μετά τη συγκομιδή. Σε πειραματικές εφαρμογές αρδευόμενου διαχειριζόμενου με διετή περίτροπο χρόνο απέδωσε κατά μέσο όρο τριών διαδοχικών περιτροπών 64 τόνους/στρέμμα/έτος και 28 τόνους/στρέμμα/έτος χλωρής βιομάζας και ξηρής ουσίας αντίστοιχα. Η πυκνότητα φύτευσης ήταν 1.000 και 2.000 φυτά ανά στρέμμα. Στο τέλος του τρίτου διετούς περίτροπου χρόνου οι αποδόσεις σε ξηρά ουσία κατέγραψαν υψηλές τιμές 25 τόνων/στρέμμα/έτος.



Εικόνα 1.4.10: Ευκάλυπτος (<https://www.google.com/search>)

- **Ψευδακακία.**

Η ψευδακακία είναι φυτό ψυχανθές, πολυετές, δενδρώδες που χαρακτηρίζεται από ταχύτατη ανάπτυξη του υπέργειου μέρους, σημαντική παραγωγή βιομάζας και εξαιρετική αναβλάστηση μετά την κοπή. Η ψευδακακία θεωρείται πολύ παραγωγικό φυτό σε βιομάζα. Από πειραματικές καλλιέργειες στην Ελλάδα

ελήφθησαν αποδόσεις ξηρής ουσίας κατά τον πρώτο περίτροπο χρόνο 0,5 και 0,8 τόνοι/στρέμμα/έτος σε άγονο και γόνιμο έδαφος αντίστοιχα. Στον τρίτο περίτροπο ο μέσος όρος των αποδόσεων στο γόνιμο έδαφος έφτασε τους 1,7 τόνους ξηρής ουσίας/στρέμμα ανά έτος. Η πυκνότητα φύτευσης ήταν 1.000 και 2.000 φυτά/στρέμμα κατά την εγκατάσταση, ο δε περίτροπος χρόνος 2 έτη.



Εικόνα 1.4.11: Ψευδακακία (<https://www.google.com/search>)

- **Μικροφύκη**

Τα μικροφύκη είναι προκαρυωτικοί ή ευκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι αναπτύσσονται ταχύτατα και επιβιώνουν σε δυσμενείς συνθήκες, λόγω της δόμησής τους (Κόλλιας, 2013). Τα μικροφύκη αποτελούν τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και εκτός από την κατανάλωση CO₂ και ενώσεων βασισμένων σε N όπως το αμμώνιο, είναι από τους σημαντικότερους παραγωγούς οξυγόνου στη γη. Η βιομάζα μικροφυκών περιέχει περίπου 50% άνθρακα κατά ξηρό βάρος (Schneider et al., 2013). Θεωρούνται μια πολλά υποσχόμενη πηγή σακχάρων για την παραγωγή αιθανόλης επειδή εκτός από τον μεγάλο ρυθμό ανάπτυξης διαθέτουν και την ικανότητα μετατροπής της ηλιακής ενέργειας σε χημική μέσω της διαδικασίας σχηματισμού των ενώσεων του άνθρακα από το ατμοσφαιρικό CO₂. Μερικά είδη μικροφυκών όπως το *Anthrospira platensis*, το *Chlamydomonas reinhardtii*, το *Chlorella* sp., το *Scenedesmus dimorphus*, το *Tetraselmis subcordiformis* (Silva and Bertuco, 2016) και το *Dunaliella* sp. (Schneider et al., 2013) διαθέτουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες υδατανθράκων. Όσον αφορά στην παραγωγή βιοκαυσίμων από μικροφύκη αυτή μπορεί να είναι εμπορικά βιώσιμη και οικονομικά ανταγωνιστική προς τα ορυκτά καύσιμα, καθώς δεν απαιτούνται επιπλέον εδάφη και συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας του αέρα απορροφώντας το CO₂ της ατμόσφαιρας (Medipally et al., 2014). Η καλλιέργειά τους όμως είναι αρκετά δαπανηρή λόγω του ότι έχουν ανάγκη σε μεγάλες ποσότητες νερού, των ανόργανων θρεπτικών συστατικών (κυρίως N και

P), και του CO₂ που απαιτούνται. Η χρήση μικροφυκών για παραγωγή αιθανόλης μπορεί να καταστεί περιβαλλοντικά βιώσιμη, οικονομικά αποδοτική αλλά και κερδοφόρα μόνο αν συνδυαστεί με χρήση των αποβλήτων.



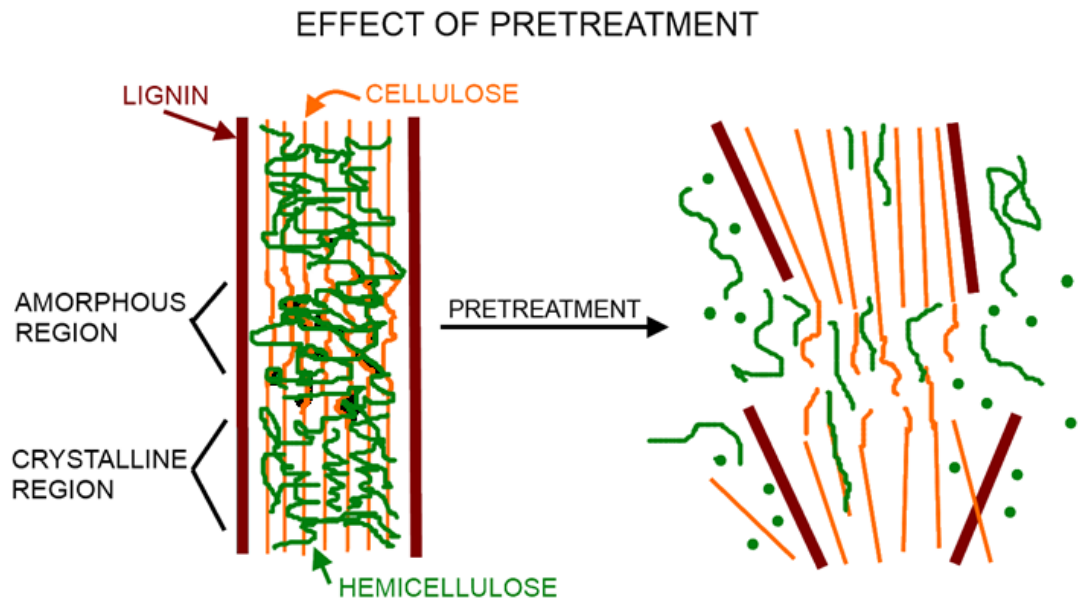
Εικόνα 1.4.12.: Βιοαντιδραστήρες πολυαιθυλενίου μίας χρήσης 300 L. για καλλιέργεια μικροφυκών Plagton S.A.

1.5. Μέθοδοι επεξεργασίας-προεπεξεργασία πρώτων υλών

1.5.1. Προκατεργασία της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας

Προεπεξεργασία βιομάζας

Η προεπεξεργασία της βιομάζας είναι σημαντική καθώς διαλύει την κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης και απελευθερώνει τα ζυμώσιμα σάκχαρα έτσι ώστε να επιτευχθεί η υδρόλυση πιο γρήγορα και με μεγαλύτερες αποδόσεις αιθανόλης (Mosier et al., 2005; Harun et al., 2011). Μια κατάλληλη προεπεξεργασία μπορεί να παρεμποδίσει τον σχηματισμό ανασταλτικών παραπροϊόντων στην επακόλουθη υδρόλυση και ζύμωση (Sun and Cheng, 2002; Harun et al., 2011). Είναι γνωστό ότι οι αιθανολογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να ζυμώσουν και να μετατρέψουν σε βιοαιθανόλη μόνο τα μονομερή και διμερή σάκχαρα (Khan et al., 2017; Markou et al., 2013) γεγονός που δεικνύει την ανάγκη για προεπεξεργασία και υδρόλυση της βιομάζας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για την προεπεξεργασία της βιομάζας είναι φυσικές, χημικές, βιολογικές και φυσικοχημικές ή ακόμα και συνδυασμός κάποιων από τις παραπάνω μεθόδους (Azhar et al., 2017; Srichuwong et al., 2009; Mosier et al., 2005; Galbe and Zacchi 2007; Sánchez and Cardona, 2008; Lee et al., 2008; Olofsson et al., 2008; Tomás-Pejó et al., 2008; Taherzadeh and Karimi, 2008; Hayes, 2009; Gable and Zacchi, 2012).



Εικόνα 1.5.1.13. Επίτευξη σπασίματος της δομής της βιομάζας στα επιμέρους συστατικά μετά από προκατεργασία της: την κυτταρίνης (πορτοκαλί χρώμα), την ημικυτταρίνη (πράσινο χρώμα) και τη λιγνίνη (κόκκινο χρώμα) (Γεντίκης, 2015)

1.5.2. Φυσικές μέθοδοι

Οι φυσικές μέθοδοι επεξεργασίας έχουν στόχο την μείωση των διαστάσεων της πρώτης ύλης ώστε να αυξηθεί η ενεργή επιφάνεια για την δράση των υδρολυτικών ενζύμων (Talebnia et al., 2011; Kumar et al., 2009; Markou et al., 2013). Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν μηχανικά μέσα όπως θραύση και άλεση (Millet et al., 1976; Cadoche and Lopez, 1989; Shafizadeh and Lai, 1975; Harun and Danquah, 2011).

1.5.2.α. Μηχανική προκατεργασία

Η μηχανική προκατεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών είναι ένα σημαντικό στάδιο για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της βιομετατροπής, για την ενζυμική πρόσβαση και γενικότερα, τη μετατροπή της βιομάζας σε βιοαιθανόλη, χωρίς την παρουσία παράπλευρων, τοξικών ρευμάτων (Barakat et al., 2014). Η μέθοδος αυτή δημιουργεί μια νέα επιφάνεια, βελτιώνει τις ιδιότητες ροής και αυξάνει το πορώδες και την πυκνότητα της βιομάζας. Εξαιτίας της δομής τους, τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά σπάνε με τη βοήθεια ειδικών μύλων ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται μείωση της κρυσταλλικότητάς τους ταυτόχρονα αυτή η διεργασία απαιτεί και τεράστια ποσά ενέργειας. Για τη βελτιστοποίηση και τον σχεδιασμό του εξοπλισμού μείωσης μεγέθους της βιομάζας, είναι απαραίτητο να είναι γνωστές οι μηχανικές ιδιότητες. Ο ρυθμός τροφοδοσίας του υλικού, το αρχικό μέγεθος των μορίων, οι μηχανικές μεταβλητές και η περιεχόμενη υγρασία επηρεάζουν άμεσα τις ενεργειακές απαιτήσεις για μείωση του μεγέθους του λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Οι υψηλές απαιτήσεις ενέργειας καθιστούν επιτακτική την ανάγκη, για διατήρηση ισορροπίας μεταξύ κόστους και αποτελεσματικής διάσπασης της δομής (Ye Sun and Jiayang Cheng, 2002; Γεντίκης, 2015).

1.5.3. Φυσικοχημικές μέθοδοι

Οι φυσικοχημικές μέθοδοι αποτελούνται από τον συνδυασμό των φυσικών και χημικών μεθόδων επεξεργασίας και σ' αυτές περιλαμβάνονται ακόμα η εκτόνωση υδρατμών (steam explosion) που αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο, η υδροθερμόλυση ή αυτοϋδρόλυση (liquid hot water), η εκτόνωση αερίων όπως η αμμωνία (Ammonia Fiber Explosion, AFX) και το διοξείδιο του άνθρακα, η χρήση μικροκυμάτων και η χρήση υπερήχων (Alvira et al., 2010; Gable and Zacchi, 2007; Hendriks and Zeeman, 2009; Kristensen et al., 2008; Mosier et al., 2005).

1.5.3.1. Ακτινοβολία μικροκυμάτων (Microwave Radiation, MWR)

Η μέθοδος αυτή, επιταχύνει βιολογικές, χημικές και φυσικές διεργασίες εξαιτίας της θερμότητας και των έντονων συγκρούσεων που εμφανίζονται από τη δόνηση των πολικών μορίων και την κίνηση των ιόντων (Sridar, 1988). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται από τις διηλεκτρικές ιδιότητες του εκάστοτε λιγνινοκυτταρινούχου υλικού. Η μέθοδος αυτή αυξάνει την ταχύτητα διάλυσης της κυτταρίνης στα ιονικά υγρά. Σε βιομάζα φυτικής προέλευσης η προεπεξεργασία και υδρόλυση με MWR για παραγωγή σακχάρων έγινε σ'ένα βήμα, παραλείποντας το στάδιο της υδρόλυσης, το γεγονός αυτό καθιστά τη μέθοδο αυτή πιο προσιτή οικονομικά. Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί η συνδυαστική χρήση MWR με κάποια άλλη μέθοδο προκατεργασίας, συμπεριλαμβανομένου των MWR-νερό, MWR-άλκαλι, MWR-οξύ, MWR-ιονικά υγρά, MWR-άλατα, αλλά και άλλες μεθόδους (Χυ, 2015). Η συνδυαστική χρήση MWR με άλκαλι απομακρύνει περισσότερη ημικυτταρίνη και λιγνίνη από το άχυρο σίτου, σε μικρότερο χρόνο, σχετικά με την παραδοσιακή μέθοδο αλκάλειος.

1.5.4 Χημικές μέθοδοι

Στις χημικές μεθόδους συμπεριλαμβάνονται η οζονόλυση, η όξινη υδρόλυση, η αλκαλική υδρόλυση, η οξειδωτική απολιγνοποίηση και η χρήση οργανικών διαλυτών. Αυτές οι μέθοδοι είναι εύκολες στη λειτουργία και επιφέρουν καλές αποδόσεις σε σύντομο χρονικό διάστημα (Sarkar et al., 2012; Sarris and Papanikolaou, 2016). Η οζονόλυση εστιάζεται κυρίως στην αποικοδόμηση της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης ενώ επηρεάζει ελάχιστα την κυτταρίνη χωρίς να παράγει τοξικούς αναστολείς για την υπόλοιπη διαδικασία. Στην όξινη υδρόλυση, χρησιμοποιούνται πυκνά ή πιο αραιά οξέα όπως το H₂SO₄ και το HCl (Prasad et al., 2007; Sarris and Papanikolaou, 2016). Στην αλκαλική προεπεξεργασία προστίθενται αραιές βάσεις όπως Ca(OH)₂ ή NaOH στη βιομάζα, οι οποίες αυξάνουν την εσωτερική επιφάνεια του υλικού (Sánchez and Cardona, 2008; Tomás- Pejó et al., 2008; Balat et al., 2008; Hayes, 2009). Η χημική μέθοδος προεπεξεργασίας έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή αρκετών ανασταλτικών παραγόντων για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών όπως το οξικό οξύ, οι φουρφουράλες και η 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (Sarkar et al., 2012; Sarris and Papanikolaou, 2016).

1.5.4.1. Υδρόλυση βιομάζας

Η προκατεργασία με οξύ έχει σαν στόχο να αυξήσει την προσβασιμότητα των ενζύμων στην στιβάδα της κυτταρίνης και της ημικυτταρίνης με την διαλυτοποίηση του ημικυτταρικού μέρους της βιομάζας (Γεντίκης, 2015). Η πλήρης υδρόλυση της κυτταρίνης έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μονομερών μονάδων γλυκόζης, ενώ της ημικυτταρίνης έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία πεντόζων και εξόζων (Karimi et al., 2006; Taherzadeh et al., 1997; Taherzadeh and Karimi, 2007). Η χρησιμοποίηση πυκνων οξέων γενικά αποφεύγεται λόγω του ότι είναι τοξικά, διαβρωτικά και πολύ επικίνδυνα (Lenihan, 2009), συνήθως χρησιμοποιούνται αραιά διαλύματα καθώς είναι πιο αποτελεσματικά. Συνήθως, τα οξέα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση είναι το νιτρικό, το φωσφορικό, το υδροχλωρικό και το θειικό οξύ (Markou et al., 2013). Το χαμηλό κόστος, η υψηλή ενεργότητα του αλλά και το γεγονός ότι είναι άμεσα διαθέσιμο χημικό για εφαρμογές στην βιομηχανία με χαμηλές επιπτώσεις για το περιβάλλον καθιστούν το θειικό οξύ ως το πιο διαδεδομένο οξύ για υδρολύσεις (Li et al., 2010; Harris et al., 1945; Taherzadeh and Karimi, 2007), επίσης ένα δεύτερο οξύ το οποίο χρησιμοποιείται εκτεταμένα είναι το HCl (Hashem and Rashad 1993; Taherzadeh and Karimi, 2007). Η αποτελεσματική υδρόλυση εξαρτάται από το είδος της βιομάζας και είναι συνδυασμός τριών παραμέτρων, αυτών της συγκέντρωσης του οξέος, του χρόνου της υδρόλυσης και της θερμοκρασίας. Έτσι, είναι απαραίτητο να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου και συγκέντρωσης οξέος της προκατεργασίας με αραιά οξέα, για την απόκτηση μέγιστων τιμών αναγωγικών σακχάρων. Τέλος, η υδρόλυση με οξέα χωρίζεται σε δύο κατηγορίες στην υδρόλυση με πυκνό οξύ και στην υδρόλυση με αραιό οξύ (Taherzadeh and Karimi, 2007).

1.5.4.2. Υδρόλυση με αραιό οξύ

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι αυτή της υδρόλυσης με αραιό οξύ. Είναι μια διεργασία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως προεπεξεργασία της ενζυματικής υδρόλυσης ή ως η βασική διεργασία υδρόλυσης της βιομάζας (Qureshi and Manderson, 1995; Taherzadeh and Karimi, 2007). Σε αυτή την επεξεργασία χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες (από 120-220 °C) για μικρά χρονικά διαστήματα (Markou et al., 2013). Ένα μειονέκτημα είναι ότι μειώνεται η απόδοση των διαθέσιμων προς ζύμωση σακχάρων αλλά ακόμα και τα παραπροϊόντα που παράγονται έχουν τη δυνατότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας της αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης όταν αυτή γίνεται σε ένα βήμα. Οι πιο συχνοί αναστολείς που μπορούμε να συναντήσουμε είναι το λεβουλικό οξύ, το οξικό οξύ, το φορμικό οξύ (γνωστά και ως καρβοξυλικά οξέα), το ουρονικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το βανιλικό οξύ, η βανιλίνη, φαινολικές ενώσεις, η κινναμαλδεΐδη, η φορμαλδεΐδη, οι φουρφουράλες και η 5-υδροξυμεθυλο-φουρφουράλη (5-hydroxymethylfurfural, HMF) (Larsson et al., 2000; Taherzadeh, 1999; Taherzadeh and Karimi, 2007). Για να αποφευχθεί η καταστροφή των μονοσακχαριτών καθώς και η δημιουργία παρεμποδιστών η υδρόλυση προτείνεται να διενεργηθεί σε δύο βήματα. Στο πρώτο στάδιο, το οποίο διεξάγεται σε ήπιες συνθήκες, η ημικυτταρίνη μετατρέπεται σε πεντόζες και εξόζες σε ποσοστό 80-95% των συνολικών σακχάρων. Στο δεύτερο στάδιο, η βιομάζα υδρολύεται κάτω

από πιο έντονες συνθήκες, επιτρέποντας την υδρόλυση της κυτταρίνης σε γλυκόζη σε ποσοστό 40-60% (Harris et al., 1984; Taherzadeh and Karimi, 2007).

1.5.4.3. Υδρόλυση με πυκνό οξύ

Η υδρόλυση με πυκνό θειικό ή υδροχλωρικό οξύ είναι μια σχετικά παλιά διαδικασία. Οι διεργασίες συμπυκνωμένων οξέων επιτυγχάνουν υψηλότερη απόδοση ζυμώσιμων σακχάρων (μέχρι 90% της θεωρητικής απόδοσης γλυκόζης) και συνεπώς υψηλότερη απόδοση αιθανόλης, σε σύγκριση με τις διεργασίες αραιού οξέος. Η υδρόλυση αυτή εξελίσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες από 40-50 °C και χρόνο διάρκειας της διαδικασίας από 2-4 ώρες (Markou et al., 2013) καθιστώντας την πιο γρήγορη μέθοδο σε σχέση με αυτή του αραιού οξέος. Η συγκέντρωση των οξέων είναι αρκετά υψηλή από 30-70% σε αυτή την μέθοδο καθώς και η θέρμανση κατά το διάστημα της υδρόλυσης την καθιστά αρκετά διαβρωτική. Κρίνεται απαραίτητη η ανάκτηση του οξέος για την μετέπειτα ζύμωση που θα ακολουθήσει και απαιτεί ενέργεια ενώ κατά την χρήση θειικού οξέος, η διαδικασία εξουδετέρωσης παράγει μεγάλες ποσότητες γύψου. Το υψηλό κόστος συντήρησης έχει μειώσει σημαντικά το εμπορικό ενδιαφέρον αυτής της διαδικασίας ενώ οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις περιορίζουν την εφαρμογή του υδροχλωρικού οξέος (Jones and Semrau, 1984; Katzen et al., 1995; Wyman, 1996; Taherzadeh and Karimi, 2007).

1.5.5. Βιολογικές μέθοδοι

Στις βιολογικές προκατεργασίες περιλαμβάνεται η χρήση μικροβίων και ενζύμων για την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Αυτές οι μέθοδοι επεξεργασίας είναι φιλικές προς το περιβάλλον λόγω του ότι δεν χρειάζονται υψηλές θερμοκρασίες και χημικά με αποτέλεσμα να μη δημιουργούνται παράγοντες που δρουν παρεμποδιστικά αυξάνοντας την απόδοση της διαδικασίας της ζύμωσης. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ο αργός ρυθμός της υδρόλυσης καθώς επίσης και το γεγονός ότι ένα μέρος της πρώτης ύλης καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς (Harun and Danquah, 2011).

1.5.5.1. Ενζυμική υδρόλυση

Στην ενζυμική υδρόλυση χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα ένζυμα που λύουν πολύ συγκεκριμένους χημικούς δεσμούς των πολυμερών υδατανθράκων παράγοντας μονομερή σάκχαρα. Διαφορετικά ένζυμα χρησιμοποιούνται για την λύση των δεσμών της κυτταρίνης και διαφορετικά για το άμυλο και το γλυκογόνο. Για την υδρόλυση της κυτταρίνης τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι διάφορες κυτταρινάσες που παράγονται από βακτήρια ή μύκητες. Ενδεικτικά, κάποια από αυτά τα βακτήρια ανήκουν στα γένη: *Acetovibri*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Erwinia*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Microbispora*, *Streptomyces* και κάποιοι μύκητες στα γένη *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Schizophillum* (Chandel et al., 2007; Galbe and Zacchi, 2002; Lin and Tanaka, 2006; Sun and Cheng, 2002; Markou et al., 2013). Η ενζυμική

υδρόλυση λαμβάνει χώρα κάτω από ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και πίεσης ενώ ο χρησιμοποιούμενος εξοπλισμός είναι απλός καθώς δεν επιφέρεται διάβρωση. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την δράση των ενζύμων είναι περίπου οι 50°C και βέλτιστο pH περίπου 5.0 (Gable and Zacchi, 2002; Sun and Cheng, 2002; Maitan-Alfenas et al., 2014). Ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο αργός ρυθμός υδρόλυσης και το μεγάλο οικονομικό κόστος των ενζύμων σε σχέση με την όξινη υδρόλυση (Lynd et al., 2002). Ωστόσο, είναι μια εξαιρετικά φιλική προς το περιβάλλον διεργασία και οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις γλυκόζης χωρίς την παραγωγή παρεμποδιστικών παραπροϊόντων (Ho et al., 2013).

1.5.5.2. Ενζυμική υδρόλυση κυτταρίνης

Η παραδοσιακή θεώρηση της υδρόλυσης της κυτταρίνης περιλαμβάνει τρεις τύπους υδρολυτικών ενζύμων: (α) ενδογλουκανάσες **IUBMB Enzyme Nomenclature: EC 3.2.1.4**, (β) εξωγλουκανάσες **IUBMB Enzyme Nomenclature: EC 3.2.1.91** στις οποίες περιλαμβάνονται οι κυτταροδεξτρινάσες και οι κελλοβιοϋδρολάσες και (γ) β-γλυκοζιδάσες **IUBMB Enzyme Nomenclature: EC 3.2.1.74**. Οι ένδο-υδρολάσες προσβάλλουν τις άμορφες περιοχές της κυτταρίνης, οι έξω-υδρολάσες απομακρύνουν σταδιακά κελλοολιγοσακχαρίτες από τα άκρα της αλυσίδας και οι β-γλυκοζιδάσες υδρολύουν τις διαλυτές κελλοδεξτρίνες και την κελλοβιόζη προς γλυκόζη. Παρά την συνεργιστική δράση των προαναφερθέντων βιοκαταλυτών, η εντυπωσιακή αποτελεσματικότητα στην αποικοδόμηση της βιομάζας που επιδεικνύουν διάφοροι μικροοργανισμοί δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στον προαναφερθέντα ενδο-εξω υδρολυτικό μηχανισμό αλλά και σε μια νέα τάξη γλυκολυτικών οξειδωτικών ενζύμων (glycolytic oxidative enzymes) βακτηριακής και μυκητιακής προέλευσης (Dimarogona et al., 2012). Διαφορές εργαστηριακές δοκιμές έδειξαν ότι τα συγκεκριμένα ενζυμα καταλύουν την διασπαση των γλυκοζιτικών δεσμών της γλυκόζης μέσω του οξειδωτικού μηχανισμού, κανοντας έτσι την δραση των κυτταρινολυτικων ενζυμων πιο ευκολη λογω του ότι το υποστρωμα προσβαλλεται πιο ευκολα απ αυτά. Τα ενζυμα αυτά έχουν ταξινομηθεί στην κατηγορία των Lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) ενώ η δράση τους οδηγεί στη δημιουργία οξειδομένων άκρων της αλυσίδας της κυτταρίνης. Ο παραπάνω μηχανισμός διασπα μια αλυσίδα γλυκάνης από τις κρυσταλλικές περιοχές της κυτταρίνης, δημιουργώντας έτσι νέα άκρα για τη δράση της εξωγλουκανάσας (Γεντίκης, 2017; Ezeilo et al., 2017).

1.5.5.3. Ενζυμική υδρόλυση ημικυτταρίνης

Η υδρόλυση του τμήματος της ημικυτταρίνης απαιτεί ένα πιο περίπλοκο σύνολο ενζύμων, τα οποία ονομάζονται ημικυτταρινάσες. Η πλήρης ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης, του κυριότερου πολυμερούς που εντοπίζεται στην ημικυτταρίνη, απαιτεί την ενδο-β-1,4-ξυλανάση, η οποία δρα τυχαία στους εσωτερικούς δεσμούς, για την απελευθέρωση ξυλο-ολιγοσακχαριτών και της β-ξυλοζιδάσης, η οποία υδρολύει τα μη αναγωγικά άκρα των αλυσίδων ξυλόζης προς απελευθέρωση ξυλόζης. Επιπλέον, απαιτούνται αρκετά βοηθητικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένης της α-1-αραβινοφουρανοζιδάσης, της α-γαλακτοζιδάσης,

της ακετυλο-ξυλανοεστεράσης καθώς και της εστεράσης φερουλικού οξέος (Maitan-Alfenas, 2015).

1.5.5.4. Ενζυμική υδρόλυση αμύλου

Η κύρια κατηγορία των ενζύμων που υδρολύουν τους α-(1 → 4) δεσμούς του αμύλου είναι οι α-αμυλάσες. Αυτά τα ένζυμα παράγονται από βακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα. Οι α-αμυλάσες είναι ένζυμα που προσβάλλουν τα εσωτερικά τμήματα των πολυμερικών αλυσίδων του αμύλου, προκαλώντας μια ταχεία μείωση του ιξώδους και μια ταχεία μεταβολή του χρώματος του διαλύματος. Όταν η α-αμυλάση προσβάλει μια αλυσίδα αμύλου και υδρολύσει τον α-(1 → 4) δεσμό, παράγονται μαλτοδεξτρίνες χαμηλού μοριακού βάρους με μια διαδικασία που ονομάζεται “πολλαπλή επίθεση” σε μία από τις δύο αλυσίδες που αρχικά είχαν διασπαστεί (Robyt, 1967; Robyt, 1970). Υπάρχει μια λανθασμένη εντύπωση σχετικά με τη δράση των α-αμυλασών που σχετίζεται με το ότι δρουν τυχαία, κάτι το οποίο δεν είναι αλήθεια. Τα μόνα προϊόντα μαλτοδεξτρίνης που δημιουργούνται είναι συγκεκριμένου μεγέθους και εξαρτώνται από την ιδιαίτερη βιολογική πηγή της α-αμυλάσης. Μια ακόμη πιο κοινή παρανόηση, σχετικά με τη δράση των α-αμυλασών, είναι ότι η γλυκόζη είναι το κύριο προϊόν ενώ στην πραγματικότητα, είναι ένα δευτερεύον προϊόν, που παράγεται από μια αργή δευτερεύουσα υδρόλυση της πρωτογενούς μαλτοδεξτρίνης μετά από δράση του ενζύμου αμυλογλυκοζιδάση (Robyt, 1967; Χριστακόπουλος και Τόπακας, 2015; Πατρινού, 2017; Γεντίκης, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ζύμες

Με τον όρο ζύμες αναφερόμαστε σε **βασιδιομύκητες ή ασκομύκητες**, οι οποίοι έχουν μονοκύτταρη βλαστική φάση. Συνθέτουν μια μεγάλη ομάδα μονοκύτταρων, ευκαρυωτικών μυκήτων με ετερογενή ταξινόμηση και είναι ευρέως διαδεδομένες στο φυσικό περιβάλλον ενώ διαθέτουν ποικιλία σε μέγεθος, σχήμα αλλά και χρώμα ανάλογα βέβαια με το γένος ή το είδος στο οποίο ανήκουν. Λόγω του μικρού τους μεγέθους η παρατήρηση τους μπορεί να γίνει μόνο με την χρήση του μικροσκοπίου. Υπάρχει μια μεγάλη διαφοροποίηση στο μήκος των κυττάρων, το οποίο μπορεί να είναι από 2-3 μm ή ακόμα και 20-50 μm σε ορισμένα είδη. Ενώ το πλάτος τους κυμαίνεται από 1-10 μm. Το σχήμα του κυττάρου επηρεάζεται με την λειτουργία του κυττάρου ενώ διαθέτει την ικανότητα να διαφοροποιείται με την επίδραση διαφόρων εξωτερικών συνθηκών όπως είναι η επιφανειακή τάση, σύσταση του θρεπτικού μέσου καθώς και η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η ζύμωση. Τα σχήματα με τα οποία μπορεί να εμφανίζονται τα κύτταρα της ζύμης είναι ελλειψοειδή - ωοειδή (*Saccharomyces spp.*), κυλινδρικά με ημισφαιρικά άκρα (*Schizosaccharomyces spp.*), φιαλόμορφα (*Pityrosporium spp.*), νηματοειδή (με ψευδοϋφές και υφές με διαφράγματα π.χ. *Candida albicans*), τριγωνικά (*Trigonopsis spp.*), καμπυλωτά (*Cryptococcus cereanus*), σφαιρικά ή επιμηκυμένα (Παπανικολάου, 2006). Τελος πολλαπλασιάζονται με αγενή τρόπο δηλαδή με εκβλάστηση, διχοτόμηση –διαίρεση καθώς και με συνδυασμό των δυο τρόπων ή με εγγενή τρόπο δηλαδή με την δημιουργία ασκοσπορίων (Αγνάντης, 2016).

2.1. Χημική σύσταση των ζυμών

Οι ζύμες (Πλατανοπούλου, 2017) αυτές χαρακτηρίζονται ως ετερότροφοι οργανισμοί καθώς χρησιμοποιούν σαν πηγή άνθρακα τα σάκχαρα. Σε αερόβιες συνθήκες εκτελούν το φαινόμενο της αναπνοής, η πρόσληψη του άνθρακα γίνεται κυρίως από σάκχαρα, γλυκερόλη, αμινοξέα, αλκοόλη, αλδεΐδες κλπ, ενώ στις αναερόβιες συνθήκες από εξόζες και κάποιους δισακχαρίτες, παράγοντας ταυτόχρονα αλκοόλη. Ένας ακόμα πολύ σημαντικός παράγοντας είναι και η πρόσληψη αμμωνιακού αζώτου το οποίο σε συνθήκες έλλειψης το προμηθεύονται από τα αμινοξέα, τα πολυπεπίδια αλλά και από κάποιες πρωτεΐνες. Η αυξημένη συγκέντρωση σε άζωτο αυξάνει την ζυμωτική τους ικανότητα (Σουφλερός, 2009). Οι ζύμες αποτελούνται 75% νερό και 25 % ξηρή ουσία, η οποία περιλαμβάνει:

1. Υδατάνθρακες 25-50 % (κυρίως γλυκογόνο)
2. Πρωτεΐνες 30-75%
3. Ανόργανες ουσίες 5-10%
4. Λιπίδια 2-5%
5. Ένζυμα
6. Βιταμίνες

2.2. Φάσεις αυξητικού κύκλου ζωής των ζυμών

2.2.1. Λανθάνουσα Φάση: Το στάδιο αυτό αναφέρεται στη διαδικασία προσαρμογής των κυττάρων στις καινούργιες συνθήκες καθώς επίσης δεν συμβαίνει και αύξηση της βιομάζας στην καλλιέργεια υπάρχει όμως βιοσύνθεση RNA και πρωτεϊνών. Υπάρχει η δυνατότητα παραμονής σ' αυτού του είδους την κατάσταση όταν:

- α) Το υπόστρωμα έχει τοξικά συστατικά για τον μικροοργανισμό, β) Συναντάται ένα δύστροπο υπόστρωμα, γ) Υπάρχει ανεπιτυχής εμβολιασμός, δ) Έχει γίνει λάθος στην προκαλλιέργεια.

2.2.2. Επιταχυνόμενη Φάση Αύξησης: Αποτελεί μια χρονικά σύντομη φάση μεταξύ lag phase -φάση καθυστέρησης και φάση εκθετικής αύξησης. Αρχίζει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

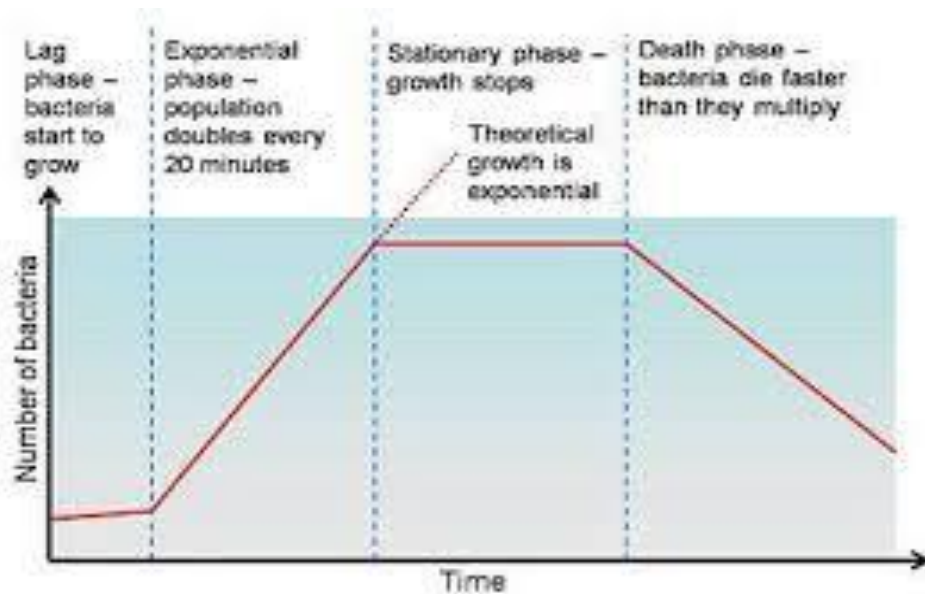
2.2.3. Εκθετική Φάση: Σ' αυτό το σημείο συναντάμε σχεδόν μηδενική θνησιμότητα των κυττάρων ενώ τα κύτταρα αυξάνονται πάρα πολύ γρήγορα.

2.2.4. Επιβραδυνόμενη φάση αύξησης: Η ταχύτητα πολλαπλασιασμού των ζυμών μικραίνει και η καμπύλη ανάπτυξης αρχίζει να οριζοντιώνεται.

2.2.5. Στάσιμη φάση αυξητικού κύκλου: Δεν υπάρχει αύξηση του πληθυσμού σε αυτό το σημείο, όμως ο πληθυσμός είναι μεταβολικά ενεργός. Η καμπύλη παίρνει οριζόντια μορφή και ο πληθυσμός μένει σταθερός για ένα αρκετό χρονικό διάστημα.

2.2.6. Φάση Θανάτου-Αυτόλυσης: Σ αυτό το σημείο παρατηρείται ελάττωση του πληθυσμού των ζυμών και αυτόλυσή τους, ελευθερώνοντας τα συστατικά τους. Η καμπύλη αρχίζει να έχει καθοδική πορεία και ο χρόνος διάρκειας του συγκεκριμένου σταδίου εξαρτάται από τον μέγιστο αριθμό των κυττάρων που υπήρχαν στην

στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου καθώς και από τη διάρκεια της φάσης αυτής (Σουφλερός, 2009; Παπανικολάου, 2019).



Εικόνα 2.2.14: Αυξητικοί κύκλοι ζωής ζυμών (<https://www.google.com/search?q>)

2.3. Προσαρμοστικότητα των ζυμομυκήτων στο περιβάλλον ανάπτυξής τους

Η ικανότητα αύξησης των ζυμών εξαρτάται από τις συνθήκες που υπάρχουν στο περιβάλλον ανάπτυξής τους. Καθώς οι ζύμες είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί έχουν την δυνατότητα ανάλογα και με τις συνθήκες που επικρατούν έξωθεν του κυττάρου να παράγουν την απαραίτητη ενέργεια που χρειάζεται για την αύξηση – ανάπτυξη του διαμέσου δυο μεταβολικών μονοπατιών, αυτό της αναπνοής ή αυτό της αλκοολικής ζύμωσης. Το μεταβολικό μονοπάτι της αναπνοής αρχίζει με τη γλυκόλυση και τελειώνει με την οξειδωτική φωσφορυλίωση ενώ το μεταβολικό μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης αρχίζει με την γλυκόλυση και τελειώνει στην αλκοολική ζύμωση. Σ' αυτό το σημείο η ύπαρξη ή μη του οξυγόνου παίζει καθοριστικό ρόλο για το ποια από τις δυο οδούς θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός. Επειδή οι ζύμες είναι ετερότροφοι οργανισμοί και ο μεταβολισμός τους εξαρτάται από την παρουσία διοξειδίου του άνθρακα τον οποίο όμως δεν έχουν την δυνατότητα να το αφομοιώσουν, αυτό θα πρέπει να είναι διαθέσιμο στο θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αυτές αναπτύσσονται. Οι απαιτήσεις τους κυμαίνονται ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία του οξυγόνου. Σε αερόβιες συνθήκες που τελούν υπό το φαινόμενο της αναπνοής, κάνουν την χρήση της ενέργειας και της ύλης από πλήθος μορίων (π.χ. σάκχαρα, γλυκερόλη, αμινοξέα, αλκοόλη κλπ.). Ενώ κάτω από αναερόβιες συνθήκες έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν μόνο ένα μικρό αριθμό σακχάρων δίνοντας έμφαση κυρίως στις εξόζες D-γλυκόζη, D-μαννόζη, D-φρουκτόζη και κάποιες τη D-γαλακτόζη. Έχουν τη δυνατότητα χρήσης και μερικών δισακχαριτών μετά βέβαια από την μετατροπή

τους σε μονοσακχαρίτες. Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο για την επιβίωση των ζυμών είναι το άζωτο, το οποίο αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων το οποίο συναντάμε σε αφθονία στο υπόστρωμα. Σε περίπτωση που τελειώσει το αμμωνιακό άζωτο που αποτελεί την πιο εύκολα αφομοιώσιμη μορφή αζώτου, οι ζύμες προμηθεύονται το άζωτο από τα αμινοξέα, τα πολυπεπτίδια αλλά και από ορισμένες πρωτεΐνες. Ενώ τέλος τα ανόργανα φωσφορικά άλατα αλλά και οι φωσφορικοί εστέρες αποτελούν τις πηγές αφομοίωσης του φωσφόρου (Πλατανοπούλου, 2017).

2.4. Φυσιολογία των ζυμομυκήτων

Η φυσιολογία των ζυμομυκήτων θέτει τις παραμέτρους που πρέπει να ακολουθούνται προκειμένου να αναπτυχθεί μια καλλιέργεια ζυμομυκήτων. Οι μικροοργανισμοί χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με την ανάπτυξη τους σε διάφορες φυσιολογικές συνθήκες. Ανάλογα με την άριστη τιμή της θερμοκρασίας ανάπτυξης χωρίζονται σε ψυχρόφιλους, μεσόφιλους και θερμόφιλους. Οι ζυμομυκήτες κατατάσσονται στους ψυχρόφιλους και μεσόφιλους οργανισμούς. Έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν αλλά και να δραστηριοποιηθούν είτε σε θερμοκρασίες μικρότερες των 20°C, είτε σε θερμοκρασίες ανάμεσα στους 20-45. Κατά την περίοδο της εκθετικής αύξησης τους, η θερμοκρασία παίζει σπουδαίο ρόλο στην διαδικασία διαίρεσης των κυττάρων. Σε θερμοκρασία 10°C η κυτταρική διαίρεση δύναται να πραγματοποιείται κάθε 12 ώρες, στους 20°C ανά 5 ώρες και στους 30 °C διαιρούνται ανά 3 ώρες. Επιπλέον, η συγκέντρωση του σακχάρου που είναι διαλυμένη στο μέσο καθώς και η τιμή του pH αποτελούν δύο ακόμα πολύ σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την κυτταρική διαίρεση. Έχει βρεθεί ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες η διαδικασία της ζύμωσης εξελίσσεται ταχύτατα, η άριστη τιμή είναι 30-39°C, αυτό εξαρτάται βέβαια και από το είδος της ζύμης. Βέβαια αν η θερμοκρασία ξεπεράσει ορισμένες οριακές τιμές η ταχύτητα της ζύμωσης μειώνεται, δηλαδή σε αυτές τις συνθήκες ζυμώνονται λιγότερα σάκχαρα το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση του ποσοστού της παραγόμενης αιθανόλης. Οι ζυμομυκήτες ανάλογα με την παρουσία ή όχι μοριακού οξυγόνου διαφοροποιούν την συμπεριφορά τους δηλαδή σε περίσσεια μοριακού οξυγόνου (αερόβιες συνθήκες) παράγουν βιομάζα ενώ στις αναερόβιες συνθήκες (απουσία οξυγόνου) παράγουν αλκοόλη. Επίσης υπάρχουν οσμώφιλοι και υπερωσμώφιλοι που αναπτύσσονται σε υψηλές ωσμωτικές πιέσεις όπως αλυκές καθώς και σε περιβάλλοντα όπως η νεκρά θάλασσα που έχει υψηλή αλατότητα. Πολλές φορές οι τροφές προσβάλλονται από μικροοργανισμούς που έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με υψηλή ωσμωτική πίεση. Οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν σε υψηλά επίπεδα γλυκερίνη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη και άλλες πολυοξυαλκοόλες. Οι ενδημικοί μηχανισμοί του κυττάρου των ζυμομυκήτων χρησιμοποιούν τις ουσίες αυτές προκειμένου να προστατευτούν από την επίδραση της χαμηλής ενεργότητας του νερού (aw) καθώς και της ωσμωτικής πίεσης (Νεραντζής, Ταταρίδης και Λογοθέτης, 2016).

2.5. Χαρακτηριστικά του είδους του *S.cerevisiae*

Η μαγιά που συνδέεται στενότερα με την ανθρωπότητα, το *Saccharomyces cerevisiae*, χρησιμοποιείται εδώ και πολύ καιρό για την παρασκευή, την απόσταξη (τόσο για πόσιμο αλκοόλ όσο και για τη βιομηχανική αλκοόλη), την οινοποίηση και το ψήσιμο ψωμιού, και για εκχυλίσματα ζύμης για τρόφιμα και αρωματικές ουσίες καθώς και θεραπευτικούς σκοπούς. Είναι μακράν το πιο μελετημένο και καλύτερα κατανοητό είδος του τομέα ζύμης και ένα σημαντικό πρότυπο σύστημα για βασική έρευνα στη βιολογία του ευκαρυωτικού κυττάρου. Πράγματι, η ικανότητα ορθολογικού χειρισμού όλων των πτυχών της γονιδιακής της έκφρασης με γενετικές τεχνικές *in vitro* προσφέρει στο *S. cerevisiae* μια μοναδική θέση μεταξύ των ευκαρυωτικών. Το *S. cerevisiae* είναι ο τυπος του είδους του γένους *Saccharomyces*, που εισήχθη από τον Meyen (1838) και ορίστηκε από τον Rees το 1870. Ο Hansen περιέγραψε τη ζύμη μύρας, *S. cerevisiae*, το 1888 (η πρώτη ιστορία της έρευνας *Saccharomyces* συζητείται από τους Holter and Moller, (1976). Το είδος είναι μέλος της οικογένειας *Saccharomycetaceae* και της υποοικογένειας *Saccharomycetoideae*, που χαρακτηρίζεται ως μονοκύτταρος μύκητας που αναπαράγεται βλαστικά με πολυμερή εκκολαπτόμενο και σεξουαλικά μέσω ασκοσπορίων. Τα *asci* είναι ανθεκτικά και περιέχουν ένα έως τέσσερα ασκοσπόρια σφαιρίνης. Τα φυτικά κύτταρα είναι σφαιρίδια, ωοειδή, ή κυλινδρικά και εμφανίζονται βουτυρώδη και ανοιχτόχρωμα, ενώ η επιφάνεια είναι λεία και επίπεδη. Η ταξινόμηση του *S. cerevisiae* έχει υποστεί σημαντικές αλλαγές, ειδικά με την επίδραση της μοριακής βιολογίας στην ταξινόμησή της. Με τα χρόνια, το γένος περιελάμβανε μεταβλητό αριθμό ετερογενών ειδών, έως και 41 είδη το 1970. Μετά από εκτεταμένη αναδιάταξη ειδών και γενών, επτά είδη αναγνωρίστηκαν το 1984. Το *S. cerevisiae* αντιπροσώπευε περίπου 21 παλαιότερα *taxa* που ομαδοποιήθηκαν σε *Saccharomyces sensu stricto*, δικαιολογημένα ταξινομικά από φυσιολογικές δοκιμές. Η γενετική ανάλυση, ωστόσο, αντιφάσκει με την συγχώνευση και κατά συνέπεια το είδος διαχωρίστηκε σε τέσσερα είδη που σχετίζονται με μεταβλητότητα το 1985. Ο διαχωρισμός των τεσσάρων ειδών παραμένει αβέβαιος με φυσιολογικές δοκιμές λόγω εξαιρέσεων που υπάρχουν όταν εμπλέκονται μεγαλύτερες ομάδες στελεχών. Το 1990, προτάθηκαν επτά είδη, που απαριθμούν 130 συνώνυμα για το *S. cerevisiae* με την προσθήκη πολλών υποειδών και ποικιλιών που συναντώνται στην αρτοποιία, ζυθοποιία, καθώς και είδη που απαντώνται στη φύση. Αυτή τη στιγμή, ορισμένοι ταξινομολόγοι απέφυγαν να κάνουν διάκριση μεταξύ στενών συγγενών ειδών *Saccharomyces* μόνο με βάση την υβριδοποίηση DNA-DNA και κατά συνέπεια τοποθέτησαν αυτά τα είδη στο *S. cerevisiae*. Μόνο τη δεκαετία του 1990 καταγράφηκαν οι ιδιότητες αυτού του είδους. Ένας μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων έχει συσσωρευτεί για περισσότερο από έναν αιώνα συζητώντας λεπτομερώς τη φυσιολογία, τη βιοχημεία και τη μοριακή βιολογία του *S. cerevisiae*. Η σημασία της ζύμης ως ζυμωτικού είδους, ιδιαίτερα για το ρόλο της στις αλκοολικές ζυμώσεις, ώθησε πολλούς επιστήμονες να μελετήσουν τους παράγοντες που διέπουν την ανάπτυξη, την επιβίωση και τις βιολογικές δραστηριότητες αυτού του κρίσιμου είδους σε διαφορετικά οικοσυστήματα τροφίμων. Το είδος μπορεί να ζυμώσει σάκχαρα εξόζης, όπως D-glucose, D-fructose και D-mannose. Ο ρυθμός ζύμωσης D-γλυκόζης είναι συνήθως ο πιο επιθετικός. Άλλα σάκχαρα που μπορούν να ζυμωθούν

από τα περισσότερα στελέχη του *S. cerevisiae* περιλαμβάνουν τη σακχαρόζη, τη μαλτόζη, τη μαλτροτριόζη και τη D-γαλακτόζη, ενώ οι δεξτρίνες και το άμυλο ζυμώνονται μόνο από εξειδικευμένες ποικιλίες του *S. cerevisiae* (*Saccharomyces diastolicus*) και η λακτόζη δεν ζυμώνεται από αυτό το είδος. Πολλά ανόργανα άλατα αμμωνίου έχουν βρεθεί ότι προάγουν την ανάπτυξη, ενώ τα στελέχη παρουσιάζουν διαφορετικές ικανότητες να χρησιμοποιούν ελεύθερα αμινοξέα. Τα νιτρικά καθώς και τα L-αμινοξέα όπως η L-προλίνη συνήθως δεν χρησιμοποιούνται. Αντίθετα, ορισμένα στελέχη *S. cerevisiae* μπορούν να χρησιμοποιούν την ουρία ως πηγή αζώτου. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες απαιτούνται από ορισμένα στελέχη *S. cerevisiae*, τα οποία ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης για να ανακουφίσουν το κύτταρο από την ανάγκη σύνθεσης της ένωσης, εξοικονομώντας έτσι ενέργεια. Η ανεπάρκεια της ινοσιτόλης μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερο αποτελεσματική κυτταρική διαίρεση και η ανεπάρκεια θειαμίνης απουσία πυριδοξίνης μειώνει την ανάπτυξη. Ορισμένα στελέχη, ωστόσο, απαιτούν είτε θειαμίνη είτε πυριδοξίνη, την πρώτη διεγερτική ανάπτυξη. Η βιοτίνη και το παντοθενικό είναι επίσης απαραίτητα για όλα τα στελέχη του *S. cerevisiae*. Όσον αφορά την εμφάνιση και την επιβίωσή τους σε τρόφιμα και ποτά, το πιο διακριτικό χαρακτηριστικό των ειδών *Saccharomyces* φαίνεται να είναι η ανοχή τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Η αντίσταση των διαφορετικών στελεχών *S. cerevisiae* μπορεί να ποικίλει, αλλά γενικά, τα περισσότερα στελέχη είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε ποτά που περιέχουν 8-12% αιθανόλη (ο / ο) και θα επιβιώσουν συγκεντρώσεις περίπου 15%. Οι φυσιολογικές ζυμώσεις γλυκόζης μπορεί να αποδώσουν συγκεντρώσεις περίπου 12% αιθανόλης, ενώ οι ζυμώσεις σάκε μπορούν να δώσουν συγκεντρώσεις έως και 20% αιθανόλη όταν η παρουσία ακόρεστων λιπαρών οξέων προάγει την ανοχή στο αλκοόλ. Η ευαισθησία του είδους στην αιθανόλη, ωστόσο, αυξάνεται με θερμοκρασίες > 30 °C ή <10 C. Κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων για παραγωγή αιθανόλης, θερμοκρασίες 5-10 °C υψηλότερες από το βέλτιστο αποτέλεσμα οδηγούν σε μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων αλλά σε αύξηση της παραγωγικότητας της αιθανόλης. Αν και τα περισσότερα στελέχη *S. cerevisiae* θα αναπτυχθούν σε οποιαδήποτε θερμοκρασία μεταξύ 5 °C και 40°C, η βέλτιστη θερμοκρασία για τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης εξαρτάται από το στέλεχος, γενικά στην περιοχή των 25-35 °C. Το *S. cerevisiae*, όπως όλες οι ζύμες, προτιμά ένα ελαφρώς όξινο μέσο με βέλτιστο pH μεταξύ 4,5 και 6,5.

2.6. Φαινόμενα που σχετίζονται με τις συνθήκες της ζύμωσης

Τα φαινόμενα που εξαρτώνται βάση φυσιολογίας από το οξυγόνο χωρίζονται σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους. Η εμφάνιση του κάθε τύπου εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού καθώς και από το σακχαρούχο υπόστρωμα (Weusthuis et al., 1994). Τα φαινόμενα αυτά χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες :

- A. Φαινόμενο Crabtree:** Υπάρχει αναστολή της κυτταρικής αναπνοής, σε συνθήκες περίσσειας σακχάρου, με παρουσία οξυγόνου.
- B. Φαινόμενο Pasteur:** Αναστέλλει την αλκοολική ζύμωση παρουσία οξυγόνου.
- Γ. Φαινόμενο Custers:** Αναστέλλει την αλκοολική ζύμωση από την απουσία οξυγόνου .

Δ. Φαινόμενο Kluyver: Αναφέρεται στην ικανότητα ορισμένων ζυμών να χρησιμοποιούν μερικούς δισακχαριτες σε αερόβιες συνθήκες και όχι σε αναερόβιες, ενώ αναερόβια μπορούν να χρησιμοποιούν μόνο τα κατάλοιπα τους.

A. Φαινόμενο Crabtree

Σε υποστρώματα που η πηγή άνθρακα είναι περιορισμένη (γλυκόζη) και αναπτύσσονται σε αυτά μικροοργανισμοί, η παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα είναι ίση με την κατανάλωση του οξυγόνου. Σε αυτές τις συνθήκες το επίπεδο των σακχάρων είναι χαμηλό ενώ το επίπεδο της βιομάζας είναι υψηλό κι αυτό μπορεί να φτάνει τα 0,5 g/g. Ο μικροοργανισμός αναπαράγεται με μεγαλύτερη ταχύτητα σε ένα μέσο όσο αυξάνεται η γλυκόζη προκειμένου να διατηρήσει ένα σταθερό πληθυσμό στο μέσο. Τόσο η παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα όσο και η κατανάλωση του οξυγόνου αυξάνονται αναλογικά με την αύξηση των σακχάρων, αλλά συνδέονται μέχρι ενός κρίσιμου σημείου (~ 9 g/L). Την στιγμή που η συγκέντρωση της γλυκόζης ξεπεράσει το συγκεκριμένο κρίσιμο σημείο αρχίζει η ζύμωση, έτσι συνεχίζει η αυξανόμενη παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα αλλά πλέον δεν συνδέεται με τον ίδιο τρόπο με την κατανάλωση του οξυγόνου. Με την έναρξη της ζύμωσης σηματοδοτείται και η κατακόρυφη πτώση της βιομάζας σε επίπεδα κάτω από τα 0,2 g/g (Pfeiffer & Morley, 2014). Τα κύτταρα είναι σαν να αντιλαμβάνονται την ύπαρξη της γλυκόζης και μεταφέρουν ένα σήμα για παύση της αναπνευστικής λειτουργίας (Postma et al., 1989). Στις αερόβιες συνθήκες, η κυτταρική αναπνοή είναι δυνατή καθώς το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων όμως ο *Saccharomyces cerevisiae* και μερικοί ακόμη μικροοργανισμοί συνεχίζουν να κάνουν αλκοολική ζύμωση μέχρις ότου η γλυκόζη τελειώσει από το υπόστρωμα. Αυτό είναι το φαινόμενο Crabtree (Comragno et al., 2014).

Στην περίπτωση της αλκοολικής ζύμωσης ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων είναι η αιθανόλη, δηλαδή μια ακεταλδεύδη η οποία στην συνέχεια μετατρέπεται σε αιθανόλη. Παρατηρείται ότι οι ζύμες που είναι θετικές στο φαινόμενο Crabtree εκτελούν ζύμωση ακόμα και με την παρουσία οξυγόνου. Τέλος, οι ζύμες ανάλογα με τον κορεσμό τους σε οξυγόνο αλλά και από την συγκέντρωση του σακχάρου μπορούν να εμφανίσουν συμπεριφορές που θα αναφερθούν παρακάτω:

Οι αρνητικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες:

- I. Παρουσία οξυγόνου παράγουν βιομάζα και όχι αιθανόλη
- II. Απουσία οξυγόνου δεν παράγουν καθόλου βιομάζα και αιθανόλη

Οι θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζύμες:

- I. Σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων παράγεται αιθανόλη
- II. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις σακχάρων παράγεται βιομάζα

B. Φαινόμενο Pasteur

Αποτελεί το δεύτερο φαινόμενο που καθορίζει το μεταβολισμό των σακχάρων και σύμφωνα μ' αυτό η αναπνοή εμποδίζει την αλκοολική ζύμωση. Όταν η συγκέντρωση σακχάρων στο υπόστρωμα είναι μικρή και έτσι δεν παρεμποδίζει την οξειδωτική φωσφορυλίωση τότε ο μικροοργανισμός έχει την δυνατότητα να αποικοδομήσει τα σάκχαρα και με τους δυο τρόπους. Όταν όμως υπάρχει οξυγόνο

ευνοείται η αναπνευστική αλυσίδα αλλά και ο σχηματισμός βιομάζας ενώ η παραγωγή αιθανόλης και η κατανάλωση σακχάρων μειώνεται.

Γ. Φαινόμενο Custers

Έχει να κάνει με την παρεμπόδιση της ζύμωσης κάτω από αναερόβιες συνθήκες και θεωρείται κοινό χαρακτηριστικό των ζυμών που ανήκουν στις ομάδες *Brettanomyces* και *Dekkera* (Wijsman et al., 1984). Στις αερόβιες συνθήκες αυτές οι ζύμες μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθανόλη αλλά και οξεικό οξύ (Rodrigues et al., 2006). Παρόλα αυτά στις αναερόβιες συνθήκες αναστέλλεται πολύ η ζύμωση κι αυτό μπορεί να σταματήσει να ισχύει με την εισαγωγή οξυγόνου στο μέσο.

Δ. Φαινόμενο Kluyver

Αναφέρεται ότι παρουσία οξυγόνου απουσιάζει η αλκοολική ζύμωση κατά το διάστημα μειωμένης ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα σακχάρου, τις περισσότερες φορές δισακχαρίτη, ακόμα και όταν η γλυκόζη είναι άμεσα ζυμώσιμη (Pronk, 1996). Σε πολλές περιπτώσεις ο πολλαπλασιασμός σε μερικά σάκχαρα (κυρίως ολιγοσακχαρίτες) συμβαίνει μόνο υπό αερόβιες συνθήκες και όχι στις αναερόβιες και με απουσία της αναπνοής. Κάτω απ αυτές τις συνθήκες η ζύμωση είναι αποκλεισμένη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιοχημικοί κύκλοι

3.1. Γλυκόλυση EMBDEN –MEYERHOF-PARNAS

Η αρχή γίνεται με τη διαδικασία μετατροπής της γλυκόζης και της φρουκτόζης σε πιο μικρά μόρια και σαν τελικό προϊόν σχηματίζεται η αιθανόλη. Το μονοπάτι αυτό καλείται γλυκόλυση και αυτή η ανακάλυψη έγινε από τους Gustav Embden, Otto Meyerhof και Jakub Karol Parnas, το οποίο αρχίζει με τη γλυκόζη και τελειώνει στο πυροσταφυλικό οξύ. Η διαδικασία αυτή διενεργείται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων με συνολική αντίδραση αυτήν που ακολουθεί:

Γλυκόζη +2x NAD+2x ADP → 2x πυροσταφυλικό οξύ +2x NADH + 2x ATP

Το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης ξεκινά με τη φωσφορυλίωση ενός μορίου γλυκόζης και δημιουργείται το μόριο της 6-φωσφορικής γλυκόζης με τη βοήθεια του ενζύμου της εξοκινάσης. Η φωσφορική ομάδα που μεταφέρεται στη γλυκόζη προέρχεται από ένα μόριο ATP. Στην συνέχεια μέσω μιας αμφίδρομης αντίδρασης το ενζυμο ισομεράση της φωσφοφρουκτόζης μετατρέπει την 6 φωσφορική γλυκόζη σε 6 φωσφορική φρουκτόζη. Το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης τελειώνει με τη μετατροπή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης προς 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη με τη βοήθεια του ενζύμου της φωσφοφρουκτοκινάσης, καταναλώνοντας μ' αυτό τον τρόπο ένα επιπλέον μόριο ATP. Στο επόμενο στάδιο η εξόζη 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται αμφίδρομα σε 2 τριόζες την φωσφορική διδροξυ-ακετόνη και την 3- φωσφορική γλυκεραλδευδη με την βοήθεια του ενζύμου της αλδολάσης. Ανάμεσα στις δύο τριόζες δρα το ένζυμο της

ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών το οποίο συμβάλει στη διατήρηση της χημικής ισορροπίας. Από αυτό το στάδιο και έπειτα το κάθε βήμα επαναλαμβάνεται 2 φορές. Παρόλο που η φωσφορική διυδροξυακετόνη βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες, μέσω του ενζύμου της ισομεράσης, μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεύδη, επειδή αυτή είναι που απομακρύνεται από την ισορροπία (Berg et al., 2002). Στο τελευταίο στάδιο το μόριο της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης φωσφορυλιώνεται με τη χρήση του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης. Το ενζυμο που προαναφέρθηκε την ίδια χρονική στιγμή καταλύει την αναγωγή ενός μορίου NAD σε NADH με αποτέλεσμα τη δημιουργία του 1,3 διφωσφογλυκερινικού οξέος σαν τελικό προϊόν. Το οξύ που μεταφέρεται από μια φωσφορική ομάδα αφήνεται σε ένα μόριο ADP συνθέτοντας με αυτόν τον τρόπο ένα μόριο ATP με τη βοήθεια του ενζύμου της κινάσης του φωσφογλυκερινικού δίνοντας το μόριο του 3-φωσφογλυκερινικού οξέος. Η μούταση του φωσφογλυκερινικού, μεταφέρει τη φωσφορική ομάδα από τον C3 στον C2 του οξέος δίνοντας το 2-φωσφογλυκερινικό οξύ. Με την απώλεια ενός μορίου νερού και την ενεργοποίηση του ενζύμου ενολάση προκύπτει αμφίδρομα το φωσφοενολοπυροσταφυλικό οξύ. Η τελευταία μονόδρομη αντίδραση της γλυκόλυσης αναφέρεται στη μετατροπή του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου κινάση του πυροσταφυλικού όπου προκύπτει ένα ακόμα μόριο ATP. Σύμφωνα με τα βήματα της φωσφορυλίωσης ένα μέρος της ελεύθερης ενέργειας των μορίων γλυκόζης διατηρείται με την μορφή ATP. Η διαδικασία μετατροπής δύο μορίων 3-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης σε δυο μόρια πυροσταφυλικού έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό τεσσάρων μορίων ATP από το ADP. Σαν καθαρή απόδοση ATP από κάθε μόριο γλυκόζης λαμβάνονται δύο μόρια ATP, λόγω του ότι δυο μόρια ATP έχουν δαπανηθεί στην προπαρασκευαστική φάση της γλυκόλυσης για τη φωσφορυλίωση των δύο άκρων του μορίου της εξόζης (Nelson et al., 2008). Αφού τελειώσει το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης το πυροσταφυλικό οξύ που έχει σχηματιστεί έχει τη δυνατότητα να μεταβολιστεί με την βοήθεια τριών μονοπατιών, αυτό βέβαια εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον. Σύμφωνα με τα παραπάνω είτε θα συνεχίσει με τις αντιδράσεις της αλκοολικής ζύμωσης, είτε θα ενεργοποιηθεί η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση είτε τελικά θα συνεχίσει στην αναπνευστική αλυσίδα (Ribereau-Gayon, 1964).

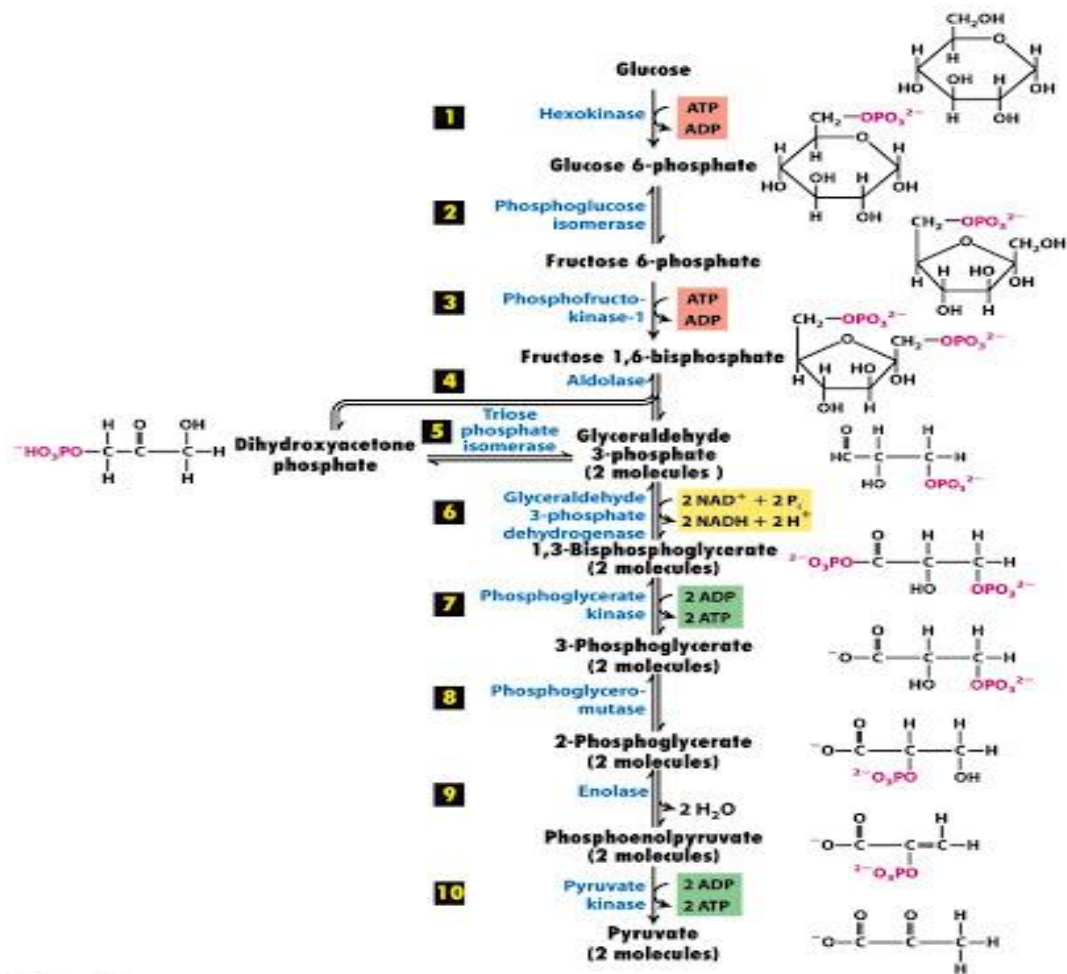


Figure 12-3
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Εικόνα 3.1.15: Γλυκόλυση (<https://dimitra-spanoy.webnode.gr/products/oi-archestis-chimeias-kai-tis-chimikis-thermodynamikis-stis-antidrasis-toy-metabolismoy-anaerovia-glykolysi-embden-meyerhof1/>)

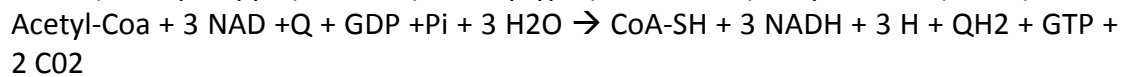
3.2. Γλυκεροπυροσταφυλική Ζύμωση

Στα κρασιά συνήθως συναντάμε περίπου 8g γλυκερόλης ανά 100g αιθανόλης. Κατά το διάστημα ζύμωσης των σταφυλιών περίπου το 8% των σακχάρων αναγκάζεται να υποβληθεί σε γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση ενώ το υπόλοιπο 92% κάνει αλκοολική ζύμωση. Συνήθως, κατά τη διάρκεια ζύμωσης των αρχικών 100g σακχάρων συναντιέται η πλειοψηφία της γλυκερόλης, μετά την οποία ο ρυθμός παραγωγής της μειώνεται αλλά δε μηδενίζεται ποτέ. Η γλυκερόλη ανήκει στην ομάδα των τριολών και αποτελεί μια σημαντική ουσία για τα κύτταρα γιατί είναι ουσία η οποία συμβάλλει στην ένωση των λιπαρών οξέων με εστερικούς δεσμούς, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία των τριγλυκεριδίων. Στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, το εμβόλιο αποτελείται από μικροοργανισμούς που έχουν αναπτυχθεί σε αερόβιο περιβάλλον. Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση καθώς και η αλκοολική αφυδρογονάση ένζυμα τα οποία μετατρέπουν το

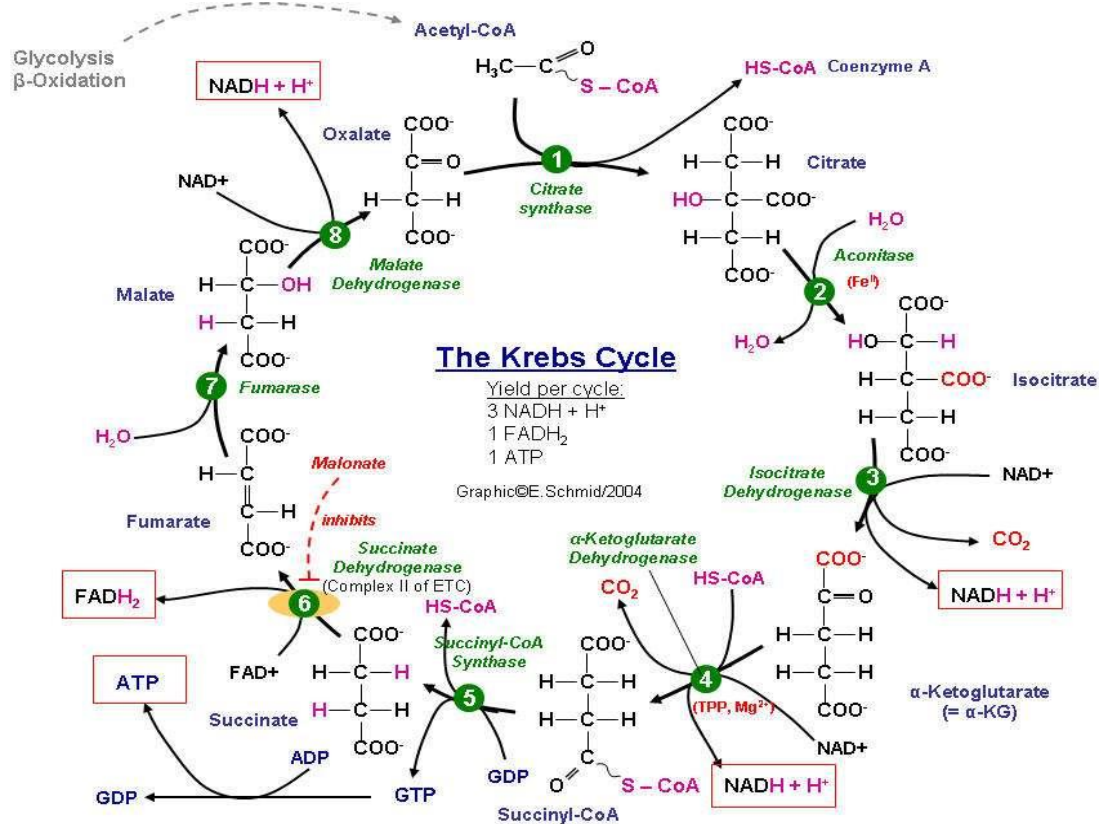
πυροσταφυλικό σε αιθανόλη είναι ανενεργά, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την περιορισμένη συσσώρευση της αιθανάλης. Έτσι η αναδημιουργία – ανασύνθεση των μορίων NADH γίνεται μέσω της διυδροξυακετόνης. Γεγονός που οδηγεί στην συσσώρευση πυροσταφυλικού καθώς και γλυκερόλης και μέσω αυτών δημιουργούνται και άλλα δευτερογενή προϊόντα (Ribereau-Gayon et al., 2006)

3.3. Κυτταρική Αναπνοή –Κύκλος Κιτρικού Οξέος ή Κύκλος Krebs

Το ακετυλο- CoA με την ύπαρξη του οξυγόνου και μόνο ακολουθεί το μεταβολικό μονοπάτι της κυτταρικής αναπνοής ή κύκλου του κιτρικού οξέος ή κύκλο του Krebs διεργασία η οποία επιφέρει τον περαιτέρω καταβολισμό του. Ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:



Η δράση των ενζύμων του κύκλου καταφέρνει την πλήρη οξείδωση των ατόμων του άνθρακα της ακυλομάδας που εγκαταλείπουν τον κύκλο αλλά και το κύτταρο υπό την μορφή του CO_2 , ενώ από την άλλη η ελεύθερη ενέργεια που εκλύεται αποθηκεύεται με την μορφή των ενεργοποιημένων ηλεκτρονίων στο NAD και στο FAD ενώ ένα μικρό μέρος της ενέργειας αποθηκεύεται απευθείας στο μόριο της ATP. Από τις αντιδράσεις του κύκλου καλύπτονται και οι αναβολικές ανάγκες του κυττάρου καθώς παρέχουν σ' αυτό τις απαραίτητες πρόδρομες ουσίες για τον σχηματισμό των αμινοξέων, λιπαρών οξέων, των νουκλεϊκών οξέων καθώς και άλλων βιομορίων.



Εικόνα 3.3.16: Κύκλος Krebs (<https://art-therapy.center>)

Πίνακας 3.3.3: Αντιδράσεις του Krebs και τα αντίστοιχα ένζυμα

Ανάλυση του Κύκλου του Krebs

Στάδια	Αντιδράσεις –Τύποι Αντιδράσεων	Ένζυμα
1	Ακετυλο-CoA + Οξαλοξικό οξύ + H ₂ O → Κιτρικό Οξύ + CoA (Συμπύκνωση)	Κιτρική Συνθάση
2α	Κιτρικό Οξύ → cis Ακονιτικό Οξύ + H ₂ O (Αφυδάτωση)	Ακοτινάση
2β	Cis ακονιτικό οξύ + H ₂ O → ισοκιτρικό οξύ (Ενυδάτωση)	Ακοτινάση
3	Ισοκιτρικό οξύ + NAD → NADH + H + Co ₂ + α-κετογλουταρικό οξύ (Αποκαρβοξυλίωση και Αφυδρογόνωση)	Ισοκιτρική Αφυδρογονάση
4	α-κετογλουταρικό οξύ + NAD + CoA → NADH + H + Co ₂ + ηλεκτρυλοCoA (Αποκαρβοξυλίωση και Αφυδρογόνωση)	Σύμπλοκο α-Κετογλουταρικής Αφυδρογονάσης
5	ηλεκτρυλοCoA + Pi + GDP → GTP + CoA + ηλεκτρικό οξύ (Φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος)	Ηλεκτρυλο-CoA Συνθετάση
6	ηλεκτρικό οξύ + E-FAD → φουμαρικό οξύ + E-FADH ₂ (Αφυδρογόνωση)	Ηλεκτρική Αφυδρογονάση
7	φουμαρικό οξύ + H ₂ O → μηλικό οξύ (Ενυδάτωση)	Φουμαράση
8	μηλικό οξύ + NAD → NADH + H + Οξαλοξικό οξύ (Αφυδρογόνωση)	Μηλική Αφυδρογονάση

Οι οκτώ αντιδράσεις του Krebs έχουν τη δυνατότητα να χωριστούν σε 2 τμήματα: Στο τμήμα που περιλαμβάνει τις αντιδράσεις οξειδωσης των ατόμων άνθρακα (**αντιδράσεις 1-4**) καθώς και στο τμήμα των αντιδράσεων αναγέννησης του οξαλοξικού οξέος (**αντιδράσεις 5-8**).

Ο κύκλος αρχίζει με την αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ του ακετυλίου και του οξαλοξικού οξέος και καταλύεται από το ένζυμο κιτρική συνθάση και το προϊόν συμπύκνωσης είναι το κιτρικό οξύ, ένα τρικαρβοξυλικό οξύ με 6 άτομα άνθρακα ενώ η ενέργεια που χρειάζεται λαμβάνεται από την υδρόλυση του θειοεστερικού δεσμού. Μετά από αναδιατάξεις του μορίου το κιτρικό οξύ μετατρέπεται σε ισοκιτρικό οξύ που έπειτα υφίσταται οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση και μετατρέπεται σε α-κετογλουταρικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Στην αντίδραση το ισοκιτρικό οξύ χάνει ένα άτομο άνθρακα με τη μορφή του διοξειδίου του άνθρακα ενώ ταυτόχρονα οξειδώνεται, με τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο NAD και την παραγωγή του NADH+H. Στην αντίδραση που ακολουθεί ένα επιπλέον άτομο άνθρακα απελευθερώνεται και μεταφέρονται ταυτόχρονα ηλεκτρόνια στο NAD και το α-κετογλουταρικό οξύ μετατρέπεται σε ηλεκτρυλο-CoA. Η αντίδραση καταλύεται με τη βοήθεια του ενζυμικού συμπλόκου κετογλουταρικής αφυδρογονάσης το οποίο είναι παρόμοιο με το σύμπλοκο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. Με αυτές τις αντιδράσεις οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης οι δυο άνθρακες που μπήκαν στον κύκλο με τη μορφή της ακετυλομάδας εξέρχονται με τη μορφή του διοξειδίου του άνθρακα και φεύγουν στην ατμόσφαιρα. Σε επόμενες αντιδράσεις δημιουργείται ένα τριφωσφορυλιωμένο νουκλεοσίδιο (GTP ή ATP) καθώς επίσης και καινούργια μόρια NADH+H και FADH₂.

Η τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) δημιουργείται από τη μετατροπή του ηλεκτρυλο-CoA σε ηλεκτρικό οξύ και η ενέργεια που χρειάζεται για τη φωσφορυλίωση δίδεται από την υδρόλυση του θειοεστερικού δεσμού ενώ αυτή η

αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ηλεκτρυλο –CoA συνθετάση. Έπειτα με τη βοήθεια κάποιων ειδικών κινασών η φωσφορική ομάδα της GTP μετατοπίζεται προς την ADP με αποτέλεσμα να παραχθεί ATP. Μετά το ηλεκτρικό οξύ οξειδώνεται σε φουμαρικό οξύ και η αντίδραση καταλύεται από την ηλεκτρική αφυδρογονάση το οποίο έχει μια προσθετική ομάδα το FAD που μετατρέπεται σε FADH₂. Στην επόμενη αντίδραση το φουμαρικό οξύ μέσω ενυδάτωσης του τρανς διπλού δεσμού του μετατρέπεται σε L-μηλικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου φουμαράση. Στην τελευταία αντίδραση του μονοπατιού το L-μηλικό οξύ οξειδώνεται και αναγεννάται το οξαλοξικό οξύ που αντιδρά με ένα καινούριο μόριο ακετυλο –CoA για την παραγωγή κιτρικού οξέος και την επανέναρξη ενός νέου κύκλου αντιδράσεων (Διαμαντίδης, 2010).

3.4. Αλκοολική ζύμωση

Η αναγωγική ισχύς του NADH που παράγεται μέσω της γλυκόλυσης πρέπει να μεταφέρεται σε έναν δέκτη ηλεκτρονίων για την αναγέννηση του NAD⁺ που καταναλώνεται από τη γλυκόλυση. Στην περίπτωση του *S. cerevisiae* και άλλων ειδών ζύμης, αυτή η διαδικασία ονομάζεται αλκοολική ζύμωση και λαμβάνει χώρα μέσα στο κυτταρόπλασμα, όπου η ακεταλδεΐδη, το προϊόν αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος χρησιμεύει ως ο τερματικός δέκτης ηλεκτρονίων (Ratledge, 1991; Zamora, 2009). Όσον αφορά στη γλυκόλυση, η αλκοολική ζύμωση περιέχει δύο επιπλέον ενζυματικές αντιδράσεις:

A. Το πυροσταφυλικό αρχικά αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη με πυροκαρβικό δεκαρβοξυλάση. Οι συμπαραγόντες είναι πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) και μαγνήσιο. Στην συνέχεια,

B. Η ακεταλδεΐδη ανάγεται σε ανακύκλωση αιθανόλης από NADH σε NAD⁺. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την αφυδρογονάση αλκοόλης χρησιμοποιώντας ψευδάργυρο ως συμπάρονα. Και τα δύο τελικά προϊόντα αλκοολικής ζύμωσης, η αιθανόλη και το διοξειδίο του άνθρακα, μεταφέρονται έξω από το κύτταρο με απλή διάχυση (Aggelis, 2007; Ribereau-Gayon et al., 2006; Zamora, 2009).

4: ΦΡΑΓΚΟΣΥΚΙΑ: Μια εναλλακτική καλλιέργεια

4.1. Ιστορική Αναδρομή

Η παραγωγή του φραγκόσουκου είναι μια σύγχρονη γεωργική ενασχόληση που εξαπλώθηκε κατά τους τελευταίους αιώνες. Η χώρα από την οποία πιθανόν προέρχεται είναι το Μεξικό, καθώς στην σημαία που φέρει το εθνικό της σύμβολο αναπαριστάται και ένα κομμάτι φραγκοσυκιάς. Η φραγκοσυκιά θεωρείται ένας από τους πιο διαδεδομένους κάκτους παγκοσμίως, ευδοκίμει στις ερήμους της Αμερικής και του Μεξικού. Θεωρείται ότι το φραγκόσουκο το έφεραν στις μεσογειακές χώρες Ισπανοί θαλασσοπόροι το 1500 μ.Χ και μετά εξαπλώθηκε γεωγραφικά σε ολη την λεκάνη της Μεσογείου. Η θεωρία που επικρατεί είναι ότι ετυμολογικά η λέξη φραγκόσουκο προέρχεται από τη λέξη *fraga* που σημαίνει φράουλα καθώς και από

το ελληνικό σύκο (Αλεξιάδης, 2000). Η φραγκοσουκιά ευδοκίμει στο Τέξας, τη Α. Φλόριντα, τον Καναδά, τη Βενεζουέλα, Πορτογαλία, Ισπανία, την Ελλάδα καθώς και σε άλλες χώρες.

Στην εξάπλωση της φραγκοσουκιάς συνέβαλαν οι παρακάτω παράγοντες:

1. Υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας φυτικού ερυθρού χρώματος που χρησιμοποιείται σαν χρωστική.
2. Παραγωγή οινόπνεύματος μετά από ζύμωση και απόσταξη των καρπών της φραγκοσουκιάς.
3. Έχει ιδιότητες που βοηθούν στην αντιμετώπιση του σκορβούτου, καθώς έχει υψηλή περιεκτικότητα σε Βιταμίνη C.
4. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή ζωοτροφών.



Εικόνα 4.1.17: Φραγκοσουκιά (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miler)

4.2 Η καλλιέργεια της φραγκοσουκιάς στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα πρωτοεμφανίστηκε εμπορικά τη δεκαετία του 1950 κυρίως στα νησιά και χρησιμοποιούνταν στο ανταλλακτικό εμπόριο. Παρατηρείται ότι στην Ελλάδα βρίσκεται σε μεγάλες εκτάσεις σε αφρόντιστη κατάσταση καθώς τις περισσότερες φορές χρησιμοποιείται σαν φράκτης. Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να καταβάλλονται πολύ μεγάλες προσπάθειες για να γίνει η καλλιέργεια της φραγκοσουκιάς συστηματική. Ο λόγος είναι ότι η στροφή προς αυτήν την καλλιέργεια δύναται να αποτελέσει ένα πολύ σημαντικό τμήμα της Ελληνικής αγροτικής παραγωγής. Αξιοσημείωτη είναι η προώθηση της καλλιέργειας του φραγκόσουκου που παρατηρείται στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Κρήτη. Στα πλαίσια προώθησης νέων εναλλακτικών καλλιεργειών που να είναι προσαρμοσμένες στις ξηροθερμικές συνθήκες της Κρήτης και διαβλέποντας την προοπτική που παρουσιάζουν τα φραγκόσουκα και τα παράγωγα τους τόσο στην ελληνική, όσο και στη ξένη αγορά, δημιουργήθηκε στην Κρήτη η «Γεωργική Ανάπτυξη Κρήτης Α.Ε. GEA KRETA», η οποία αποτελεί εταιρεία συνεργαζόμενων καλλιεργητών φραγκόσουκων που αριθμεί 150 μέλη με συνολική έκταση 450

στρεμματων. Στόχος της εταιρείας είναι η δημιουργία εργοστασίου τυποποίησης και μεταποίησης των φραγκόσκων και η προώθηση των προϊόντων στην ελληνική αγορά και το εξωτερικό. Ανάλογες προσπάθειες έχουν ξεκινήσει και σε άλλες περιοχές της Ελλάδας όπως την Πελοπόννησο και τη Μεσσηνία.

4.3 Στρεμματικές αποδόσεις

Κάτω από τις ίδιες συνθήκες σε άρδευση, η παραγωγικότητα των φραγκόσκων είναι υψηλότερη από άλλα φυτά (Samraio, 2005). Επιπλέον η παραγωγή βιομάζας είναι πιο σταθερή με την πάροδο του χρόνου, καθώς επηρεάζεται λιγότερο από την κατανομή των βροχοπτώσεων κατά την διάρκεια των ξηρών περιόδων. Υπό ευνοϊκές συνθήκες άρδευσης το φραγκόσκυκο μπορεί να παράγει έως και 45-50 τόνους ξηρής βιομάζας ανά εκτάριο γης το χρόνο, το οποίο αντιπροσωπεύει πολύ υψηλή απόδοση σε σύγκριση με τις περισσότερες άλλες καλλιέργειες (Nobel, 1995; Santos, 2016).

4.4 Χημική σύσταση του κλαδωδίου και του καρπού φραγκοσυκιάς και των σπόρων αυτού

A. Κλαδώδιο & καρπός

Ο καρπός της φραγκοσυκιάς παρουσιάζει την παρακάτω σύσταση: Περιέχει πρωτεΐνες, φυτικές ίνες, ανόργανα άλατα, υδατάνθρακες (Γάτσιος, 2018). Η ποσότητα των πρωτεϊνών κυμαίνεται από 5,3%- 11,3% ενώ είναι χαμηλότερη από των ψυχανθών αλλά παρόμοια με των σιτηρών.

Πίνακας 4.4.4. Συστατικά του καρπού της φραγκοσυκιάς (% ξ.ο.), και κλαδωδίων φραγκοσυκιάς (% ξ.ο.)

Συστατικά	Σάρκα καρπών	Σπόροι	Περίβλημα καρπών	Κλαδώδια
Άμυλο	4,55	5,35	7,12	-
Πρωτεΐνες	5,13	11,8	8,3	-
Λιπίδια	0,97	6,77	3,43	2
Τέφρα	8,5	5,9	12,1	16-18
Φυτικές Ίνες	20,5	54,2	40,8	-
Υδατάνθρακες	58,3	1,59	27,6	-
Σακχαρόζη	0,22	0	2,36	-
Γλυκόζη	35	0	21	-
Φρουκτόζη	29,6	0	2,89	-
Ξηρή Ουσία	-	-	-	12-16
Κυτταρίνη	-	-	-	15
Άμυλο	-	-	-	12
Ολικές Αζωτούχες Ενώσεις	-	-	-	5-7
Οξαλικά	-	-	-	13
Ασβέστιο	-	-	-	3-4
Φώσφορος	-	-	-	0,2
Λιγνινοκυτταρίνη	-	-	-	17-20

Τα κλαδώδια αποτελούνται από μια χημική ανισορροπία παρόλα αυτά είναι μια πολύ καλή πηγή ενέργειας και νερού. Το νερό που υπάρχει σ' αυτά κυμαίνεται από 80-90% ενώ η περιεκτικότητα τους σε ολικές αζωτούχες ουσίες, σε ολικές ινώδεις, σε κυτταρίνη και σε λιγνίνη είναι χαμηλή. Τέλος, τα κλαδώδια είναι γνωστά για την μεγάλη τους περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα, ειδικά σε ασβέστιο και σε οξαλικά καθώς και σε πολύπλοκους πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στα ανώτερα φυτά.

B. Χημική σύσταση των σπόρων

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές επιστημονικές μελέτες αναφορικά με τους σπόρους και τη θρεπτική τους αξία. Το σχήμα των σπόρων αυτών είναι πεπλατυσμένο και μοιάζει με το σχήμα της φακής. Τα τοιχώματα των σπόρων αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες. Το έλαιο του σπόρου ανήκει στην κατηγορία των πολυακόρεστων ελαίων όπως και τα περισσότερα φυτικά έλαια. Το μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνουν το λινολεϊκό οξύ και το ολεϊκό οξύ ενώ η σύσταση τους είναι παρεμφερής με αυτή του αραβοσιτελαίου (Γάτσιος, 2018).

Πίνακας 4.4.5: Συστατικά των σπόρων του καρπού της φραγκοσυκιάς (%)

Συστατικό	Ποσοστό
Νερό	5-6
Έλαιο	7-8,5
Ανόργανα Άλατα	1,3
Λιγνίνη	18
Πρωτεΐνες	11-12
Κυτταρίνη	30
Άλλοι Πολυσακχαρίτες	27

4.5 Αξιοποίηση διαφόρων μερών της φραγκοσυκιάς

Η φραγκοσυκιά μπορεί να τύχει εκμετάλλευσης για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων όπως (Γάτσιος, 2018; <https://www.symagro.com/fragosiko/>):

i. Φρέσκο φρούτο: Το φραγκόσυκο σε αρκετές χώρες καταναλώνεται ως φρέσκο φρούτο. Στην Κύπρο ιδιαίτερα η κατανάλωση του είναι διαδεδομένη και χαίρει ιδιαίτερης εκτίμησης.

ii. Έλαιο: Το έλαιο που προέρχεται από τους σπόρους, θεωρείται ότι έχει σημαντική αντιρυτιδική δράση και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των καλλυντικών. Ωστόσο, η ποσότητα ελαίου που εξάγεται από τους σπόρους είναι ελάχιστη (για ένα λίτρο ελαίου απαιτούνται 30 κιλά σπόροι, δηλ. περίπου 800 κιλά φραγκόσυκων) και γιαυτό το λόγο η τιμή του είναι πολύ ψηλή, όπως αντίστοιχα υψηλό είναι το κόστος των μηχανημάτων που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή του.

iii. Προϊόντα διατροφής: Οι καρποί του φραγκόσουκου χρησιμοποιούνται σε διάφορα προϊόντα διατροφής όπως γλυκά, μαρμελάδες, κομπόστες, οινόπνευματώδη ποτά, παγωτά κ.τ.λ..

iv. Διαιτητικά ροφήματα: Η σκόνη των καρπών της φραγκοσουκιάς, χρησιμοποιείται στην παρασκευή διαιτητικών ροφημάτων.

v. Προοπτική για ζωοτροφή: Οι βλαστοί (κλαδώδια), αφού τους αφαιρεθούν τα αγκάθια με καψάλισμα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή.

Η διεθνής βιβλιογραφία (Gebremariam et al., 2006; Abidi et al., 2009) αναφέρει ότι, οι βλαστοί της φραγκοσουκιάς χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή για ζώα φάρμας σε διάφορες χώρες, όπως Νότια Αφρική, Μεξικό, Βραζιλία, ΗΠΑ και χώρες της βορείου Αφρικής. Κύριο πλεονέκτημα της φραγκοσουκιάς ως φυτό παραγωγής ζωοτροφής, αποτελεί η πολύ ψηλή αποδοτικότητα του στη μετατροπή του νερού σε φυτική βιομάζα και συνεπώς σε αφομοιώσιμη ενέργεια. Επομένως, σε συνθήκες ξηρασίας ή ημι-ξηρασίας, η φραγκοσουκιά αποτελεί ιδανική καλλιέργεια για παραγωγή ζωοτροφής, η οποία προσφέρει υδατάνθρακες, νερό, ασβέστιο και βιταμίνες. Λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ωστόσο, συνδυάζεται με άλλα είδη ζωοτροφών για τη συμπλήρωση της καθημερινής διατροφής των ζώων. Υπολογίζεται ότι, παγκοσμίως καλλιεργούνται περίπου 900.000 εκτάρια με φραγκοσουκιάς για ζωοτροφή (Mondragon and Perez, 2001).

vi. Παραγωγή βιοαιθανόλης: Αναφέρεται πως το κλαδώδιο φραγκοσουκιάς μετά από ειδική ζύμωση είναι μια **καλή εναλλακτική λύση για την παραγωγή βιοκαυσίμων, με χαμηλό κόστος παραγωγής σε περιοχές με χαμηλή διαθεσιμότητα νερού.** Η βιβλιογραφία για το συγκεκριμένο φυτό γενικά και ειδικότερα για την αξιοποίησή του στην παραγωγή βιοαιθανόλης που αφορά στην συγκεκριμένη μελέτη είναι περιορισμένη (Alencara, 2017).

vii. Υπάρχει η δυνατότητα δημιουργίας **δύο χρωστικών ουσιών** από τους καρπούς του φραγκόσουκου. Μια **κίτρινη η ινδικαξανθάνη** αλλά και η **ερυθροιώδης βετανίνη** που έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σαν χρωστικές στη βιομηχανία τροφίμων.

vii. Έχει ιδιότητες που βοηθούν στην αντιμετώπιση του σκορβούτου, καθώς έχει **υψηλή περιεκτικότητα σε Βιταμίνη C.**

Ωστόσο, υπάρχει περιορισμένη, όπως προαναφέρθηκε, βιβλιογραφία στον τομέα αυτό και το θέμα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (Ribeiro et al., 2017).

4.6 Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η φραγκοσουκιά (*Opuntia ficus –indica* (L.) Miler) ανήκει στην οικογένεια των κακτοειδών (cactaceae) στην οποία συμπεριλαμβάνονται πάνω από 300 είδη, με μεγάλη γεωγραφική κατανομή. Ανήκει στο υπογένος Οπούντια (*Opuntia*) της οικογένειας των κακτιδών, της κλάσεως των δικοτυληδόνων. Βρίσκουμε τρία είδη φραγκόσουκου, τα οποία διαχωρίζονται με βάση το χρώμα του καρπού τους. Έτσι, βάση αυτού έχουμε:

Το κίτρινο (Sulfarina), το κόκκινο (Sanguigna) καθώς και το λευκό (Mascaredda).

Η φραγκοσουκιά είναι κάκτος, παχύφυτος, πολυετής, δενδρόμορφος και αιθαλής ο οποίος μπορεί να φτάσει σε ύψος ακόμα και τα 5 μέτρα. Συναντάται ημιαυτοφυής αλλά τις περισσότερες φορές αυτοφυής. Ακόμα ευδοκιμεί σε θερμές και ξηρές περιοχές, δίχως να εμφανίζει εξειδικευμένες εδαφικές απαιτήσεις. Οι βλαστοί της φραγκοσουκιάς ονομάζονται και φυλλοκλάδια, είναι φυλλοειδείς, πεπλατυσμένοι, καλύπτονται από κηρώδη επιδερμίδα και αποτελούνται από μεγάλες ποσότητες νερού. Μοιάζουν με σαρκώδη φύλλα, πρόκειται ωστόσο για βλαστούς με λειτουργικές ιδιότητες φύλλων και έχουν μήκος 30-40 εκατοστά, πλάτος 15-25 εκατοστά και πάχος 1,5-3 εκατοστά. Στην αρχή οι βλαστοί είναι ευαίσθητοι και τρυφεροί, στην συνέχεια σκληραίνουν και ξυλοποιούνται για να καταλήξουν στη δημιουργία του κορμού και των κλάδων, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να φωτοσυνθέτουν. Σε κάθε φυλλοκλάδιο βρίσκουμε περίπου 150 μικρά εξογκώματα τα οποία δημιουργούν είτε αγκάθια, είτε νέο βλαστό, είτε άνθος, είτε ρίζες.

Τα πραγματικά φύλλα της φραγκοσουκιάς στην πραγματικότητα είναι τα αγκάθια, που έχουν μήκος 1-2 εκατοστά, είναι βελονοειδή και είναι καλά στερεωμένα στην επιφάνεια των βλαστών. Εκτός από τα αγκάθια που βρίσκουμε στα φυλλοκλάδια αλλά και τους καρπούς φέρουν και άλλα μικρά αγκάθια που ονομάζονται γλοχίδες. Η λειτουργία των αγκαθίων αυτών είναι να μειώνουν την διαπνοή, ενώ ταυτόχρονα παρέχουν στο φυτό προστασία από τα φυτοφάγα ζώα. Βέβαια, υπάρχουν και φραγκοσουκίες που δεν έχουν αγκάθια. Η Φραγκοσουκιά, όπως και όλα τα παχύφυτα, λειτουργούν με το φωτοσυνθετικό μηχανισμό Crassulacean Acid Metabolism που είναι γνωστό και ως CAM, σύμφωνα με τον οποίο τα στομάτια παραμένουν κλειστά όλη την μέρα, ενώ ανοίγουν για λίγες ώρες κατά την διάρκεια της νύχτας, όταν η θερμοκρασία είναι πιο χαμηλή και η υγρασία σχετικά αυξημένη. Έτσι τα φυτά αυτά καταφέρνουν με αυτόν τον τρόπο να ελαχιστοποιούν τις απώλειες σε νερό, καθιστώντας την φραγκοσουκιά ένα καλλιεργούμενο είδος με σχεδόν μηδαμινές απαιτήσεις σε νερό. **Ριζικό σύστημα:** Είναι ρηχό, δεν υπερβαίνει τα 30 εκατοστά σε βάθος και αναπτύσσεται σε μεγάλο μήκος. Το ριζικό του σύστημα είναι τόσο ισχυρό που της δίνει την δυνατότητα να αυτοφύεται σε βουνοπλαγιές. **Άνθη:** Είναι μονήρη, μεγάλα σε διάμετρο (4-8 εκατοστά), άμισχα και τα βρίσκουμε στην περιφέρεια των φυλλοκλαδίων ηλικίας ενός έτους, συνήθως των εξωτερικών καθώς και στην επιφάνειά τους. Έχουν χρώμα κίτρινο ή πορτοκαλί και παραμένουν ανοιχτά μόνο για 36-48 ώρες. Είναι ερμαφρόδιτα και η επικονίαση τους γίνεται με έντομα. Σε κάθε φυλλοκλάδιο δύναται να εμφανίζονται μέχρι και 30 άνθη, αλλά ο αριθμός τους εξαρτάται από το που βρίσκονται στο φυτό καθώς και από την έκθεση τους στον ήλιο. Ανθίζουν περίπου τον Απρίλιο –Μάιο ανάλογα με το που βρίσκονται τα φυτά και η συγκομιδή τους γίνεται μετά από περίπου 3 μήνες. **Καρπός:** Ονομάζεται φραγκόσουκο ή παπουτσόσουκο, είναι ράγα και έχει σχήμα ατρακτοειδές, ωοειδές ή υποσφαιρικό πεπλατυσμένο γύρω από την κορυφή, όπου σχηματίζει βαθούλωμα. Γενικά το σχήμα των καρπών διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία καθώς και από την εποχή σχηματισμού των καρπών. Τα φραγκόσουκα που συγκομίζονται πρώτα είναι πιο σφαιρικά ενώ τα επόμενα πιο μακρόστενα στο σχήμα. Οι καρποί είναι εδώδιμοι, σαρκώδεις και καταναλώνονται νωποί μετά από αφαίρεση της φλούδας. Ο κάθε καρπός μπορεί να ζυγίζει από 100-300 γραμμάρια, ενώ τα σπέρματα τους μπορεί να φτάσουν μέχρι τα 300.

Τρόπος πολλαπλασιασμού: Γίνεται κυρίως με μοσχεύματα (φυλλοκλάδια) τα οποία τοποθετούνται στο έδαφος. (Λαγουδάκης, 2015; Υπ. Γεωργ., Αγροτ. Ανάπτ., 2016)



A) Sulfarina



B) Sanguigna



C) Mascaredda

Εικόνα 4.6.18: Τρία είδη του φραγκόσουκου (βάση του χρώματος)

Παρουσίαση των τριών ειδών του φραγκόσουκου (βάση του χρώματος) : A) Κίτρινο (Sulfarina), B) Κόκκινο (Sanguigna) και C) Λευκό (Mascaredda)

A. https://www.google.com/search?q=Sulfarina&newwindow=1&sxsrf=ALeKk03SQ79_xSVb-WFH-eKtbHO2T6b1nQ:1605293485761&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiv5-mfmIDtAhXVCRAIHTFyDScQ_AUoAXoECAwQAw&biw=1536&bih=754#imgrc=bZw4XZk18uY_EM

B. https://www.google.com/search?q=sanguina+opuntia+ficus+indica&tbm=isch&ved=2ahUKEwiQu7mxmIDtAhXz7uAKHbpIDEUQ2-cCegQIABAA&oq=sanguina+opuntia+ficus+indica&gs_lcp=CgNpbWcQAzoECAAAQEzoGCAAQHhAToggIABAFEB4QEzoGCAAQBRAeOgYIABAIEB5Q6BhYi0Bg40FoAHAAeACA AaoCiAGPGZIBBjAuMjAuMZgBAKABAaoBC2d3cy13aXotaW1nwAEB&sclient=img&ei=0tWuX5CKK_Pdgwe6kbGoBA&bih=754&biw=1536

C. https://www.google.com/search?q=muscareda&newwindow=1&tbm=isch&sxsrf=ALeKk01xv_H6xFIX2YtwbTIHIVZSjaYPBg:1605293951854&source=Inms&sa=X&ved=0ahUKEwjhgYr-mYDdAhXCwosKHRU6BW0Q_AUICygB&biw=1536&bih=754&dpr=1.25#imgrc=6eTGS S_oQq5D6M

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Πειραματικό μέρος

Υλικά και Μέθοδοι



5.1. Υλικά και Μέθοδοι

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετώνται στελέχη του είδους *S. cerevisiae* τα οποία ευγενώς παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γ.Π.Α (υπεύθυνοι συλλογής : Καθηγητής Ε. Δροσινός και Δρ. Σ. Παραμυθιώτης) και δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς μέχρι στιγμής σε σχέση με τις βιοχημικές και φυσιολογικές δυνατότητες τους και ειδικώς σε σχέση με τη δυναμική παραγωγής αλκοόλης από διάφορα υποστρώματα χρησιμοποιούμενα ως υλικά εκκίνησης.

Τα στελέχη με την παραλαβή τους στο εργαστήριο ανακαλλιεργήθηκαν σε YPD σε τρυβλία και αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Έπειτα, ακολούθησαν τέσσερις διαφορετικές πειραματικές πορείες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχάρων (γλυκόζης) και πιο συγκεκριμένα σε 50, 70, 100 καθώς και 150 g/L, σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες σε φιάλες των 250 mL. Στόχος αυτού του εγχειρήματος ήταν να δημιουργηθεί το προφίλ του μικροοργανισμού μέσα από την ανάπτυξη στις παραπάνω συνθήκες που είχε σαν κύριο σκοπό να δούμε την απόδοση τους σε αιθανόλη καθώς και σε δεύτερο βαθμό την παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων.

Μετά το πέρας των παραπάνω, μετρήθηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος (διάφορα μέρη φραγκοσουκιάς) που θα χρησιμοποιηθεί σαν αναβάθμιση του πειράματος στον αντιδραστήρα των 8L. Ακολούθως, διενεργήθηκαν δοκιμές με διαφορετικές μεθόδους εξαγωγής σακχάρων (με φυσικές, χημικές αλλά και ενζυμικές διεργασίες) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος που αποτελούνται από κλαδώδιο, φρούτο ή συνδυασμό αυτών. Τέλος, επιλέχτηκε ένα από τα αποδοτικότερα στελέχη ως προς την παραγωγή αιθανόλης και μια συγκέντρωση υποστρώματος-ενζύμου από τις προαναφερθέντες δοκιμές και τοποθετήθηκαν στον αντιδραστήρα όπως αναφέρεται παρακάτω.

Κατά τη διάρκεια της κινητικής των καλλιεργειών μελετήθηκαν τα δεδομένα της μικροβιακής αύξησης:

1. Η παραγωγή Βιομάζας
2. Η παραγωγή Αιθανόλης
3. Η καταναλισκόμενη πηγή άνθρακα(Γλυκόζη)
4. Η παραγωγή Ενδοπολυσακχαριτών
5. Η παραγωγή Γλυκερόλης

Για διευκόλυνση στην παρακολούθηση και κατανόηση της μελέτης επιλέξαμε να εστιάσουμε στην αλκοολική ζύμωση των στελεχών του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* με συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζης σε αερόβιες κι αναερόβιες συνθήκες, διότι κυρίως είχαμε σ' αυτήν μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη.

5.1.1. Υπολογισμός υγρασίας

Η μέτρηση της υγρασίας % έγινε με τη βοήθεια φούρνου σε θερμοκρασία 105 °C για ~1 μέρα(σε αντίθετη περίπτωση μέχρι να έχουμε σταθερή μέτρηση) (AOAC, 2000).

A. Υπολογισμοί

Η απώλεια βάρους του δείγματος που επήλθε κατά την ξήρανση εκφράζει την ποσότητα νερού που περιείχε και η αναγωγή της επί τοις εκατό (%) εκφράζει την περιεκτικότητα της τροφής σε νερό. Δηλαδή:

$$BA - BT/BA \times 100 = \% \text{ υγρασία}$$

Όπου:

BA: Αρχικό βάρος δείγματος

BT: Τελικό βάρος δείγματος

Για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας % της τροφής σε ξηρή ουσία χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$BT/BA \times 100 = \% \text{ Ξηρή ουσία}$$

Όπου:

BA: Αρχικό βάρος δείγματος

BT: Τελικό βάρος δείγματος

5.1.2. Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας

Σε κάθε σημείο, αφού γίνει η μέτρηση του pH καθώς και η ογκομέτρηση του υγρού της καλλιέργειας τοποθετείται το υγρό σε 2 μεταλλικά φάλκον τα οποία πρέπει να έχουν το ίδιο βάρος πριν την φυγοκέντρηση στην φυγόκεντρο. Τα φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 9000 στροφές υπό ψύξη (4 °C). Αφού τα εξάγουμε κρατούμε ποσότητα του υπερκείμενου (για άλλες αναλύσεις που θα αναφερθούν παρακάτω), το υπόλοιπο απορρίπτεται και η βιομάζα που έχει παραμείνει στα τοιχώματα συγκομίζεται με τη βοήθεια απιονισμένου νερού καθώς και τη χρήση vortex. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε προζυγισμένο φιαλίδιο Mc Cartney και εισάγεται στον φούρνο ξήρανσης στους 80°C μέχρι να εξατμιστεί το υγρό. Μετά την ξήρανση τοποθετούνται τα φιαλίδια σε ένα ξηραντήρα μέχρι να αποκτησουν θερμοκρασία περιβαλλοντος τους και στην συνέχεια ζυγίζονται. Η ποσότητα της βιομάζας προκύπτει από την αφαίρεση του αρχικού βάρους από το τελικό και εκφράζεται σε g/L.

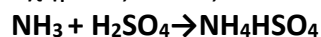
5.1.3. Προσδιορισμός του ποσοστού πρωτεϊνών

Η μέτρηση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Kjeldahl (AOAC, 2000) που περιγράφεται ως εξής:

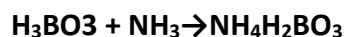
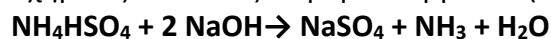
A. Αρχή της μεθόδου Kjeldahl:

Η μέθοδος στηρίζεται στη μετατροπή οποιασδήποτε μορφής οργανικού αζώτου σε ανόργανο άζωτο (ανοργανοποίηση οργανικού αζώτου). Ορισμένη ποσότητα δείγματος θερμαίνεται επί αρκετό χρονικό διάστημα μέσα σε ειδική φιάλη (Kjeldahl) με πυκνόθειικό οξύ (H_2SO_4) παρουσία θειικού χαλκού ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) και θειικού καλίου (K_2SO_4). Κατά τη θέρμανση, το υδρογόνο και ο άνθρακας των οργανικών ουσιών της τροφής οξειδώνεται προς νερό (H_2O) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), αντίστοιχα, ενώ το άζωτο ανάγεται προς αμμωνία (NH_3). Η

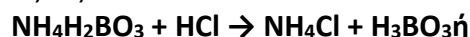
τελευταία δεσμεύεται από την περίσσεια του πυκνού θειικού οξέος και σχηματίζεται όξινο θειικό αμμώνιο(NH₄HSO₄):



Με την προσθήκη πυκνού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) ακολουθεί απελευθέρωση της δεσμευμένης αμμωνίας, η οποία παραλαμβάνεται ποσοτικά με απόσταξη μέσα σε διάλυμα βορικού οξέος (H₃BO₃), οπότε και σχηματίζεται δισόξινο βορικό αμμώνιο (NH₄H₂BO₃):



Το σχηματιζόμενο δισόξινο βορικό αμμώνιο, η ποσότητα του οποίου είναι ανάλογη της αμμωνίας που αποστάχθηκε και δεσμεύτηκε, ογκομετρείται μετά το τέλος της απόσταξης με πρότυπο (συνήθως 0,1 N) διάλυμα υδροχλωρικού ή θειικού οξέος:



Από την ποσότητα (mL) του διαλύματος υδροχλωρικού ή θειικού οξέος υπολογίζεται η επί τοις εκατό (%) περιεκτικότητα της τροφής σε ολικό άζωτο.

B. Αντιδραστήρια

1. Θειικό κάλιο (K₂SO₄)
2. Θειικός χαλκός (CuSO₄·5H₂O)
3. Πυκνό θειικό οξύ (H₂SO₄) 95-97%, ειδικό βάρος 1,84
4. *Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου*: Παρασκευάζεται με διάλυση 500 g υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) και 12 g θειούχου νατρίου (Na₂S·9H₂O) σε 1000 mL απεσταγμένου νερού.
5. *Διάλυμα βορικού οξέος*: Παρασκευάζεται με διάλυση 40 g βορικού οξέος (H₃BO₃) σε 1000 mL απεσταγμένου νερού.
6. *Διάλυμα δείκτη*: Παρασκευάζεται με διάλυση 0,2 g ερυθρού του μεθυλίου και 0,1 g κυανού του μεθυλενίου σε 100 mL αιθανόλης (96% κ.ο.).
7. *Διάλυμα δεκατοκανονικό υδροχλωρικού (ή θειικού) οξέος 0,1 N*: Μία (1)αμπούλα N/10 HCl διαλύεται σε ογκομετρική φιάλη η οποία γεμίζεται με απεσταγμένο νερό μέχρι της ενδείξεως των 1000 mL.

Γ. Πορεία εργασίας

Τοποθετούνται σε μια φιάλη Kjeldahl 0,9 – 1 g δείγματος μέσα σε διηθητικό χαρτί, μερικά γυάλινα σφαιρίδια ή τεμαχίδια πορσελάνης, 10 g θειικού καλίου και 1g θειικού χαλκού. Σε μια άλλη φιάλη προστίθενται τα ίδια αντιδραστήρια αλλά χωρίς την προσθήκη τροφής (λευκός προσδιορισμός). Σε κάθε φιάλη γίνονται τα εξής:

- Προστίθενται 20-25 mL πυκνού θειικού οξέος και αναδεύονται.

Θερμαίνονται προσεχτικά μέχρις ότου σταματήσει η παραγωγή ατμών. Συνεχίζεται η καύση μέχρι να γίνει διαυγές και άχρωμο το περιεχόμενο της φιάλης. Κατά τη διάρκεια της καύσης αναδεύονται κατά τακτά χρονικά διαστήματα την φιάλη. Εξακολουθεί η καύση για μιάμιση (1½) ώρα και αφήνεται να ψυχθεί στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Προστίθενται περίπου 150 mL απεσταγμένου νερού και μερικά κομμάτια ελαφρόπετρας.

- Σε κωνική φιάλη των 250 mL προστίθενται με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου 50 mL διαλύματος βορικού οξέος και 4 σταγόνες δείκτη. Αφού

αναδεύεται η κωνική φιάλη, τοποθετείται στο κάτω άκρο του ψυκτήρα κατά τέτοιο τρόπο ώστε το ράμφος του να βυθίζεται στο διάλυμα του βορικού οξέος.

- Με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου προστίθενται στη φιάλη Kjeldahl 80 mL διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου. Η προσθήκη αυτή γίνεται από τις παρειές έχοντας τη φιάλη σε πλάγια θέση για να εμποδιστεί η γρήγορη ανάμιξη του καυστικού νατρίου με το περιεχόμενο της φιάλης.

- Συνδέεται η φιάλη με τον ψυκτήρα. Αναμιγνύεται το περιεχόμενο της φιάλης και θερμαίνεται με προσοχή μέχρι βρασμού αποφεύγοντας το άφρισμα. Συνεχίζεται η απόσταξη μέχρις ότου το περιεχόμενο της φιάλης παρουσιάσει αναπηδήματα.

- Με το τέλος της απόσταξης εξάγεται το εμβαπτισμένο ράμφος του ψυκτήρα από το διάλυμα του βορικού οξέος και ξεπλένεται με λίγο απεσταγμένο νερό. Ογκομετρείται το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης με διάλυμα υδροχλωρικού ή θειικού οξέος 0,1N και σημειώνονται τα ml του υδροχλωρικού ή θειικού οξέος που καταναλώθηκαν κατά την ογκομέτρηση.

Δ. Υπολογισμοί

Το ολικό άζωτο (%) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Ολικό άζωτο (\%)} = 1,40 \times N (V_1 - V_0) / P$$

Όπου:

N : Η κανονικότητα του υδροχλωρικού ή θειικού οξέος

V₁: Τα καταναλωθέντα ml υδροχλωρικού ή θειικού οξέος κατά τον προσδιορισμό του αζώτου στο δείγμα της τροφής

V₀: Τα καταναλωθέντα ml υδροχλωρικού ή θειικού οξέος κατά τον λευκό προσδιορισμό

P: Το βάρος του δείγματος σε γραμμάρια

Οι αζωτούχες ουσίες (%) της τροφής βρίσκονται πολλαπλασιάζοντας το ολικό άζωτο (%) με το συντελεστή 6,25.

5.1.4. Προσδιορισμός ινωδών ουσιών

A. Γενικά

Ινώδεις ουσίες είναι το μέρος εκείνο από το σύνολο των υδατανθράκων της τροφής που αντιστέκεται στη δράση οξέων και αλκάλων και γιαυτό αρχικά θεωρήθηκε ως το ελάχιστο έως καθόλου πεπτό μέρος των τροφών.

Αυτό όμως έχει αναθεωρηθεί και σήμερα είναι γνωστό ότι οι ινώδεις ουσίες όχι μόνο είναι πεπτές αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις ο συντελεστής πεπτικότητάς τους είναι το ίδιο υψηλός όσο και αυτός των απλούστερων υδατανθράκων (σακχάρων).

B. Αρχή μεθόδου

Αυτή βασίστηκε στη μέθοδο Weende (AOAC, 2000) και πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικής συσκευής ινωδών:

Η κλασική μέθοδος **Weende** δεν χρησιμοποιείται στα σύγχρονα εργαστήρια πλέον λόγω της επικινδυνότητας από τη χρήση του αμιάντου. Βασίζεται στη διαλυτοποίηση και απομάκρυνση των μη κυτταρινούχων συστατικών της προς ανάλυση τροφής με την βοήθεια αραιών διαλυμάτων θειικού οξέος (H₂SO₄) και υδροξειδίου του νατρίου (NaOH). Το δείγμα της τροφής αρχικά υπόκειται σε

βρασμό με διάλυμα H_2SO_4 και κατόπιν, στο 2ο στάδιο, υπόκειται σε βρασμό με διάλυμα $NaOH$, κατά απομίμηση της πεπτικής δράσης των γαστρικών εκκρίσεων.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται στα σύγχρονα εργαστήρια, βασίζεται στη διαλυτοποίηση και απομάκρυνση των μη κυτταρινούχων συστατικών της προς ανάλυση τροφής με την βοήθεια αραιών διαλυμάτων θειικού οξέος (H_2SO_4) και υδροξειδίου του καλίου (KOH) αντί του υδροξειδίου του νατρίου ($NaOH$). Το υπόλειμμα που μένει μετά τους 2 βρασμούς, διηθείται, εκπλύνεται με ζεστό νερό και με οινόπνευμα, ζυγίζεται και κατόπιν αποτεφρώνεται. Η διαφορά του βάρους του υπολείμματος πριν και μετά την αποτέφρωση εκφράζει την ποσότητα των ινωδών ουσιών που περιέχονται στο δείγμα της τροφής.

Γ. Πορεία μεθόδου

Αναλυτικότερα, ζυγίζεται περίπου 0,5 g του δείγματος στα ειδικά φιαλίδια του μηχανήματος των ινωδών και προστίθενται σ αυτά 200 mL H_2SO_4 (0,26 N) μαζί με 2-3 σταγόνες οκτανόλης και θερμαίνονται μέχρι βρασμού. Με την έναρξη του βρασμού υπολογίζονται 30 λεπτά καθόλη τη διάρκεια των οποίων το θειικό οξύ πρέπει να συνεχίζει να βράζει ενώ το δείγμα συνεχίζει να είναι σκεπασμένο με το ειδικό κάλυμμα του μηχανήματος για να μην εξατμιστεί. Παράλληλα, εισάγεται ποτήρι ζέσης στο φούρνο για ξήρανση, του οποίου λαμβάνεται το απόβαρο διότι θα χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια για την παραλαβή των ινωδών. Μετά την παρέλευση των 30' εξάγεται το δείγμα από τη θέρμανση, μετά ξεπλένονται τα φιαλίδια και το δείγμα που είναι μέσα σ αυτά με απιονισμένο νερό εις τριπλούν (~90 mL H_2O). Στην συνέχεια, προστίθενται 200 mL KOH (0,23 N). Μετά την προσθήκη των 200 mL μαζί με ακόμα 2-3 σταγόνες οκτανόλης επαναλαμβάνεται ο βρασμός για ακόμα 30 λεπτά. Με το πέρας του βρασμού ξεπλένονται με ζεστό απιονισμένο νερό (~ 90 mL θερμό νερό) εις τριπλούν και κατόπιν ξεπλένεται το κάθε δείγμα με 25 mL ακετόνης. Αφού μεταφερθούν στο ποτήρι οδηγούνται στο φούρνο για 24 ώρες περίπου στους $120^\circ C$. Αν παραστεί ανάγκη αφήνεται και παραπάνω. Ταυτόχρονα, εισάγεται και μια κάψα στο φούρνο για ξήρανση και προζυγίζεται ώστε στο τέλος της διαδικασίας να πάει για τέφρα.

Η διαφορά του βάρους του υπολείμματος πριν και μετά την αποτέφρωση εκφράζει την ποσότητα των ινωδών ουσιών που περιέχονται στο δείγμα της τροφής.

Δ. Υπολογισμός

Ινώδεις ουσίες (%) = $W1 - W2/W0 \times 100$

Όπου **W1**: Το βάρος των ποτηριών μετά την κατεργασία με H_2SO_4 και KOH

W2: Το βάρος των ποτηριών μετά την αποτέφρωση

W0: Το βάρος του δείγματος σε g

5.1.5. Προσδιορισμός των μικροβιακών ενδοπολυσακχαριτών και αναγόντων σακχάρων

Σε όλα τα δείγματα των ζυμώσεων οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες μετρήθηκαν με μια διαδικασία που βασίζεται σ ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο το οποίο έχει προταθεί από τους Liang et al. το 2009. Αρχικά ζυγίζονταν 0,05 g ξηρής βιομάζας από κάθε δείγμα το οποίο τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγεται 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCL) 2M κι

ακολουθεί βρασμός για 30 λεπτά ακριβώς. Στην συνέχεια προστίθενται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 10 mL υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 2M προκειμένου να γίνει εξουδετέρωση του μείγματος κι ακολούθως το κάθε δείγμα διηθείται σε καινούργιο δοκιμαστικό σωλήνα.

Για να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρική μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων (DNS) (Miller, 1959). Σ έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα λαμβάνονταν 0,5 mL από το υπερκείμενο (αν χρειάζεται κάνουμε τις κατάλληλες αραιώσεις) και προστίθενται σ αυτό 0,5 mL dns τα οποία τοποθετούμε στο vortex και μετά απ αυτό τα βάζουμε για βρασμό στους 100 °C για 5 λεπτά ακριβώς. Αφότου ψυχθούν προστίθενται 5 mL απιονισμένο νερό κι αφού γίνει ανάδευση του υγρού ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου DRLANGE, Cadas 50.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L).

5.1.6. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αιθανόλης με την χρήση κιτ

Βασικές αρχές του κιτ αιθανόλης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αιθανόλης απαιτεί δύο ενζυμικές αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση που καταλύεται από την αφυδρογονάση αλκοόλης (ADH), η αιθανόλη οξειδώνεται σε ακεταλδεΐδη από το νικοτιναμιδο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD⁺) (1).



Ωστόσο, επειδή η ισορροπία της αντίδρασης (1) ευνοεί την αιθανόλη και το NAD⁺, απαιτείται περαιτέρω αντίδραση για «παγίδευση» των προϊόντων. Αυτό επιτυγχάνεται με την ποσοτική οξείδωση της ακεταλδεΐδης σε οξικό οξύ παρουσία αλδεΐδικης αφυδρογονάσης (Al-DH) και NAD⁺ (2).



Η ποσότητα NADH που σχηματίζεται σε αυτήν την οδό της αντίδρασης είναι στοιχειομετρική με διπλάσια την ποσότητα αιθανόλης. Είναι το NADH που μετρείται με την αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm (https://www.megazyme.com/documents/Booklet/K-ETOH_DATA.pdf).

5.1.6.1. Αραίωση δείγματος

Η ποσότητα αιθανόλης που υπάρχει στην κυψελίδα (δηλαδή στα 0,1mL δείγματος που αναλύεται) πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0,25 και 12 μg. Το διάλυμα δείγματος πρέπει συνεπώς να αραιωθεί επαρκώς για να δώσει συγκέντρωση μεταξύ 0,01 και 0,12 g/L. Οι αραιώσεις γίνονται βάση του παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5.1.6.6.: Αραιώσεις δείγματος

Εκτιμώμενη Συγκέντρωση Αιθανόλης	Αραίωση με νερό	Συντελεστής αραίωσης
<0,12	-	1
0,12-1,2	1+9	10
1,2-12	1+99	100
12-120	1+999	1000
>120	1+9999	10000

Εάν η τιμή της αιθανόλης είναι πολύ χαμηλή (π.χ. <0,100), αφαιρείται περισσότερο δείγμα ή αραιώνεται λιγότερο έντονα. Εναλλακτικά, ο όγκος του δείγματος που πρόκειται να διοχετευτεί μέσα στην κυψελίδα μπορεί να αυξηθεί έως και 2,00 mL, διασφαλίζοντας ότι το άθροισμα του δείγματος και των συστατικών αποσταγμένου νερού στην αντίδραση είναι 2,10 mL και χρησιμοποιώντας το νέο όγκο δείγματος στην εξίσωση.

5.1.6.2. Διαδικασία Μέτρησης

Αρχικά μηδενίζεται το φωτόμετρο με τη χρήση ενός μικρού δοκιμαστικού σωλήνα που περιέχει νερό στα 340 nm. Έπειτα ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία προκειμένου να βρεθεί η ποσότητα της αιθανόλης στο δείγμα μας.

Πίνακας 5.1.6.2.7.: Διαδικασία εύρεσης αιθανόλης στο δείγμα

Διαλύματα	Τυφλό	Δείγμα
Απιονισμένο νερό	2,1 mL	2 mL
Δείγμα	-	0,1 mL
Διάλυμα 1 (buffer)	0,2 mL	0,2 mL
Διάλυμα 2 (NAD)	0,2 mL	0,2 mL
Διάλυμα 3 (Aldehyde dehydrogenase)	0,05 mL	0,05 mL
vortex +αναμονή για 2 λεπτά πριν την μέτρηση (A1)		
Διάλυμα 4 (Alcohol dehydrogenase)	0,02 mL	0,02 mL
vortex +αναμονή για 5 λεπτά πριν τη μέτρηση (A2)		

5.1.6.3. Υπολογισμοί:

Προσδιορίζεται η διαφορά απορρόφησης (A2-A1) τόσο για το κενό όσο και για το δείγμα. Αφαιρέστε τη διαφορά απορρόφησης του τυφλού από τη διαφορά απορρόφησης του δείγματος, λαμβάνοντας έτσι ΔΑιθανόλη. Η τιμή της ΔΑιθανόλης πρέπει κατά κανόνα να είναι τουλάχιστον 0.100 μονάδες απορρόφησης για να επιτευχθούν αρκετά ακριβή αποτελέσματα. Η συγκέντρωση της αιθανόλης μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$C = V * MW / (\epsilon * d * v * 2) * \Delta A \quad [g/L]$$

Όπου:

V=τελικός όγκος σε mL

MW=Μοριακό βάρος της αιθανόλης (g/mol)

ε =συντελεστής απόσβεσης NADH στα 340 nm 6300 [l x mol⁻¹ x cm⁻¹]

d=μήκος φωτός [cm]

v = όγκος δείγματος [mL]

2=2 γραμμομόρια NADH που παράγονται για κάθε γραμμομόριο αιθανόλης

5.1.7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης , γλυκερόλης και αιθανόλης με χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

5.1.7.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης με χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

Η **γλυκόζη** προσδιορίστηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC). Η συσκευή όπου πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις ήταν: Alliance Waters 2695 separations module με: ανιχνευτή waters 2410 refractive index detector. Στήλη: ROA –Organic AcidH⁺ (8%) 300 x 7,8 mm Κινητή φάση 10mm θειϊκού οξέος. Η ροή κινητής φάσης ρυθμισμένη στα 0,5 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης ήταν 60°C.

Η ανάλυση του κάθε δείγματος διαρκούσε 30 λεπτά κι αυτόματα από το εμφανιζόμενο χρωματογράφημα πραγματοποιούταν ολοκλήρωση των κορυφών της γλυκόζης με τη βοήθεια του λογισμικού Empower.

5.1.7.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης σε γλυκερόλη με χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC)

Η ποσοτικοποίηση της παραγόμενης **γλυκερόλης** κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της **HPLC** με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.

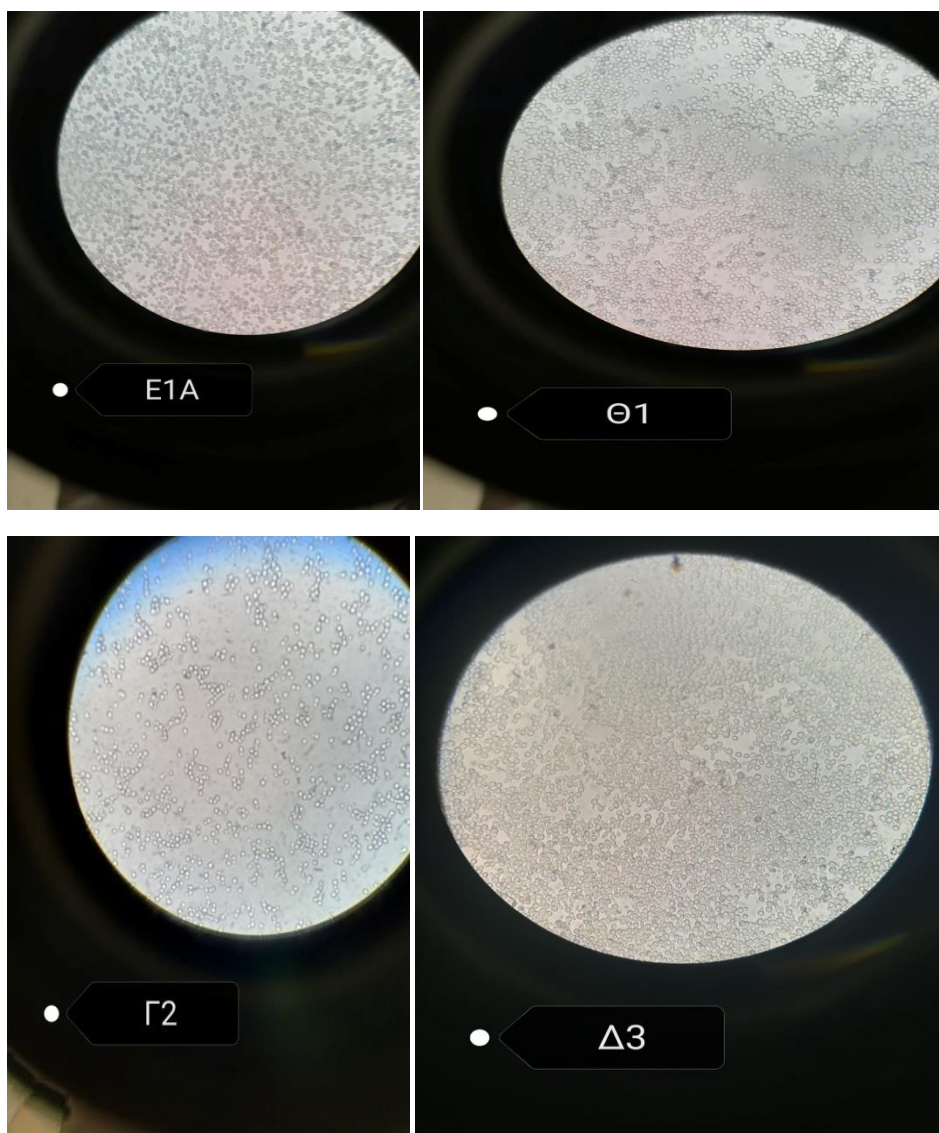
5.1.7.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης σε αιθανόλη (HPLC-Κιτ Αιθανόλης)

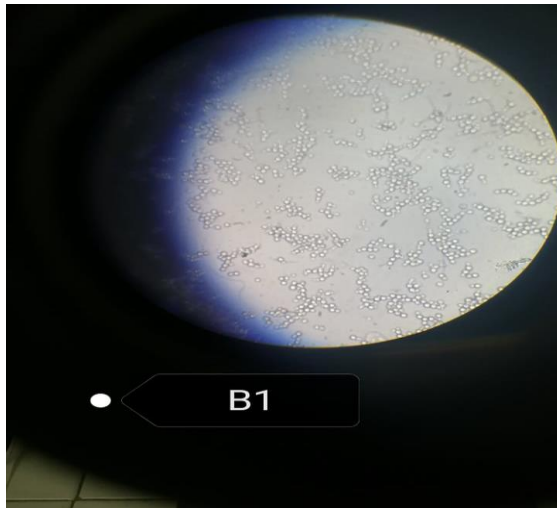
Η ποσοτικοποίηση της παραγόμενης **αιθανόλης** κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της **HPLC** με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.

5.2. Μικροοργανισμοί

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διαδικασία στην παρούσα διπλωματική μελέτη είναι ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*. Τα στελέχη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι το E1A, Θ1, Β1, Γ2 και το Δ3 του είδους *S. cerevisiae* τα οποία ευγενώς παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γ.Π.Α (υπεύθυνοι συλλογής : Καθηγητής Ε. Δροσινός και Δρ. Σ. Παραμυθιώτης).

Οι μικροοργανισμοί ανανεώνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε υπόστρωμα YPD και συντηρούνταν στους 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν (εικόνα 5.2.19).





Εικόνα 5.2.19: Χρησιμοποιούμενα στελέχη μικροοργανισμού

5.2.1. Παρασκευή Προκαλλιέργειας

Σε κωνικές φιάλες των 250 mL προσεθήκαν 150 mL θρεπτικού υλικού το οποίο αποτελούνταν από 10 g/L Yeast Extract, 10 g/L Peptone και 20 g/L Γλυκόζη σε απιονισμένο νερό. Ακολούθως, αποστειρώνονται και μεταφέρονται στο lamínar flow προκειμένου να γίνει ο εμβολιασμός τους κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Τέλος οι φιάλες μεταφέρονται στο shaker το οποίο έχει ρυθμιστεί να έχει 140 +/-5 rpm και θερμοκρασία 30°C για 48 ώρες έως ότου αναπτυχτεί η προκαλλιέργεια.

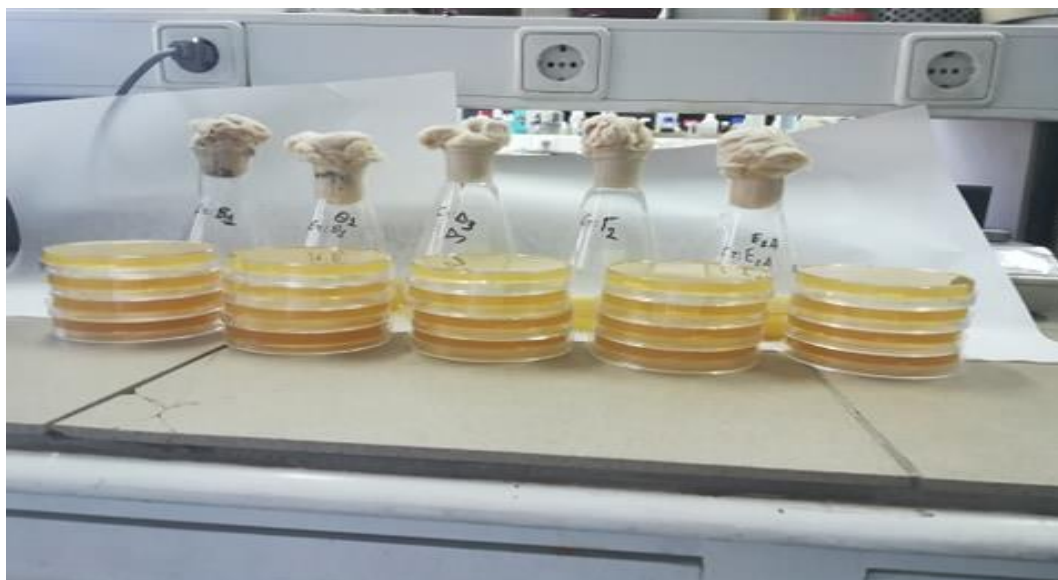


Εικόνα 5.2.1.20: Παρασκευή προκαλλιέργειας

5.2.2. Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλία

Οι μικροοργανισμοί για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν έχουν ανάγκη από θρεπτικές ουσίες και κατάλληλη θερμοκρασία και ατμόσφαιρα.

Τα θρεπτικά υλικά είναι μίγματα διαφόρων ουσιών, τα οποία προσφέρουν τις ευνοϊκές συνθήκες για τη διατροφή και πολλαπλασιασμό των μικροβίων *in vitro*. Μερικές από τις ουσίες αυτές είναι θρεπτικές για τα μικρόβια, ενώ άλλες είναι παράγοντες αύξησης ή προστατευτικές για την ανάπτυξή τους (Κίντζιος, 2015). Για τη συντήρηση των μικροοργανισμών, γινόταν εμβολιασμός και επώαση στους 27°C για 3-4 ημέρες, σε τρυβλία με θρεπτικό υποστρώμα που περιείχε: 1) 10 g/L Πεπτόνη, 10 g/L Yeast extract, 10 g/L Γλυκόζη και 20 g/L agar. Αφού αναμιχθούν σ' ένα θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα τοποθετούνται για αποστείρωση. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος ψύχονται ελάχιστα και στην συνέχεια εισάγουμε το υγρό σε κάθε τρυβλίο και αφήνονται μέχρι να στερεοποιηθεί το μέσο.



Εικόνα 5.2.2.21: Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλία

5.2.3. Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες

Τα επιλεγμένα στελέχη του *S. cerevisiae* μελετήθηκαν ως προς τη δυνατότητά τους να μετατρέπουν τη γλυκόζη σε αιθανόλη, σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Για τον σκοπό αυτό, εμβολιάστηκαν σε κωνικές φιάλες erlenmeyer των 250 mL, που περιείχαν κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (πίνακας 5.2.3.8) και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε shaker καθ όλη την διάρκεια της ζύμωσης.

Πίνακας 5. 2.3. 8: Η σύσταση του θρεπτικού υλικού για την καλλιέργεια

Γλυκόζη	50 ή 70 ή 100 ή 150 g/L
Yeast Extract	3 g/L
Peptone	3g/L
KH ₂ PO ₄	7 g/L
Na ₂ HPO ₄	2,5 g/L
MgSO ₄ -7H ₂ O	1,5 g/L
FeCl ₃ -6H ₂ O	0,15 g/L
CaCl ₂ – 2H ₂ O	0,15 g/L
ZnSO ₄ – 7H ₂ O	0,02 g/L
MnSO ₄ -7H ₂ O	0,06 g/L

Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η γλυκόζη σε διάφορες συγκεντρώσεις ενώ η πηγή αζώτου προέρχεται από την πεπτόνη και το yeast extract. Ο όγκος του θρεπτικού μέσου ανά κωνική φιάλη ήταν 100 mL πριν τον εμβολιασμό. Οι κωνικές φιάλες μετά από κατάλληλο πωμάτισμα αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο. Αφού διαπιστωθεί ότι η θερμοκρασία είναι ικανοποιητική τοποθετούνται στο laminar flow το οποίο έχει απολυμανθεί και εμβολιάζονται με 2 mL (2%) προκαλλιέργειας στις αερόβιες συνθήκες ή με 5 mL (5%) προκαλλιέργειας στις αναερόβιες συνθήκες και στην συνέχεια τα τοποθετούμε στον αναδευτήρα. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στο shaker τύπου: Lab-Line Model 3594 Incubator-Shaker ήταν 30°C και 140-145 rpm. Το pH καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων ρυθμίζεται περίπου στο ~4,10 με την χρήση HCl 3M. Η διάρκεια του κάθε πειράματος ήταν 4 μέρες και σε κάθε δειγματοληψία χρησιμοποιούνταν ολόκληρο το περιεχόμενο της φιάλης το οποίο χρησιμοποιούνταν για όλες τις απαραίτητες αναλύσεις. Όσον αφορά τα πειράματα στις αναερόβιες συνθήκες η διαδικασία διαφοροποιούνταν μετά την αποστείρωση. Πιο συγκεκριμένα, αποστειρώνεται απιονισμένο νερό το οποίο τοποθετείται στην κορυφή της αεροπαγίδας και χρησιμοποιείται προκειμένου να διακόπτεται η είσοδος του οξυγόνου καθώς και των σωματιδίων (μ' αυτό τον τρόπο επιτυγχάνουμε αναερόβιες συνθήκες). Η αεροπαγίδα αυτή τοποθετείται στο στόμιο της φιάλης με την βοήθεια μιας πλαστικής φλάντζας προκειμένου να παραμένει στην κορυφή και να μην μετακινείται. Όλες οι υπόλοιπες συνθήκες παραμένουν ίδιες.



Εικόνα 5.2.2.22: Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας σε αναερόβιες συνθήκες

5.3 Χρήση τμημάτων της φραγκοσυκιάς (κλαδωδίων + φρούτων)

5.3.1 Διαχείριση κλαδωδίου φραγκόσουκου

Τα κλαδώδια καθώς και τα φρούτα –καρποί που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα προέρχονταν από το Ποικίλο Όρος που βρίσκεται στην περιοχή του Καματερού.

Με την παραλαβή του και τη μεταφορά στο εργαστήριο διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, μετρήθηκε η **υγρασία τους (%)** και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 7.54. Στην συνέχεια υποβλήθηκαν στις παρακάτω αναλύσεις βασικών φυσικοχημικών συστατικών :

- Πρωτεΐνες % (μέθοδος Kjeldahl),
- Ινώδη % (μέθοδος WEEDE),
- Ολικοί Πολυσακχαρίτες % (μέθοδος DNS)
- Διαλυτά ανάγοντα σάκχαρα (g/L)

- Μέτρηση αιθανόλης(+ κιτ), γλυκόζης, γλυκερόλης με χρήση HPLC

5.3.2 Μέθοδοι εξαγωγής αναγόντων σακχάρων από υποστρώματα φραγκοσυκιάς

Η διαχείριση της βιομάζας πριν από την τελική εφαρμογή του μικροοργανισμού για παραγωγή αιθανόλης είναι σημαντική καθώς απελευθερώνει περισσότερα ζυμώσιμα σάκχαρα σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση και έτσι δημιουργούνται συνθήκες για μεγαλύτερες αποδόσεις σε αιθανόλης (Mosier et al., 2005; Harun et al., 2011). Μια κατάλληλη προεπεξεργασία μπορεί να παρεμποδίσει τον σχηματισμό ανασταλτικών παραπροϊόντων στην επακόλουθη υδρόλυση και ζύμωση (Sun and Cheng, 2002; Harun et al., 2011). Οι προεπεξεργασίες γίνονται λόγω του ότι οι σακχαρομόκητες έχουν την δυνατότητα να ζυμώσουν μόνο μονομερή και διμερή σάκχαρα (Khan et al., 2017; Markou et al., 2013). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα για την προεπεξεργασία της βιομάζας είναι φυσικές, χημικές, βιολογικές και φυσικοχημικές ή ακόμα και συνδυασμός κάποιων από τις παραπάνω μεθόδους.

Θερμική Επεξεργασία

Ζυγίζονται 1 g αποξηραμένου καρπού (φρούτου), 1 g αποξηραμένου κλαδωδίου και τέλος 1 g αποξηραμένης φλούδας τα οποία τοποθετούνται σε κωνικές φιάλες και προστίθενται σ' αυτά 50mL απιονισμένο νερό και ακολουθεί 1 ώρα ανάδευση σε θερμαινόμενους αναδευτήρες στους 90°C. Μετά το πέρας της ώρας ακολουθεί διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί και μέτρηση με την μέθοδο Dns.

5.3.3. Επεξεργασία με υδρολύσεις

5.3.3.1. Χημική Υδρόλυση

Ζυγίζονται 0,05 g ξηρής βιομάζας από κάθε δείγμα το οποίο τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα εισάγεται 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCL) 2M κι ακολουθεί βρασμός για 30 λεπτά ακριβώς. Στην συνέχεια, προστίθενται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 10 mL υδροξειδίου του νατρίου (NAOH) 2M προκειμένου να γίνει εξουδετέρωση του μείγματος κι ακολούθως το κάθε δείγμα διηθείται σε καινούργιο δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθεί μέτρηση σακχάρων με τη μέθοδο DNS.

5.3.3.2 Ενζυμική Υδρόλυση

Αρχικά ερευνήθηκε η δυνατότητα κάθε ενός ενζύμου ξεχωριστά να υδρολύσει το περιεχόμενο άμυλο του κλαδωδίου. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα: **Termamyl** και **Celluclast** τα οποία προμηθεύτηκαν από την novozyme και χρησιμοποιήθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες δράσης για το καθένα.

A. TERMAMYL

Ένζυμο: α -Amylase

Προέλευσή: *Bacillus licheniformis*

Συνώνυμο: 1,4- α -D-Glucan-glucanohydrolase,

Enzyme Commission Number (EC): 3.2.1.1

Δράση:

Το Termamyl είναι μια θερμικά σταθερή αμυλάση η οποία παράγεται από γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *Bacillus licheniformis*. Η θερμική σταθερότητα του ενζύμου δεν συνδέεται με τις αλλαγές που επέφερε η γενετική τροποποίηση στον μικροοργανισμό η οποία με την μεταφορά γονιδίων κατόρθωσε να ενισχύσει απλώς την παραγωγή του ενζύμου. Το Termamyl χρησιμοποιείται για την συνεχή διαλυτοποίηση του αμύλου σε θερμοκρασίες μέχρι 105-110° C, επωφελούμενη από την υψηλή σταθερότητα του ενζύμου ακόμα και σε υπερβολικά υψηλές θερμοκρασίες. Είναι μια ένδο-αμυλάση που υδρολύει τους 1,4-άλφα γλυκοζιτικούς δεσμούς στην αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη, τις δύο συνιστώσες του αμύλου. Το άμυλο συνεπώς διασπάται σύντομα, σε ολιγοσακχαρίτες και σε δεξτρίνες. Παρουσιάζει την καλύτερη δυνατή δραστικότητα σε pH 7 και σε θερμοκρασία 90° C. Σε ένα αμυλούχο διάλυμα, η δράση του Termamyl μπορεί να σταθεροποιηθεί με την προσθήκη 50-70 ppm Ca^{2+} ιόντα.

Μονάδες ενεργότητας: Μια μονάδα του ενζύμου είναι η ποσότητα που απελευθερώνει 1.0 mg μαλτόζης από άμυλο σε 3 min, pH 6.9 και 20 °C.

B. CELLUCLAST 1.5L (C)

Ένζυμο: Cellulase

Προέλευση: *Trichoderma reesei*

Συνώνυμο: 1,4-(1,3;1,4)- β -D-Glucan 4-glucano-hydrolase

Enzyme Commission Number (EC): 3.2.1.4

Δράση: Παρασκευάζεται από επιλεγμένα στελέχη του μύκητα *Trichoderma reesei* και οι άριστες συνθήκες για την δράση του ενζύμου αυτού είναι pH 4,5-6 και θερμοκρασία 50-60° C χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των κυτταρικών υλικών σε ζυμώσιμα σάκχαρα όπως η σελοβιόζη και σε πολυμερή με μικρότερου μήκους αλυσίδα από την κυτταρίνη.

Στην συνέχεια, τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στις παρακάτω συνθήκες (πίνακας 5.3.3.2.9)

Πίνακας 5.3.3.2.9.: Συνθήκες που εφαρμόστηκαν κατά τη χρήση των ενζύμων

Ενζυμα	pH	Θερμοκρασία (° C)	Ώρα(h)
Termamyl	6	85	1
Celluclast	5	50	2

Με βάση τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν δοκιμές πριν την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης υποστρώματος και ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα:

Αρχικά, έγιναν δοκιμές με το ένζυμο Termamyl σε διάφορες συγκεντρώσεις (βλέπε πίνακα) αποξηραμένου κλαδώδιου καθώς και φρούτου. Αφού ζυγίστηκαν οι ποσότητες προστέθηκε σε κάθε μια ποσότητα από τις παραπάνω 100 mL απιονισμένο νερό και έγινε διόρθωση του pH με NaOH 5 N μέχρι να φτάσει στο 6. Στην συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε φιάλη η κατάλληλη δόση από το ένζυμο (πίνακας 5.3.3.2.9).

Ακολούθως, μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο στους 85°C όπου αφέθηκε για μια ώρα ενώ, ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν ανάδευση του διαλύματος. Μετά το πέρας της ώρας μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο που είχε φθάσει σε κατάσταση βρασμού για 10 λεπτά (προκειμένου να γίνει απενεργοποίηση του ενζύμου) και έπειτα αφέθηκαν οι φιάλες για να μειωθεί η θερμοκρασία τους και εφαρμόστηκε διήθηση υπό κενό. Το υδρόλυμα που παραλήφθηκε αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη μέχρι τη χρήση του. Αντίστοιχη πορεία ακολουθήθηκε και με το Celluclast με τη μόνη διαφορά ότι η θερμοκρασία στο υδατόλουτρο ήταν 50° C και το pH ρυθμίστηκε στο 5 με τη χρήση 3M HCL.

Πίνακας 5.3.3.2.10.: Συνδυασμοί ενζύμων-υποστρώματος

Ένζυμο	Υπόστρωμα (g/L)	Ποσότητα ενζύμου (μL)
Termamyl	10 κλαδώδιο	20
Termamyl	20 κλαδώδιο	20
Termamyl	30 κλαδώδιο	20
Termamyl	50 κλαδώδιο	20
Termamyl	100 κλαδώδιο	20
Termamyl	50 φρούτο	20
Termamyl	10 κλαδώδιο	80
Termamyl	100 κλαδώδιο + 40 φρούτο	60
Celluclast	10 κλαδώδιο	20
Celluclast	20 κλαδώδιο	20
Celluclast	30 κλαδώδιο	20
Celluclast	50 κλαδώδιο	20
Celluclast	50 φρούτο	20
Celluclast	100 κλαδώδιο	20
Termamyl +Celluclast	100 κλαδώδιο	20

5.4. Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα

Το στέλεχος E1A επιλέχθηκε να καλλιεργηθεί στο βιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας τύπου L1523 Bioengineering χωρητικότητας συνολικού

όγκου 8L με δυνατότητα ελέγχου pH, θερμοκρασίας καθώς και αριθμού στροφών ανάδευσης.

Θρεπτικό μέσο βιοαντιδραστήρα

Το θρεπτικό μέσο στο οποίο έγινε η ζύμωση ήταν:

1) **4 L αποξηραμένου κλαδωδίου με αποξηραμένο φρούτο**(σε αναλογία 100 g/L αποξηραμένου κλαδωδίου + 40 g/L αποξηραμένου φρούτου) το οποίο παραλήφθηκε μετά από ενζυμική υδρόλυση και από

2) **1,5 L χυμού φραγκόσουκου** το οποίο παραλήφθηκε μετά από άλεση ολοκλήρου του καρπού και διήθηση σε ηθμό Buchner. Ο χυμός δημιουργήθηκε από ελαττωματικά φρούτα (χωρίς καμία αξία) λόγω του ότι ήταν χτυπημένα, είχαν στίγματα και γενικά ήταν ακατάλληλα για βρώση.

Ο όγκος του υγρού που προστέθηκε στον αντιδραστήρα πριν τον εμβολιασμό ήταν 5,5 L. Ο επιθυμητός τελικός όγκος ήταν 6 L οπότε με την προσθήκη των 300 mL του εμβολίου (5%) καθώς και του HCL 3M (~200 mL) ο τελικός όγκος που θα περιείχε ο βιοαντιδραστήρας θα ήταν 6 L.

Πριν από τον εμβολιασμό πραγματοποιήθηκε αποστείρωση του θρεπτικού μέσου αφού είχε πραγματοποιηθεί διόρθωση του pH ~4 με την προσθήκη HCL 3M (~200 mL). Η θερμοκρασία πραγματοποίησης της ζύμωσης ήταν οι 30°C. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε πολύ γρήγορα μετά από εκκένωση της φιάλης με το μικροοργανισμό στο βιοαντιδραστήρα και στην συνέχεια η ανάδευση ρυθμίζονταν ώστε να παραμένει σταθερά στα 150 rpm. Επειδή στον αντιδραστήρα δεν υπήρχε παροχή αέρα και η ανάδευση ήταν αρκετά χαμηλή μπορούμε να πούμε ότι οι συνθήκες μπορούν να χαρακτηριστούν σαν μικροαερόφιλες.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετώνται τα στελέχη του είδους *S. cerevisiae* (B1, Γ2, Δ3, Ε1Α, Θ1) τα οποία δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς μέχρι στιγμής σε σχέση με τις βιοχημικές και φυσιολογικές δυνατότητες τους και ειδικώς σε σχέση με τη δυναμική παραγωγής αλκοόλης.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα προϊόντα τα οποία παρήγαγε ο κάθε μικροοργανισμός. Επίσης, δίδονται σχετικές πληροφορίες που απορρέουν από την παρατήρηση αυτών κατά την ανάπτυξη τους σε **αερόβιες** και **αναερόβιες** συνθήκες σε συνθετικό υπόστρωμα (ποικίλες συγκεντρώσεις 50, 70, 100 και 150 g/L γλυκόζης) σε φιάλες.

Σκοπός αυτού του εγχειρήματος ήταν να δημιουργηθεί το προφίλ του μικροοργανισμού μέσα από ζυμώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις σακχάρων στις παραπάνω συνθήκες.

Τέλος, ακολουθεί η επιλογή ενός στελέχους και η καλλιέργεια του σε βιοαντιδραστήρα 8L με υπόστρωμα από το φυτό της φραγκοσουκιάς (κλαδώδια + χυμός φρούτου).

Κατά τη διάρκεια της κινητικής των καλλιεργειών μελετήθηκαν τα δεδομένα της μικροβιακής αύξησης:

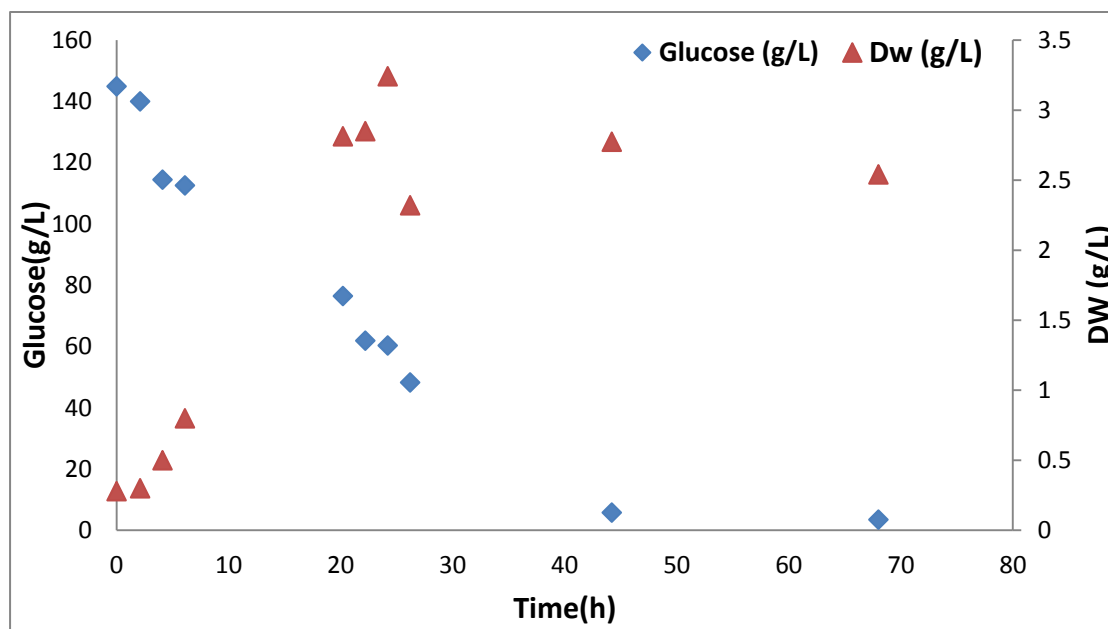
- 1) Η παραγωγή Βιομάζας
- 2) Η παραγωγή Αιθανόλης
- 3) Η καταναλισκόμενη πηγή άνθρακα (Γλυκόζη)
- 4) Η παραγωγή Ενδοπολυσακχαριτών
- 5) Η παραγωγή Γλυκερόλης

Για διευκόλυνση στην παρακολούθηση και κατανόηση της μελέτης επιλέξαμε να εστιάσουμε στην αλκοολική ζύμωση των στελεχών του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* με συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζης σε αερόβιες κι αναερόβιες συνθήκες, διότι κυρίως είχαμε σ' αυτήν μεγαλύτερη απόδοση σε αιθανόλη.

Τα πειράματα με τις λοιπές συγκεντρώσεις γλυκόζης εμφανίζονται στο παράρτημα στο τέλος της μελέτης.

6.1. Αερόβιες Συνθήκες

6.1.1. Αλκοολική ζύμωση του στελέχους E1A του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

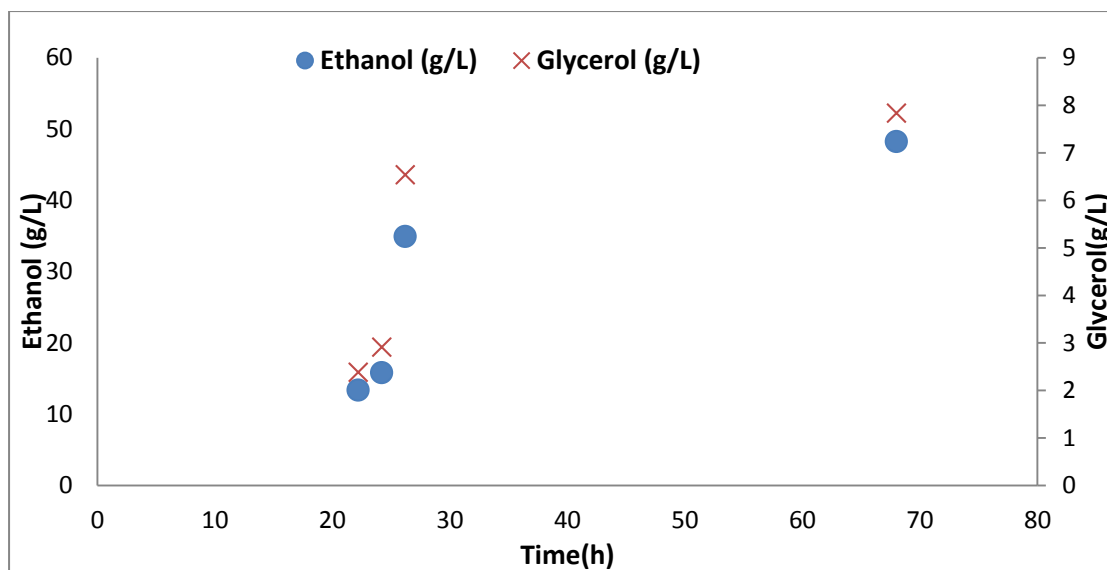


Διάγραμμα 6.1.1.1: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *S. cerevisiae* E1A. Παρατηρείται πως:

- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος δεν καταναλώνονται πλήρως αλλά ο μ/ος αφήνει αζύμωτα 3,50 g/L γλυκόζης μετά το πέρας του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία. Στο στέλεχος αυτό παρατηρείται ότι μετά τον σχηματισμό της μέγιστης ποσότητας της βιομάζας (3,24 g/L) στις 24 ώρες σημειώνεται πτώση της ποσότητας της βιομάζας για μικρό χρονικό διάστημα ενώ παρατηρείται εκ νέου αύξηση της βιομάζας η οποία παραμένει σχετικά σταθερή μέχρι το τέλος του πειράματος.

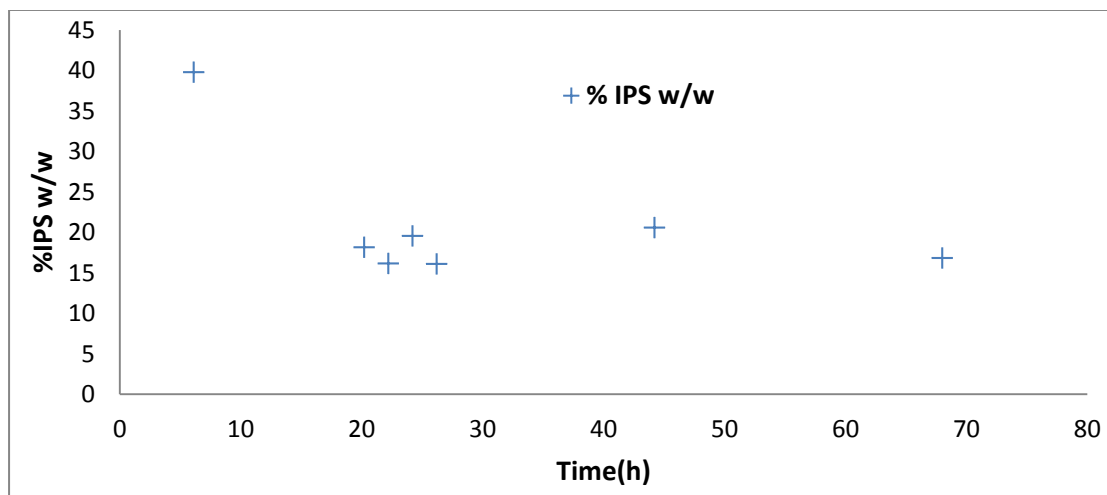


Διάγραμμα 6.1.1.2: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα περιγράφεται η παραγωγή αιθανόλης καθώς και γλυκερόλης από τον μικροοργανισμό E1A. Παρατηρείται ότι:

- Η ποσότητα της παραγόμενης **αιθανόλης** στο τέλος, που έχουν καταναλωθεί σχεδόν όλα τα σάκχαρα, λαμβάνεται η μέγιστη ποσότητα αιθανόλης η οποία είναι 48,24 g/L και ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης είναι: $YE_{EtOH/S} = 0,34$ g EtOH /g Glucose.

- Η **γλυκερόλη** καταγράφει ανοδική πορεία από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης. Τη μέγιστη τιμή της την λαμβάνει κατά το πέρας της ζύμωσης, δηλαδή στις 68 ώρες και η τιμή αυτή αγγίζει τα 7,84 g/L.

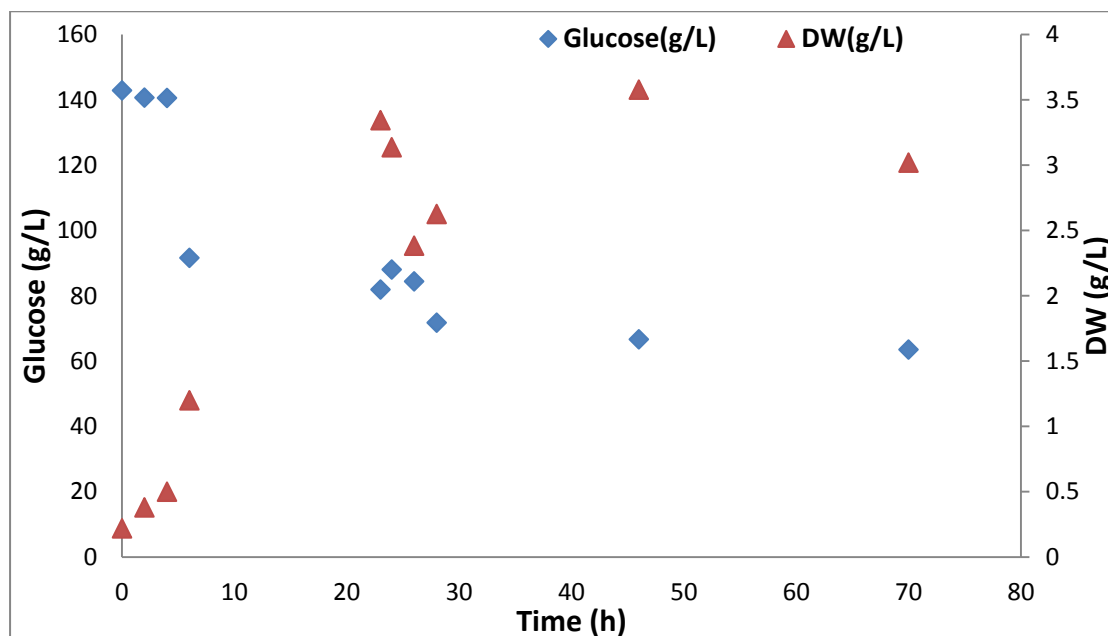


Διάγραμμα 6.1.1.3: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών (%) στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, κατά τη διάρκεια της **αλκοολικής ζύμωσης** παρατηρείται ότι:

- Στις πρώτες ώρες ο μικροοργανισμός συσσωρεύει τις μεγαλύτερες ποσότητες **ενδοπολυσακχαριτών** στο συγκεκριμένο στέλεχος φθάνοντας τη μέγιστη τιμή στα 39,78% w/w. Μετά απ αυτό, παρατηρείται μια αστάθεια στην ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών και το όλο φαινόμενο περατώνεται με τελική τιμή αυτή των 16,82 % w/w.

6.1.2 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

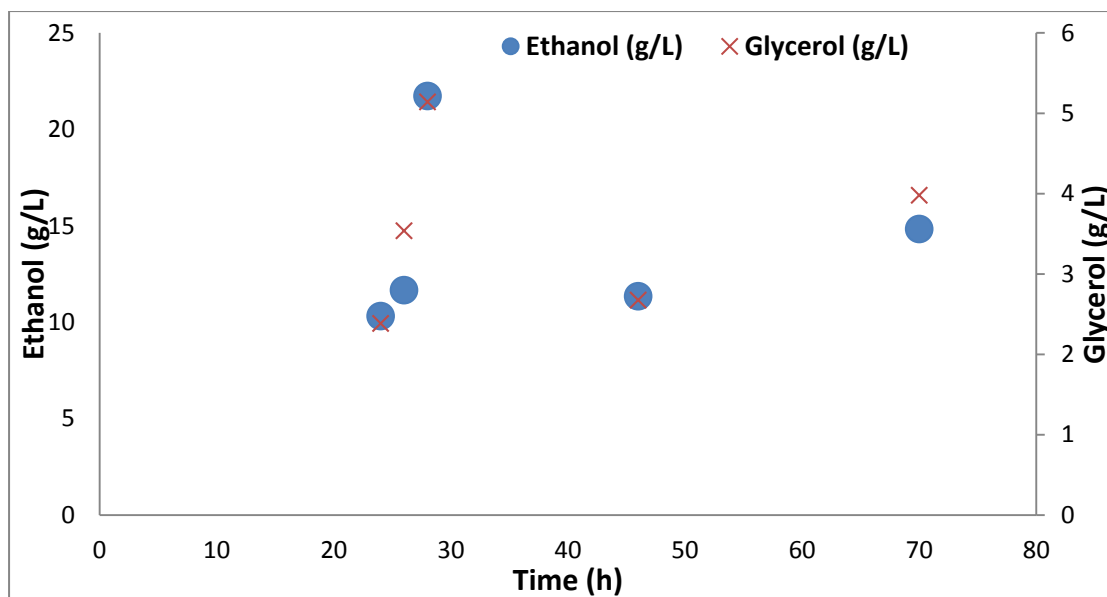


Διάγραμμα 6.1.2.4: Παραγωγή Βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Γ2

Στο παραπάνω διάγραμμα καταγράφεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της **γλυκόζης** για το στέλεχος *S. cerevisiae* Γ2. Παρατηρείται πως:

- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος δεν καταναλώνονται πλήρως αλλά ο μ/ος αφήνει αζύμωτα 63,51 g/L γλυκόζης με το πέρας του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι ο μικροοργανισμός αυτός να στρεσαρίστηκε απο την ποσότητα των σακχάρων.

- Στο στέλεχος αυτό παρατηρείται αύξηση της ποσότητας της **βιομάζας** στα αρχικά σημεία η οποία συνοδεύεται από αστάθεια στην παραγωγή βιομάζας μετά τις 23 ώρες. Η μέγιστη ποσότητα αυτής εμφανίζεται στις 46 ώρες φθάνοντας τα 3,58 g/L.

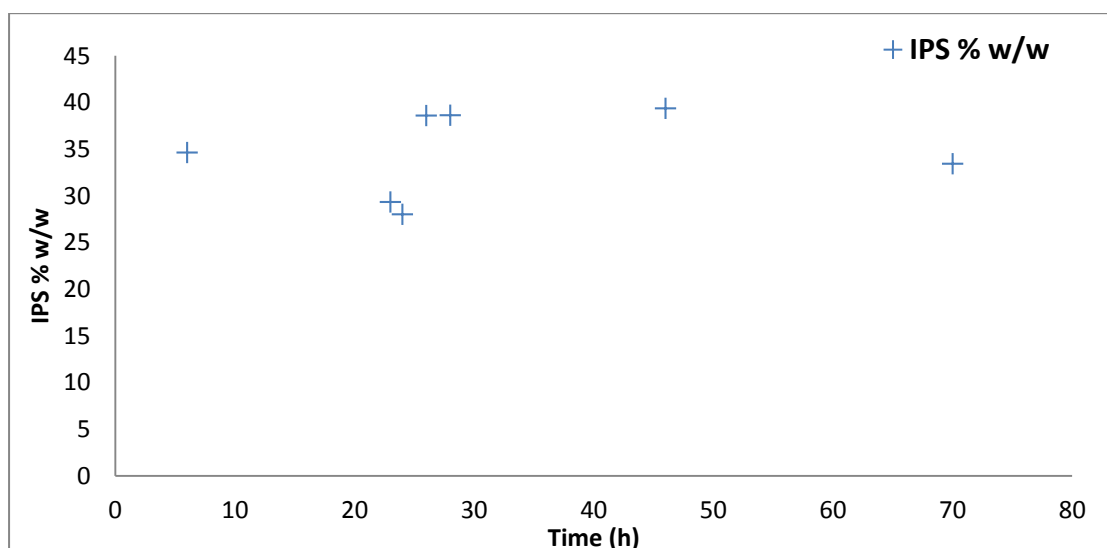


Διάγραμμα 6.1.2.5: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Γ2

Σ'αυτό το διάγραμμα φαίνεται η παραγωγή **αιθανόλης** καθώς και **γλυκερόλης** από τον μικροοργανισμό Γ2. Παρατηρείται ότι:

- Η μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** είναι 21,73 g/L και παράγεται στη διάρκεια των 28 ωρών παρέχοντας μια απόδοση της τάξης του $Y_{EtOH/S}=0,31$ g EtOH /g Glucose.

- Η **γλυκερόλη** καταγράφει ανοδική πορεία δίνοντας μέγιστη τιμή στην προκειμένη περίπτωση 5,14 g/L γλυκερόλης στις 28 ώρες. Ακολούθως, η ποσότητα της πέφτει και γύρω στις 50 ώρες σημειώνεται μια εκ νέου αύξηση της.

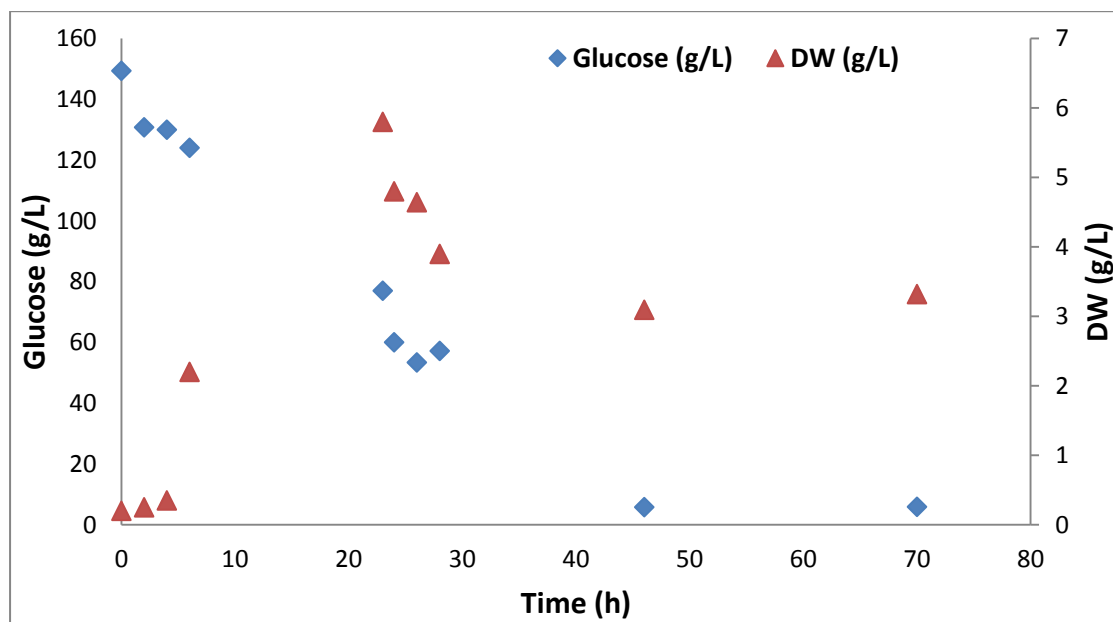


Διάγραμμα 6.1.2.6: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη)

Όπως φαίνεται εδώ, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης ισχύει ότι:

• Στις πρώτες ώρες ο μικροοργανισμός συσσωρεύει τις υψηλές ποσότητες **ενδοπολυσακχαριτών**. Η μέγιστη τιμή σημειώνεται στις 46 ώρες και φθάνει τα 39,37% w/w. Μετά απ' αυτό, παρατηρείται ότι η ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών σημειώνει μια πολύ μικρή πτώση η οποία καταλήγει στο να ολοκληρώνεται το φαινόμενο με τελική τιμή αυτή των 33,44 % w/w.

6.1.3 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

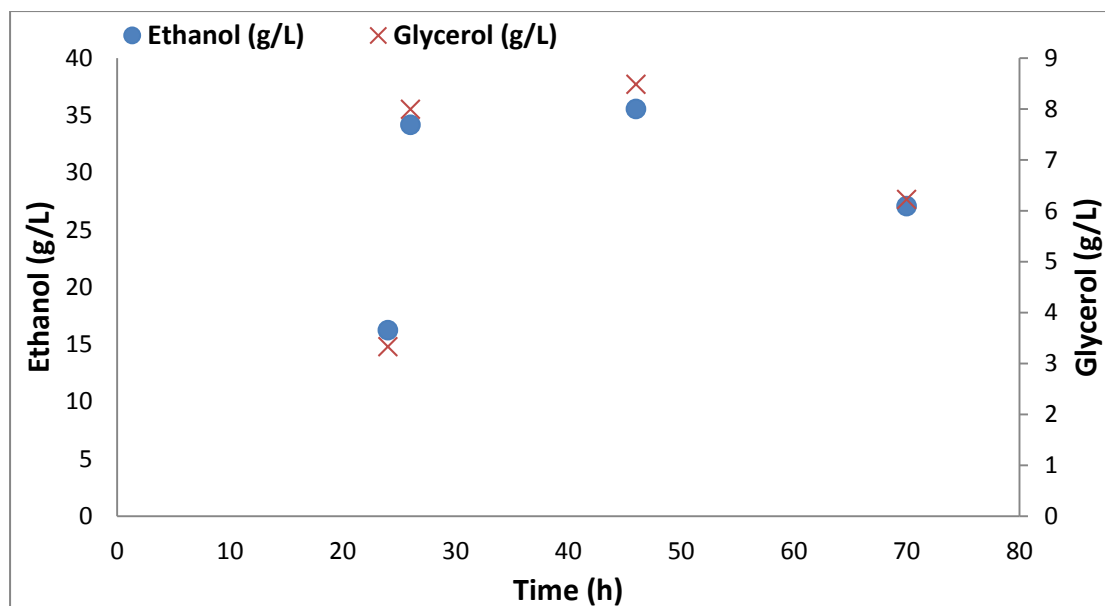


Διάγραμμα 6.1.3.7: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *cerevisiae* Θ1. Φαίνεται πως:

• Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος δεν καταναλώνονται πλήρως αλλά ο μ/ος αφήνει αζύμωτα 5,88 g/L γλυκόζης με την περάτωση του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης.

• Η **βιομάζα** δείχνει απότομη αύξηση φθάνοντας στις 23 ώρες τη μέγιστη τιμή της, δηλαδή τα 5,8 g/L. Μετά απ' αυτό, σημειώνεται μια πτώση η οποία στο τέλος σταματά αφού αυξηθεί ελάχιστα στο τελευταίο σημείο. Η αύξηση στο τελευταίο σημείο της ζύμωσης μπορεί να οφείλεται στο ότι τα κύτταρα του μικροοργανισμού που θανατώνονται απελευθερώνουν τα συστατικά τους στο περιβάλλον ανάπτυξης τους και γι αυτό παρατηρείται μια μικρή αύξηση στη βιομάζα.

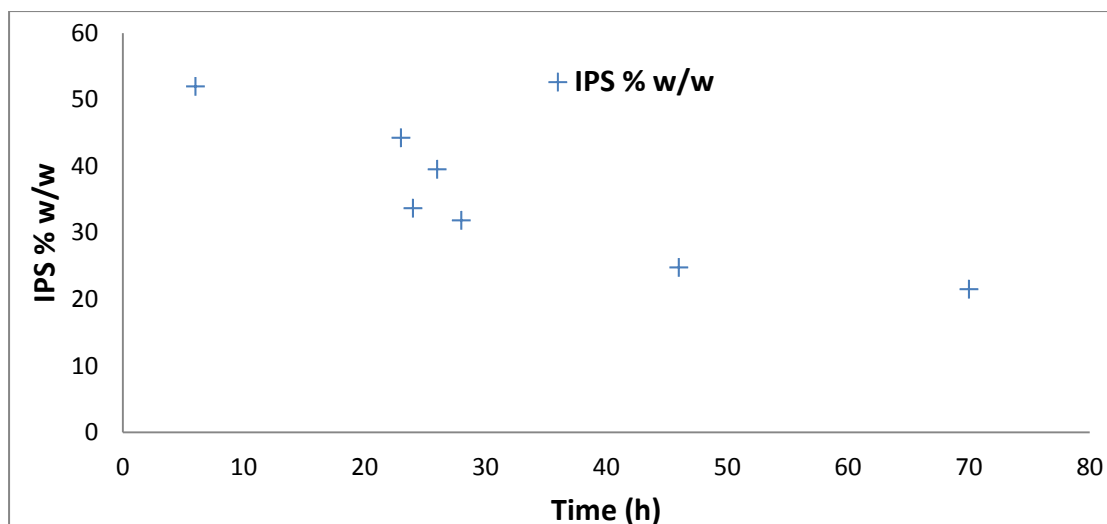


Διάγραμμα 6.1.3.8: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η παραγωγή αιθανόλης καθώς και γλυκερόλης από το μικροοργανισμό Θ1. Διαπιστώνεται ότι:

- Η μέγιστη ποσότητα της παραγόμενης **αιθανόλης** είναι 35,57 g/L και παράγεται στις 46 ώρες δίδοντας μια απόδοση της τάξης του: $Y_{EtOH/S} = 0,25$ g EtOH /g Glucose. Επίσης παρατηρείται ότι στα τελευταία σημεία της ζύμωσης υπάρχει μια μικρή ανακατανάλωση στην αιθανόλη το συγκεκριμένο φαινόμενο πιθανολογείται στο ότι οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση σακχάρων στα τελευταία σημεία. Ο *S. cerevisiae* όταν βρίσκεται σε περιβάλλον με συγκέντρωση σακχάρων χαμηλότερη από μια κρίσιμη συγκέντρωση, ο μεταβολισμός του συνεχίζεται αεροβίως και έτσι η παραγόμενη ποσότητα στην αιθανόλη σημειώνει πτώση.

- Η **γλυκερόλη** καταγράφει ανοδική πορεία αντίστοιχη με αυτή του E1A αγγίζοντας στην προκειμένη περίπτωση τα 8,21 g/L γλυκερόλης στις 46 ώρες και έπειτα σημειώνεται πτώση στο τελευταίο σημείο.

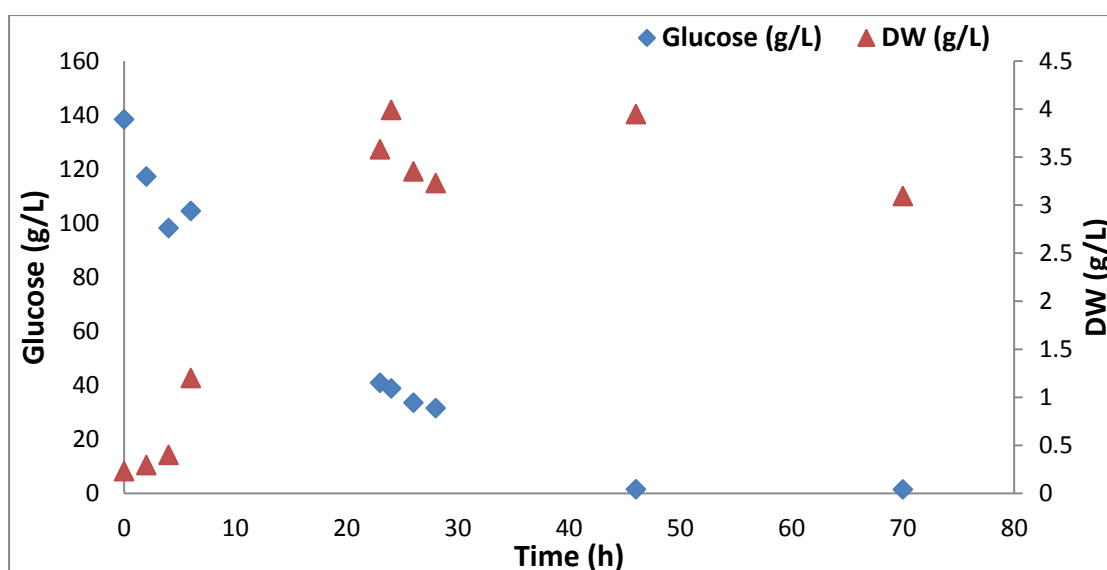


Διάγραμμα 6.1.3.9: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών (%) στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S.cerevisiae* Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρείται ότι:

- Στις πρώτες ώρες ο μικροοργανισμός συσσωρεύει τις μεγαλύτερες ποσότητες **ενδοπολυσακχαριτών**. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται κατά τον εμβολιασμό που φθάνει τα 52 % w/w. Στην συνέχεια, παρατηρείται μια συνεχής πτώση στην ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών η οποία καταλήγει στο να ολοκληρωθεί το φαινόμενο με τελική τιμή αυτή των 21,52 % w/w.

6.1.4 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

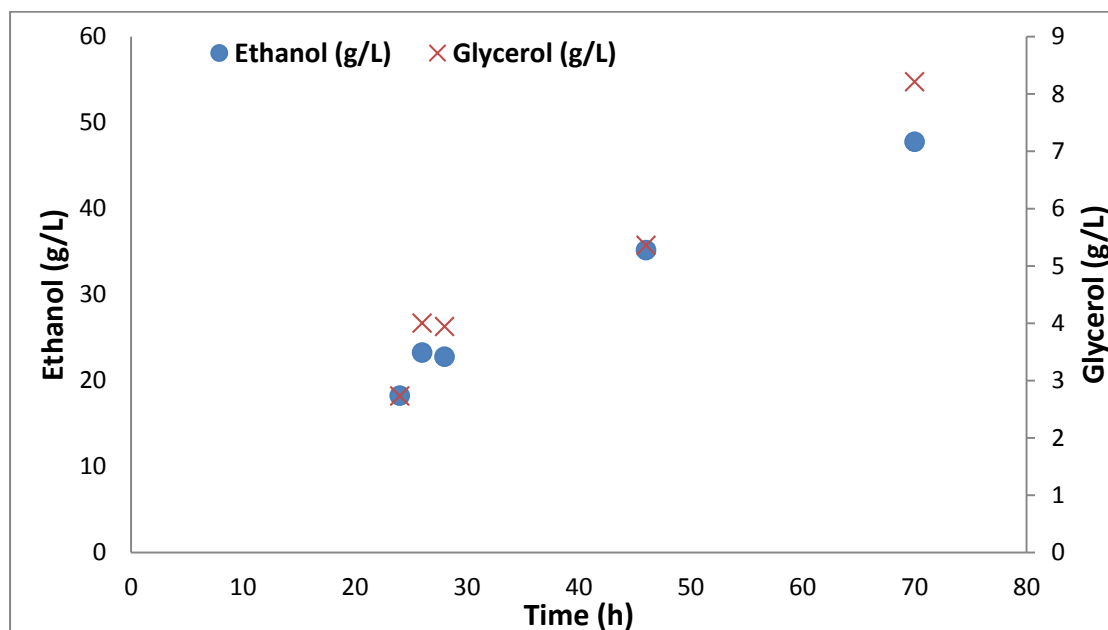


Διάγραμμα 6.1.4.10: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Δ3

Στο παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *S. cerevisiae* Δ3. Φαίνεται πως:

- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος καταναλώνονται πλήρως μέχρι το πέρας του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία με αρκετές όμως διακυμάνσεις. Η μέγιστη ποσότητα καταγράφεται στις 24 ώρες φθάνοντας τα 3,99 g/L.

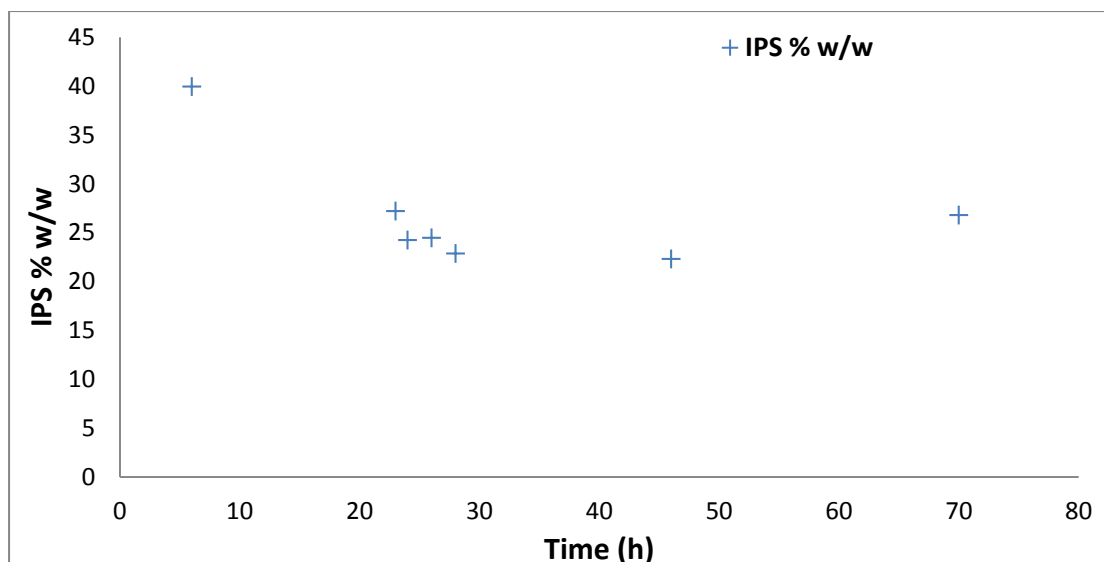


Διάγραμμα 6.1.4.11: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Δ3

Σ' αυτό το διάγραμμα καταγράφεται η παραγωγή **αιθανόλης** καθώς και της **γλυκερόλης** από το στέλεχος Δ3. Στην περίπτωση αυτή διαφοροποιείται λίγο η παραγωγή της αιθανόλης η οποία αυξάνεται σταδιακά μέχρι το πέρας του χρόνου ζύμωσης φθάνοντας στο τελευταίο σημείο στις 70 ώρες να παράγει τη μέγιστη ποσότητα αιθανόλης που ήταν τα 47,79 g/L με απόδοση:

$Y_{EtOH/S} = 0,35 \text{ g EtOH / g Glucose}$.

Η μέγιστη ποσότητα της γλυκερόλης που παράχθηκε είναι 8,21 g/L.

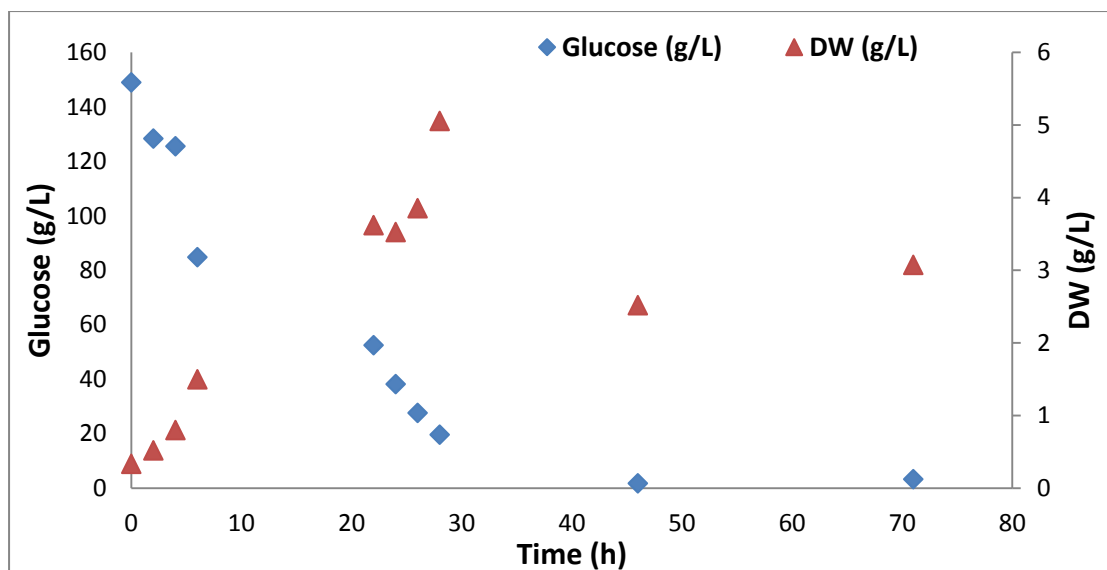


Διάγραμμα 6.1.4.12: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S.cerevisiae* Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη).

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι:

- Στις πρώτες ώρες ο μικροοργανισμός συσσωρεύει τις μεγαλύτερες ποσότητες **ενδοπολυσακχαριτών**. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται κατά τον εμβολιασμό που φθάνει τα 39,96 % w/w. Ακολούθως, παρατηρείται μία συνεχής πτώση στην ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών η οποία σταματάει στις 50~ ώρες και αρχίζουν οι ενδοπολυσακχαρίτες να αυξάνονται καταλήγοντας έτσι στην ολοκλήρωση του φαινομένου να σχηματίζονται 26,80 % w/w ενδοπολυσακχαριτών.

6.1.5 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

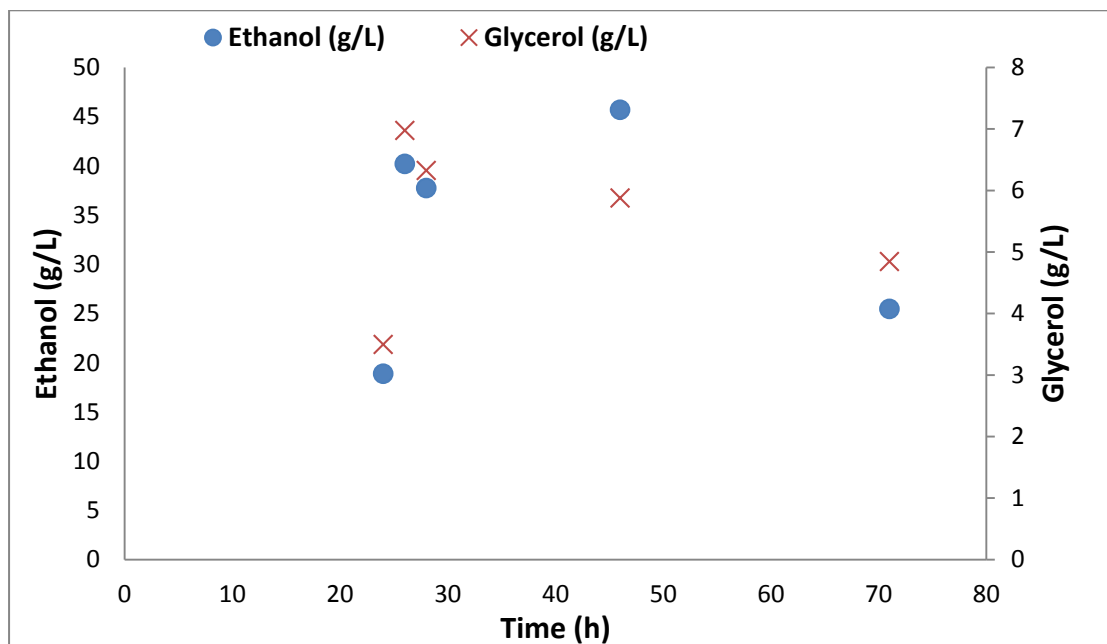


Διάγραμμα 6.1.5.13: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* B1

Στο παρόν διάγραμμα παρουσιάζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *S. cerevisiae* B1. Παρατηρείται πως:

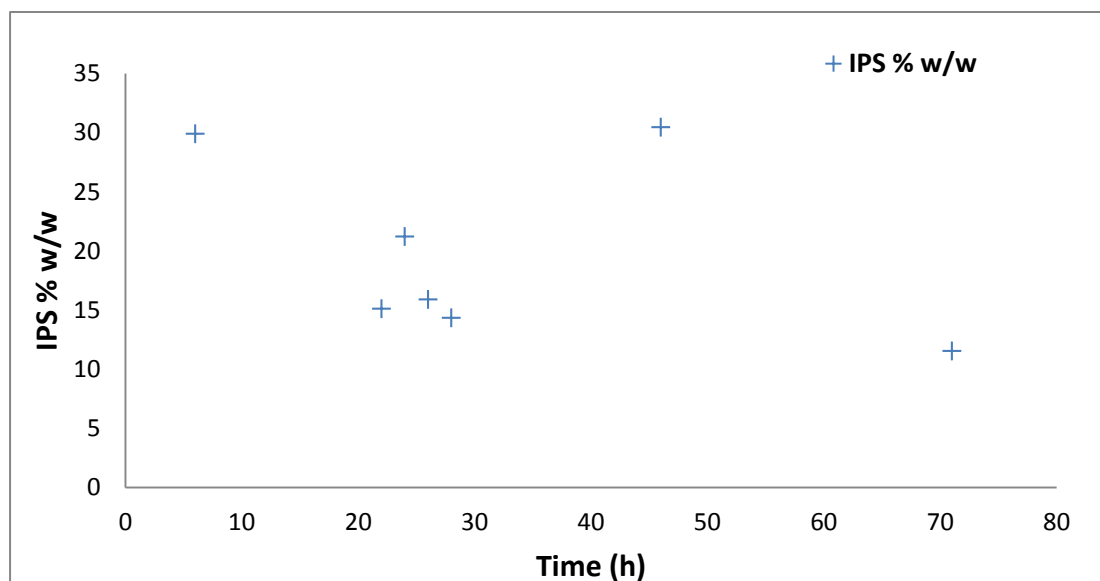
- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος δεν καταναλώνονται πλήρως και ο μ/ος αφήνει αζύμωτα 3,28 g/L σάκχαρα.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει έντονες διακυμάνσεις δίδοντας τη μέγιστη ποσότητα στις 28 ώρες τα 5,06 g/L. Πιθανόν κι εδώ να υπάρχει το φαινόμενο της αυτόλυσης στα τελευταία σημεία.



Διάγραμμα 6.1.5.14: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο B1

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η αιθανόλη εμφανίζει στις 46 ώρες τη μέγιστη ποσότητα η οποία φθάνει τα 45,70 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,31$ g EtOH /g Glucose. Παράλληλα, η μέγιστη ποσότητα γλυκερόλης φθάνει τα 6,97 g/L.



Διάγραμμα 6.1.5.15: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη).

Στο διάγραμμα που καταγράφει την παραγωγή **ενδοπολυσακχαριτών** από το μ/ο παρατηρείται ότι:

- Στο σημείο του εμβολιασμού έχει σχηματιστεί μια αρκετά μεγάλη ποσότητα (29,92% w/w) όμως στην συνέχεια, μετά από αρκετές διακυμάνσεις παίρνει τη μέγιστη ποσότητα για το πείραμα αυτό (30,47 % w/w στις 46 ώρες) ενώ καταλήγει να παράγει τη μικρότερη ποσότητα από τα λοιπά στελέχη στις **αερόβιες** συνθήκες για τα 150 g/L (11,52% w/w).

Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ όλων των στελεχών που αναπτύχθηκαν στα 150 g/L σε αερόβιες συνθήκες:

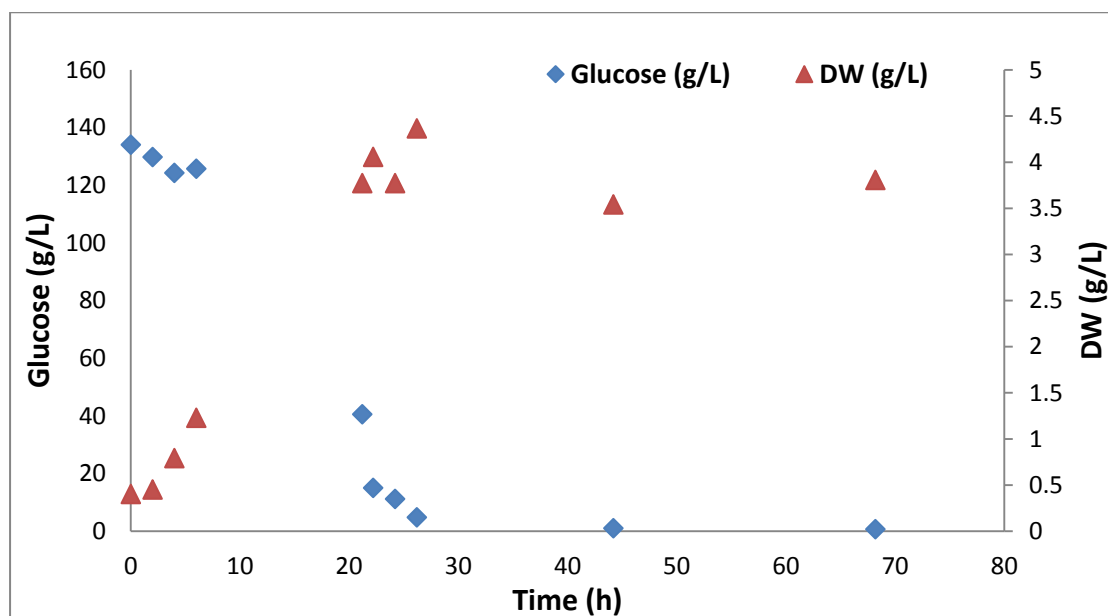
- Το στέλεχος **Θ1** ήταν το καλύτερο από άποψη απόδοσης σε **βιομάζα** 5,8 g/L σε σχέση με όλα τα άλλα, ενώ το στέλεχος **E1A** παρήγαγε τη μικρότερη ποσότητα δίδοντας 3,24 g/L.

- Το στέλεχος **E1A** επέτυχε να δώσει τη μέγιστη απόδοση σε **αιθανόλη** (48,24 g/L) σε 68 ώρες ενώ το μικρότερο ποσοστό αιθανόλης παρήγαγε το **Γ2** (21,73 g/L) στις 28 ώρες. Επίσης, το **Θ1** παρήγαγε και τη μεγαλύτερη ποσότητα σε **γλυκερόλη** απ όλα τα πειράματα (8,49 g/L) αλλά κι από τον αντιδραστήρα.

- Τέλος, τη μεγαλύτερη ποσότητα σε παραγόμενους **ενδοπολυσακχαρίτες** την έδωσε το στέλεχος **Θ1** παράγοντας 52% w/w ενώ αυτό με τη μικρότερη παραγωγή ήταν το **B1** το οποίο παρήγαγε 30,47 % w/w.

6.2. Αναερόβιες Συνθήκες

6.2.1. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

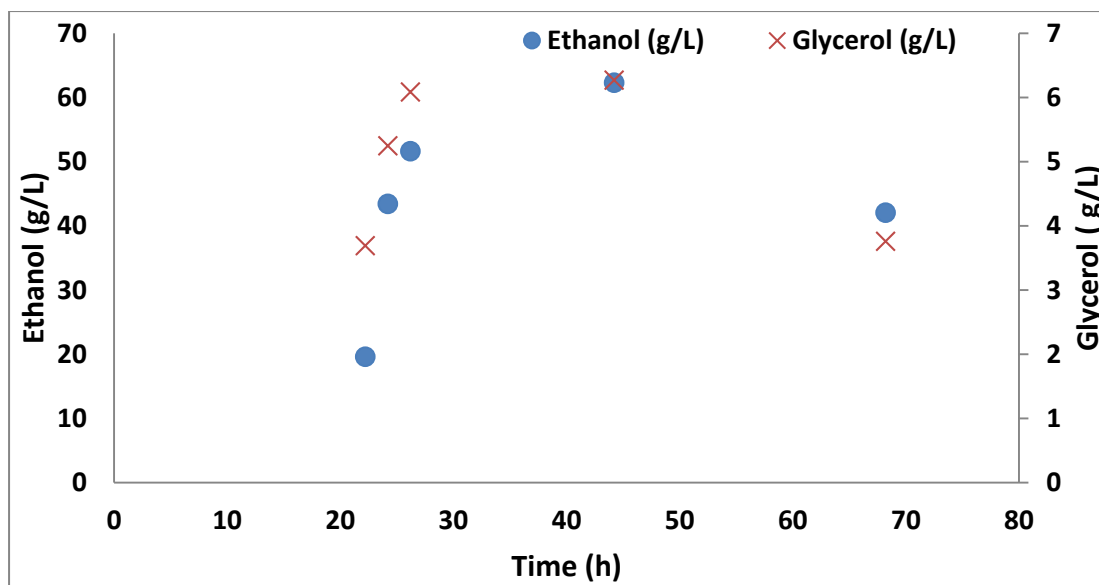


Διάγραμμα 6.2.1.16: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *S. cerevisiae* E1A. Παρατηρείται πως:

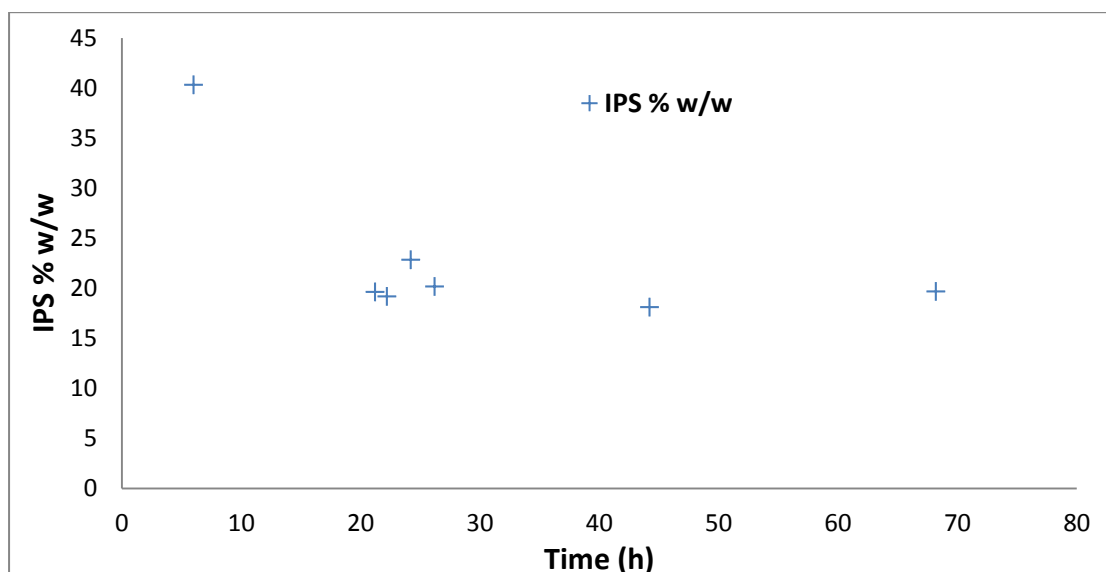
- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος καταναλώνονται πλήρως μέχρι το πέρας του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία. Η μέγιστη ποσότητα καταγράφεται στις 26 ώρες αγγίζοντας τα 4,37 g/L.



Διάγραμμα 6.2.1.17: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο E1A

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η αιθανόλη εμφανίζει στις 44,2 ώρες τη μέγιστη ποσότητα η οποία φθάνει τα 62,31 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,47$ g EtOH /g Glucose. Παράλληλα, η μέγιστη ποσότητα γλυκερόλης φθάνει τα 6,27 g/L .

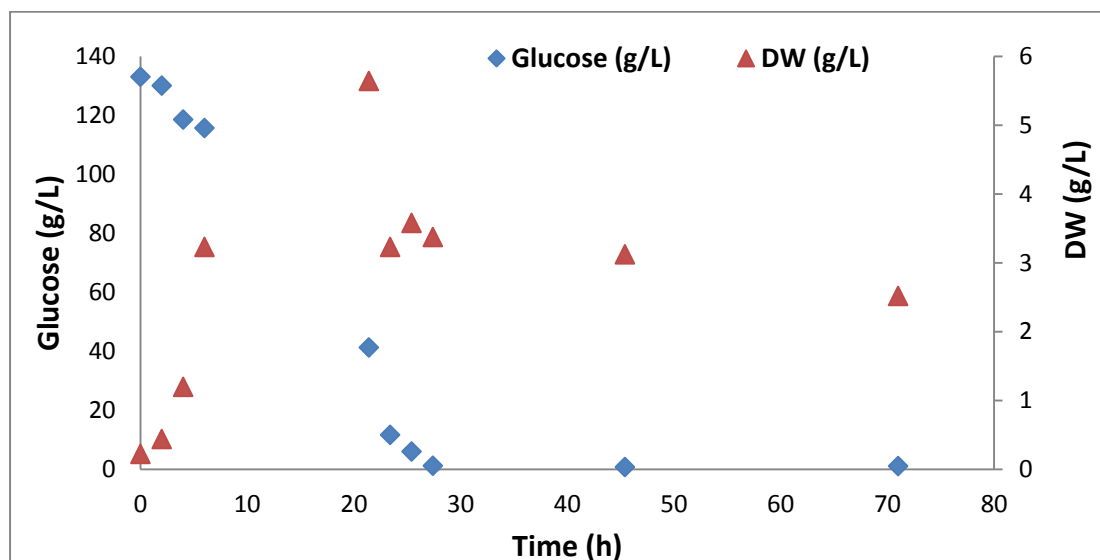


Διάγραμμα 6.2.1.18: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη)

Στο διάγραμμα που αντικατοπτρίζει την παραγωγή **ενδοπολυσακχαριτών** από τον μ/ο παρατηρείται ότι:

Ο μ/ος παράγει τη μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών (40,34% w/w) στην αρχή όμως στην συνέχεια αυτή μειώνεται και καταλήγει να παράγει τη μικρότερη ποσότητα για αυτό το πείραμα η οποία είναι τα 19,69% w/w κατά το τέλος του πειράματος .

6.2.2 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

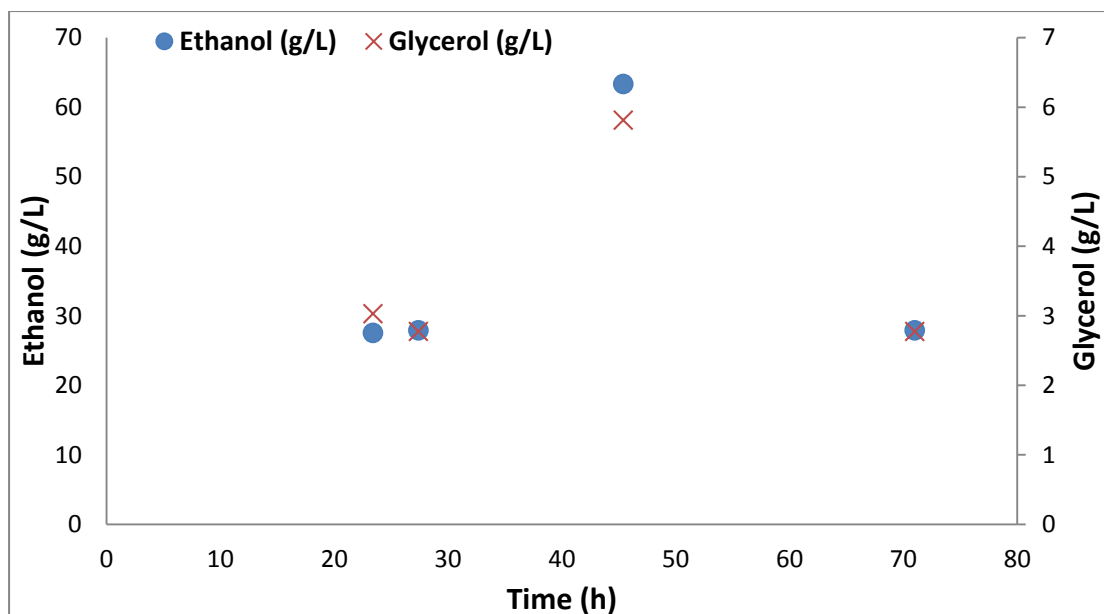


Διάγραμμα 6.2.2.19: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Γ2

Στο παρόν διάγραμμα εμφανίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *S. cerevisiae* Γ2. Παρατηρείται πως:

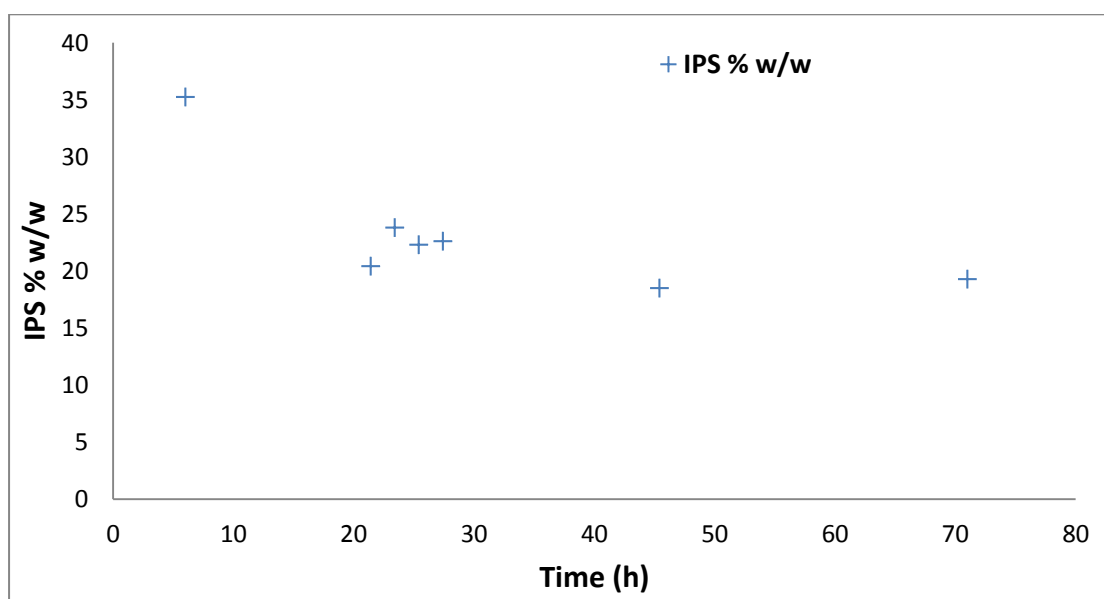
- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος καταναλώνονται πλήρως μέχρι το πέρας του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία και η μέγιστη ποσότητα καταγράφεται στις 21,4 ώρες φθάνοντας τα 5,64 g/L. Ακολουθεί απότομη πτώση και στην συνέχεια η βιομάζα έχει διακυμάνσεις.



Διάγραμμα 6.2.2.20: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Γ2

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, η αιθανόλη εμφανίζει στις 50,4 ώρες τη μέγιστη ποσότητα η οποία φθάνει τα 63,35 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,48$ g EtOH /g Glucose. Παράλληλα, η μέγιστη ποσότητα γλυκερόλης φθάνει τα 5,82 g/L.



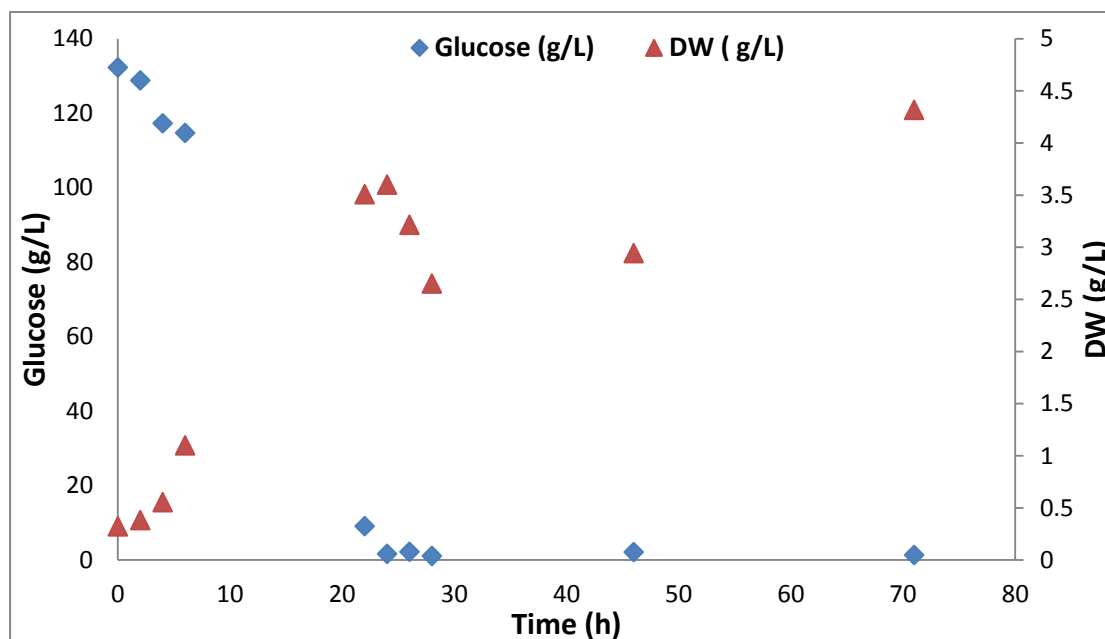
Διάγραμμα 6.2.2.21: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι:

•Στις πρώτες ώρες ο μικροοργανισμός συσσωρεύει τις μεγαλύτερες ποσότητες **ενδοπολυσακχαριτών**. Η μέγιστη τιμή παρατηρείται κατά τις πρώτες

ώρες και φθάνει τα 35,25% w/w. Ακολούθως, παρατηρείται μία συνεχής πτώση στην ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών και το φαινόμενο ολοκληρώνεται με τελική τιμή αυτή των 19,28 % w/w.

6.2.3 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

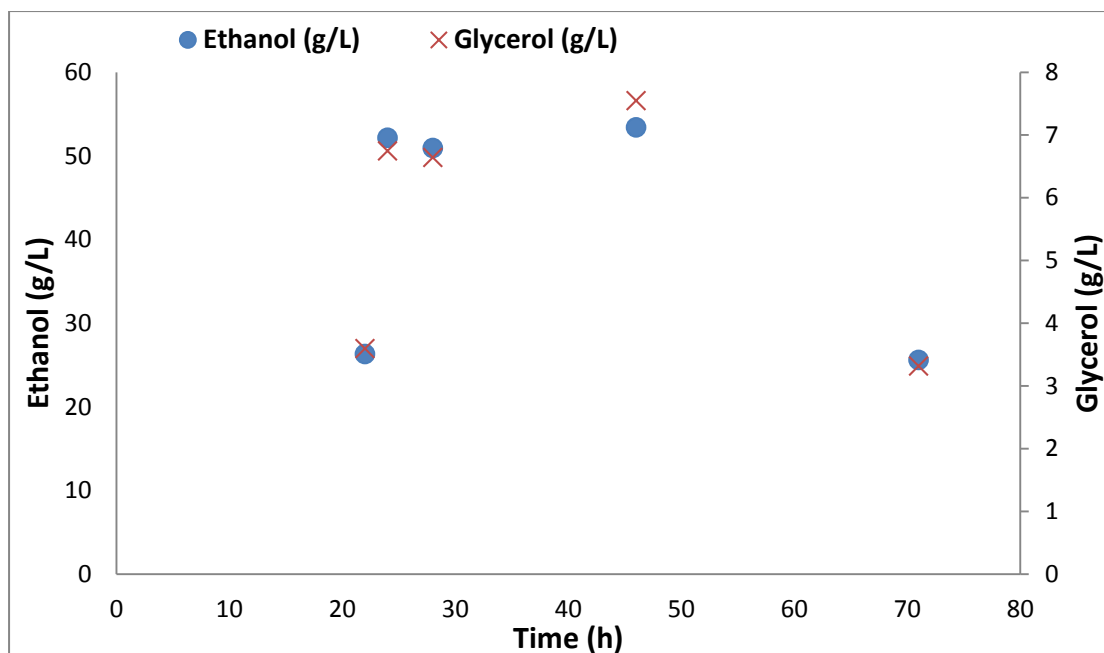


Διάγραμμα 6.2.3.22: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *S. cerevisiae* Θ1. Παρατηρείται πως:

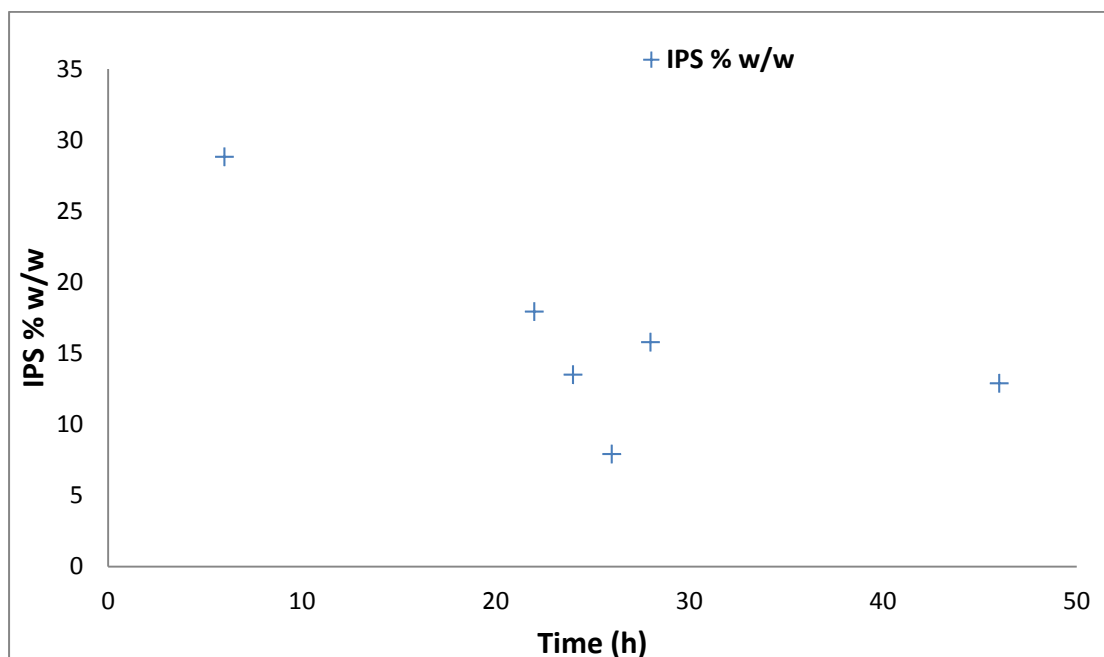
- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος καταναλώνονται πλήρως μέχρι το πέρας του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία με διακυμάνσεις. Η μέγιστη ποσότητα καταγράφεται στις 71 ώρες αγγίζοντας τα 4,32 g/L.



Διάγραμμα 6.2.3.23: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Θ1

Σύμφωνα με το παρόν διάγραμμα, η αιθανόλη εμφανίζει στις 46 ώρες τη μέγιστη ποσότητα η οποία φθάνει τα 53,42 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,41$ g EtOH /g Glucose. Παράλληλα, η μέγιστη ποσότητα γλυκερόλης φθάνει τα 7,55 g/L.

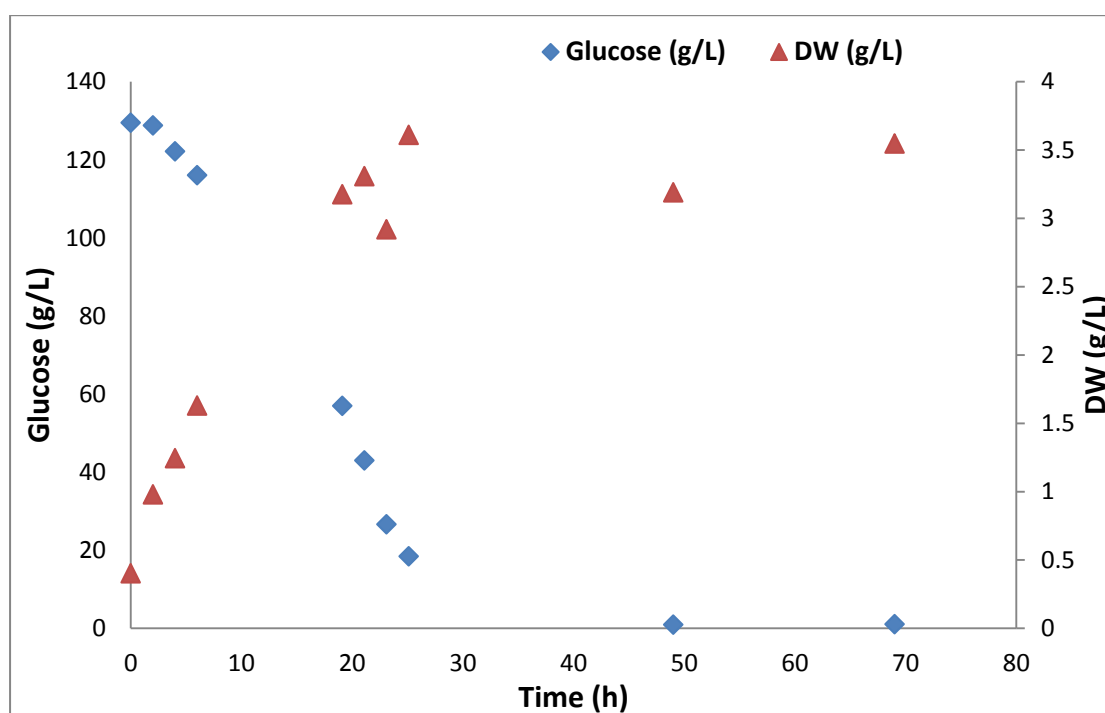


Διάγραμμα 6.2.3.24: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S.cerevisiae* Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη).

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι:

- Η μέγιστη τιμή **πολυσακχαριτών** παρατηρείται κατά τις πρώτες ώρες μετά από τον εμβολιασμό και φθάνει τα 28,83 % w/w. Ακολούθως, παρατηρείται μία πτωτική τάση η οποία συνοδεύεται από αρκετές διακυμάνσεις στην ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών και δίδει σαν τελική τιμή αυτή των 12,90 % w/w.

6.2.4 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

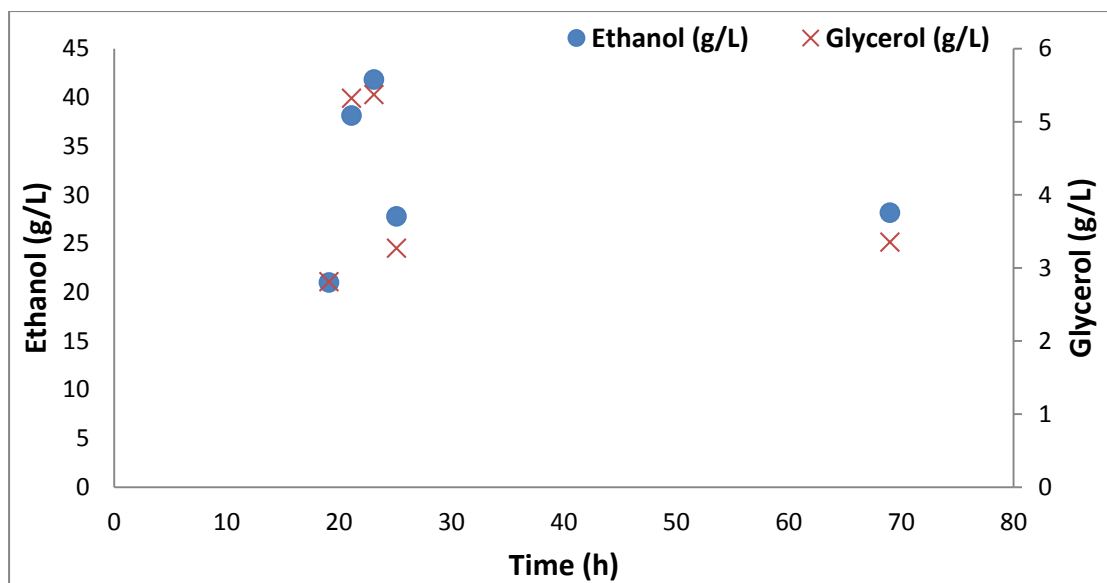


Διάγραμμα 6.2.4.25: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Δ3

Στο παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *S. cerevisiae* Δ3. Παρατηρείται πως:

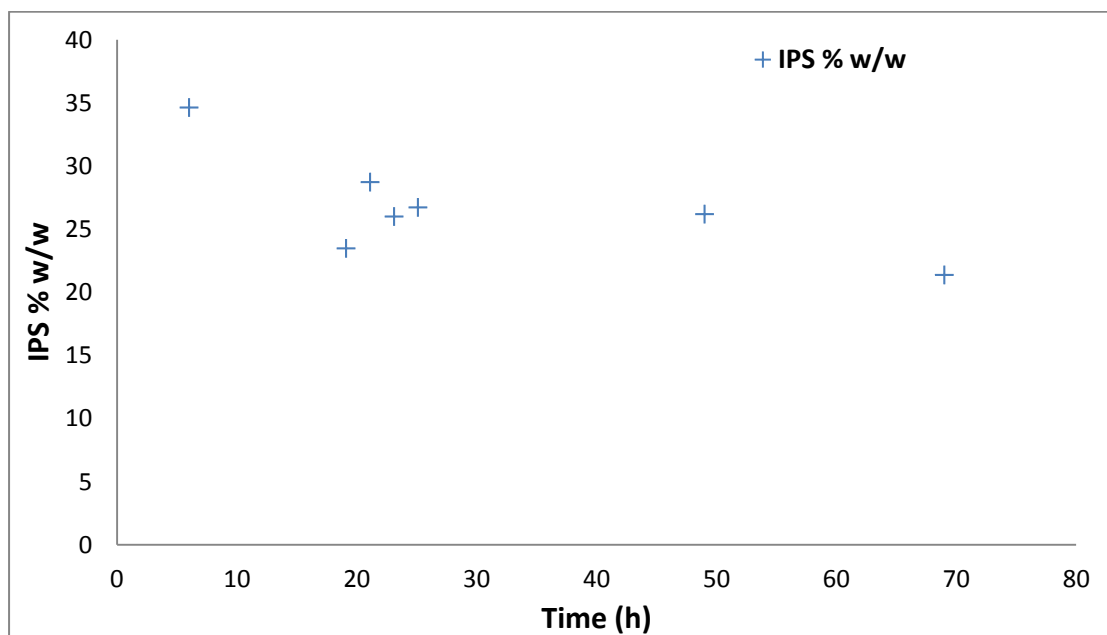
- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος καταναλώνονται πλήρως μέχρι το πέρας του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μια πολύ μεγάλη ανοδική πορεία μετά τον εμβολιασμό ενώ στην συνέχεια έχει μια πτώση στην παραγόμενη ποσότητα (~25 ώρες) μετά την οποία ακολουθεί μια αυξητική τάση μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Η μέγιστη ποσότητα καταγράφεται κατά την 25^η ώρα φθάνοντας τα 3,61 g/L.



Διάγραμμα 6.2.4.26: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο Δ3

Σύμφωνα μ' αυτό το διάγραμμα, η **αιθανόλη** ακολουθεί παρόμοια πορεία με αυτή των προηγούμενων στελεχών και εμφανίζει στις 23,1 ώρες τη μέγιστη ποσότητα η οποία φθάνει τα 41,83 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,41$ g EtOH/g Glucose. Παράλληλα, η μέγιστη ποσότητα γλυκερόλης φθάνει τα 5,37 g/L.

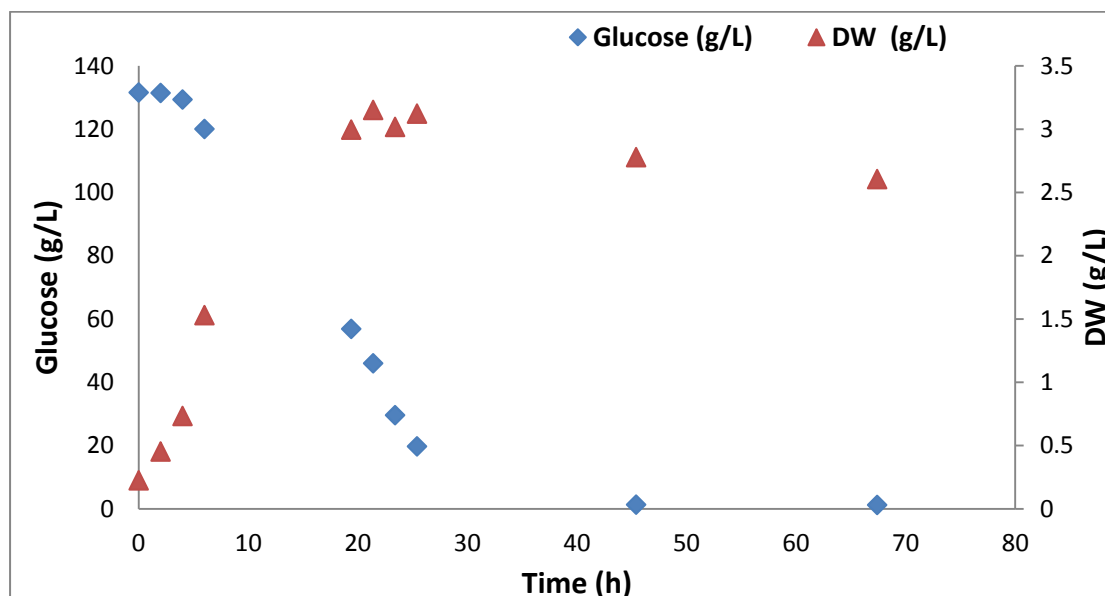


Διάγραμμα 6.2.4.27: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι:

- Η μέγιστη τιμή **πολυσακχαριτών** παρατηρείται κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης και φθάνει τα 34,64 % w/w. Ακολούθως, σημειώνεται μία πτωτική τάση που συνοδεύεται από αρκετές διακυμάνσεις στην ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών η οποία δίδει σαν τελική τιμή αυτή των 21,38 % w/w.

6.2.5 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 150 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

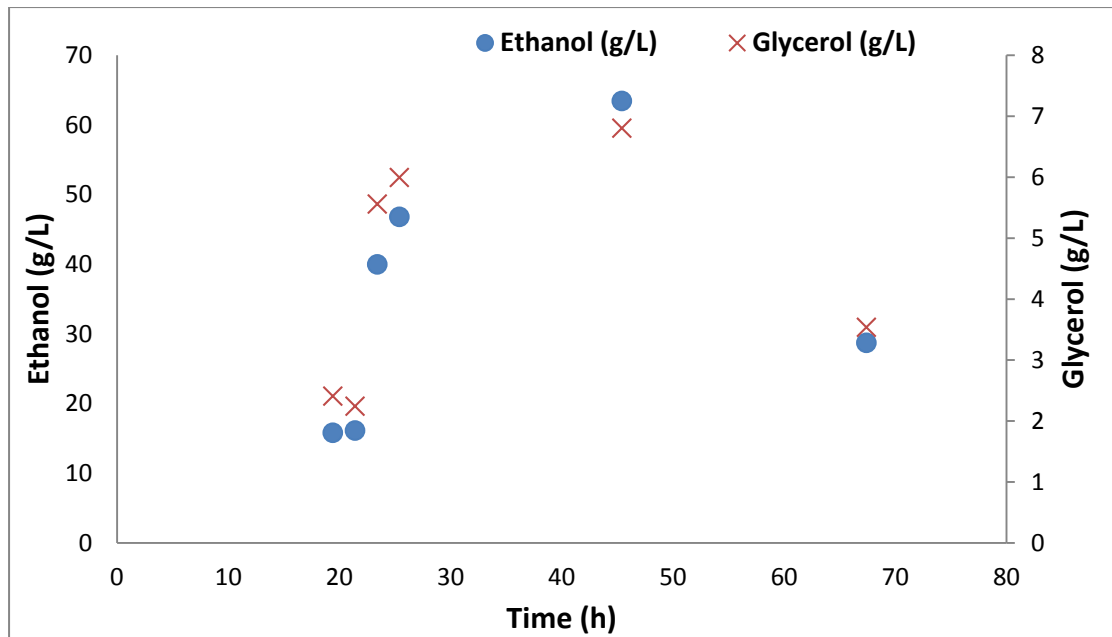


Διάγραμμα 6.2.5.28: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* B1

Στο παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται η πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας σε σύγκριση με την κατανάλωση της γλυκόζης για το στέλεχος *S. cerevisiae* B1. Παρατηρείται πως:

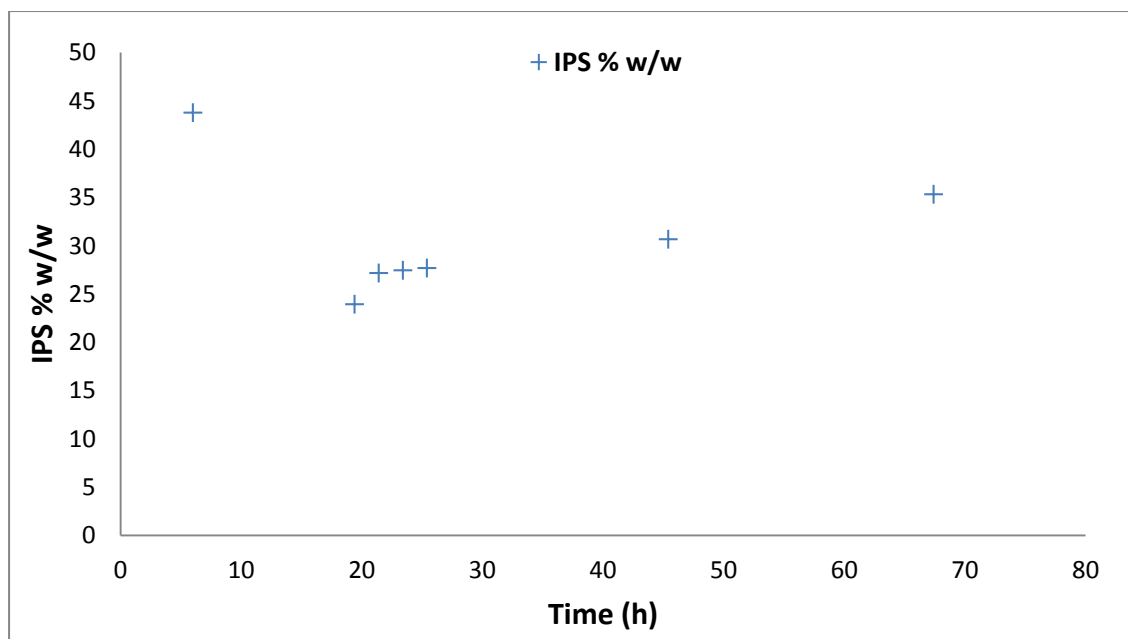
- Τα **σάκχαρα** του υποστρώματος καταναλώνονται πλήρως μέχρι το πέρας του φαινομένου της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μια πολύ μεγάλη αύξηση μετά τον εμβολιασμό ενώ στην συνέχεια παρατηρείται διατήρηση αυτής μέχρι το τέλος. Η μέγιστη ποσότητα καταγράφεται κατά την 21^η ώρα μετά από τον εμβολιασμό φθάνοντας τα 3,15 g/L.



Διάγραμμα 6.2.5.29: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο B1

Εδώ παρατηρείται σταδιακή αύξηση της **αιθανόλης** η οποία καταλήγει στις 45 ώρες να έχει τη μέγιστη τιμή της η οποία είναι τα 63,44 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,49$ g EtOH /g Glucose. Παράλληλα, η μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** φθάνει τα 6,80 g/L.



Διάγραμμα 6.2.5.30: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 150 g/L (Γλυκόζη).

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι:

- Η μέγιστη τιμή παρατηρείται κατά τις πρώτες ώρες μετά από τον εμβολιασμό και φθάνει τα 43,78 % w/w. Ακολούθως, παρατηρείται μία πτωτική τάση ενώ μετά από 24 ώρες σημειώνεται αύξηση μέχρι το τέλος του φαινομένου οπότε προκύπτει σαν τελική τιμή αυτή των 35,33 % w/w.

Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ όλων των στελεχών που αναπτύχθηκαν στα 150 g/L σε αναερόβιες συνθήκες :

- Από όλα τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στις **αναερόβιες** συνθήκες στα 150 g/L σακχάρων φαίνεται ότι το **B1** παράγει τη μέγιστη ποσότητα σε **αιθανόλη** (63,44 g/L) ενώ τη μέγιστη ποσότητα σε **γλυκερόλη** την παράγει το στέλεχος **Θ1** (7,55 g/L). Τέλος την μέγιστη ποσότητα σε βιομάζα την παράγει το στέλεχος Γ2 η οποία φτάνει τα 5,64 g/L.

Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ όλων των στελεχών που αναπτύχθηκαν στα 150 g/L σε αερόβιες αλλά και αναερόβιες συνθήκες:

- Από την σύγκριση των 5 στελεχών στις **αερόβιες αλλά και αναερόβιες** συνθήκες προκύπτει ότι η μέγιστη παραγωγή σε **αιθανόλη** συναντάται στο στέλεχος **B1** στις **αναερόβιες** συνθήκες (63,44 g/L). Η ελάχιστη ποσότητα σε **γλυκερόλη** παράγεται από το στέλεχος **B1** στις **αναερόβιες** συνθήκες (2,24 g/L) γεγονός που υποδηλώνει ότι το στέλεχος αυτό είναι πιο οσμο-ανθεκτικό από τα υπόλοιπα στελέχη καθώς η παραγωγή γλυκερίνης σχετίζεται με την αντισταθμιστική οσμωτική πίεση στα κύτταρα του ζυμομύκητα (**Scanes et al., 1998**) ενώ η μέγιστη ποσότητα σε **γλυκερόλη** παρατηρείται στο **Θ1** (8,49 g /L) στις **αερόβιες** συνθήκες. Τέλος, η μέγιστη ποσότητα σε **βιομάζα** παράγεται στο **Θ1** στις **αερόβιες** συνθήκες (5,8 g/L).

6.3. Συγκριτικά κινητικά αποτελέσματα στις λοιπές συγκεντρώσεις (50, 70, 100 g/L) στις αερόβιες & ανερόβιες συνθήκες (max Ethanol, max Glycerol)

Πίνακας 6.3.11: Αλκοολική ζύμωση των στελεχών του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αερόβιες συνθήκες.

Strain	Time (h)	Fermentation Day	Consumed Sugars (g/L)	Ethanol (g/L)	Y_{EtOH}	Glycerol (g/L)
E1A	23,3	2	47,60	14,91	0,31	1,67
Γ2	30,2	2	50,98	16,10	0,32	1,91
Θ1	26,2	2	47,07	15,8	0,34	2,09
Δ3	22	2	48,24	15,97	0,33	1,83
B1	21,3	2	45,95	13,29	0,29	1,33

- Η μέγιστη παραγωγή σε **αιθανόλη** παρατηρείται στο στέλεχος Γ2 (16,10 g/L), με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,32$ g EtOH /g Glucose) η οποία παράγεται κατά τη δεύτερη μέρα της ζύμωσης και πιο συγκεκριμένα στις 30 ώρες αυτής.

- Το στέλεχος B1 παράγει την λιγότερη ποσότητα **αιθανόλης** (13,29 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,29$ g EtOH /g Glucose) καταναλώνοντας βεβαίως τη μικρότερη ποσότητα σακχάρων (45,95 g/L) σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη.

- Η μέγιστη ποσότητα σε **γλυκερόλη** παρατηρείται στο Θ1 το οποίο παράγει 2,09 g/L ενώ η μικρότερη ποσότητα παράγεται από το B1 (1,33 g/L).

Πίνακας 6.3.12: Αλκοολική ζύμωση των στελεχών του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αναερόβιες συνθήκες

Strain	Time (h)	Fermentation Day	Consumed Sugars (g/L)	Ethanol (g/L)	Y_{EtOH}	Glycerol (g/L)
E1A	47	3	47,91	20,46	0,43	1,74
Γ2	46	3	51,17	21,23	0,41	1,46
Θ1	23,3	2	50,36	16,26	0,32	2,18
Δ3	46	3	51,64	21,52	0,42	2,08
B1	46,3	3	51,62	20,63	0,40	2,19

Από τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι τη **μέγιστη ποσότητα σε αιθανόλη** τη λαμβάνουμε από το στέλεχος Δ3 (21,52 g/L)με απόδοση: $Y_{EtOH/S}=0,42$ g EtOH /g Glucose) στις 46 ώρες (κατά την 3^η μέρα της ζύμωσης) ενώ τη μικρότερη

ποσότητα τη λαμβάνουμε από το στέλεχος Θ1 (16,26 g/L) με απόδοση: $Y_{EtOH/S}=0,32$ g EtOH /g Glucose στις 23 ώρες.

Επιπλέον, παρατηρούμε ότι:

Για να επιτευχθεί η **μέγιστη ποσότητα αιθανόλης** απαιτείται ο μικροοργανισμός Δ3 να καταναλώσει τη **μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων** σε σχέση με όλα τα άλλα (51,64 g/L σακχάρων). Επιπρόσθετα, είναι αξιοσημείωτο ότι:

Το E1A καταναλώνοντας λιγότερα σάκχαρα (47,91 g/L) παράγαγε (20,46 g/L αιθανόλη με απόδοση: $Y_{EtOH/S}=0,43$ g EtOH /g Glucose, η οποία είναι αρκετά κοντά σε σχέση με αυτή της μέγιστης ποσότητας), επίσης έχει μεγαλύτερη απόδοση σε σχέση με αυτή του στελέχους με τη μέγιστη ποσότητα σε αιθανόλη.

Τέλος, η μέγιστη ποσότητα σε **γλυκερόλη** παράγεται από το στέλεχος B1 φθάνοντας τα 2,19 g/L.

Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ όλων των στελεχών που αναπτύχθηκαν στα 50 g/L σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες :

• Οι μέγιστες ποσότητες σε **αιθανόλη** ανά στέλεχος στις **αερόβιες** συνθήκες παρατηρείται ότι λαμβάνονται πιο σύντομα (μια μέρα νωρίτερα).

- Διαπιστώνεται ότι: το στέλεχος Δ3 στην παραγωγή **αιθανόλης** στις αναερόβιες συνθήκες (21,52 g/L) καταλαμβάνει την πρώτη θέση με το Γ2 να ακολουθεί (21,23 g/L). Ενώ στις αερόβιες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο, δηλαδή το Γ2 παράγει τη μεγαλύτερη ποσότητα σε αιθανόλη (16,10 g/L) και το Δ3 παράγει σχεδόν ίση ποσότητα αιθανόλης (15,97 g/L).
- Τέλος, στις αερόβιες συνθήκες το Θ1 παράγει τη μέγιστη ποσότητα σε γλυκερόλη (2,09 g/L), ενώ στις αναερόβιες συνθήκες το B1 παράγει τη μέγιστη ποσότητα σε γλυκερόλη (2,19 g/L). Το στέλεχος Δ3 στις **αερόβιες** συνθήκες παράγει την ελάχιστη ποσότητα σε **γλυκερόλη** (0,18 g/L) σε σχέση με όλα τα στελέχη στα δύο πειράματα. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει πιθανότητα το στέλεχος αυτό να είναι πιο οσμοανθεκτικό από τα άλλα στελέχη καθώς η παραγωγή γλυκερόλης σχετίζεται με την αντισταθμιστική οσμωτική πίεση στα κύτταρα του ζυμομύκητα (Scanes et al., 1998).

Πίνακας 6.3.13: Αλκοολική ζύμωση των στελεχών του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αερόβιες συνθήκες

Strain	Time (h)	Fermentation Day	Consumed Sugars (g/L)	Ethanol (g/L)	Y_{EtOH}	Glycerol (g/L)
E1A	52,3	3	62,40	13,55	0,22	2,14
Γ2	28,3	2	42,81	12,98	0,30	1,44
Θ1	46,2	3	56,60	12,07	0,21	2,21
Δ3	25,45	2	68,76	19,01	0,28	2,74
B1	27,2	2	45,92	15	0,33	2,69

Η πρώτη παρατήρηση που προκύπτει από τον πίνακα είναι ότι:

- Τα σημεία στα οποία επετεύχθηκε η παραγωγή μέγιστης ποσότητας αιθανόλης βρίσκονται στην πλειοψηφία τους στη δεύτερη μέρα της ζύμωσης εκτός από δύο που βρίσκονται στην τρίτη.

-Το στέλεχος με τη μεγαλύτερη παραγόμενη ποσότητα σε **αιθανόλη** απ' αυτή την ομάδα πειραμάτων είναι το στέλεχος **Δ3**, το οποίο παρήγαγε 19,01 g/L με απόδοση: $Y_{EtOH/S}=0,28$ g EtOH /g Glucose.

Παρατηρείται ακόμα ότι: Το **E1A** χρειάζεται σχεδόν διπλάσιο χρόνο προκειμένου να παράξει 13,5 g/L αιθανόλης που αντιστοιχεί σε μια από τις μικρότερες αποδόσεις σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη του πειράματος ($Y_{EtOH/S}=0,22$ g EtOH /g Glucose). Επιπλέον, παρατηρείται ότι τη μέγιστη απόδοση δεν την συναντούμε στο Δ3($Y_{EtOH/S}=0,28$ g EtOH /g Glucose) αλλά στο Γ2($Y_{EtOH/S}=0,30$ g EtOH /g Glucose) και B1 ($Y_{EtOH/S}=0,33$ g EtOH /g Glucose) που έχουν σχηματίσει μικρότερη ποσότητα αιθανόλης σε σχέση με το Δ3.

Επίσης, όπως φαίνεται στο παράρτημα, το στέλεχος Γ2 αφήνει αζύμωτα 13,26 g/L σακχάρων στο υπόστρωμα γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Τέλος, σε αντίθεση με την συγκέντρωση των 50 g/L στις αερόβιες συνθήκες το Δ3 παράγει τη μέγιστη ποσότητα σε γλυκερόλη (2,74 g/L) ενώ τη μικρότερη ποσότητα την παρουσιάζει το E1A (0,59 g/L).

Πίνακας 6.3.14: Αλκοολική ζύμωση στελεχών του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αναερόβιες συνθήκες

Strain	Time (h)	Fermentation Day	Consumed Sugars (g/L)	Ethanol (g/L)	Y_{EtOH}	Glycerol (g/L)
E1A	49	3	71,91	29,69	0,41	2,30
Γ2	45,2	3	71,40	27,52	0,39	1,87
Θ1	48,3	3	72,21	24,23	0,34	2,42
Δ3	46,35	3	71,75	28,68	0,40	2,69
B1	48,20	3	72,13	22,52	0,31	2,07

Στην συγκεκριμένη ομάδα πειραμάτων παρατηρείται ότι:

Όλα τα στελέχη παράγουν τη μέγιστη τιμή τους σε **αιθανόλη** σχεδόν στις ίδιες ώρες και πιο συγκεκριμένα, κατά την τρίτη ημέρα της ζύμωσής τους. Επίσης, παρατηρείται ότι οι μ/οι καταναλώνουν περίπου τις ίδιες ποσότητες σακχάρων από το υπόστρωμά τους προκειμένου να ικανοποιήσουν τις μεταβολικές του ανάγκες. Το στέλεχος E1A είναι τρίτο στην ποσότητα κατανάλωσης σακχάρων αλλά παράγει την μεγαλύτερη ποσότητα σε αιθανόλη απ όλα τα πειράματα που ανήκουν σ αυτή την ομάδα (και πιο συγκεκριμένα, 29,69 g/L αιθανόλης με απόδοση $EtOH/S=0,41$ g EtOH /g Glucose). Όσον αφορά στην παραγωγή σε αιθανόλη παρατηρείται ότι όλα τα στελέχη, εκτός από το B1, παράγουν πολύ κοντινές ποσότητες σε αιθανόλη.

Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ όλων των στελεχών που αναπτύχθηκαν στα 70 g/L σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

Στις **αναερόβιες** συνθήκες παράγεται σχεδόν η διπλάσια ποσότητα σε **αιθανόλη**, ενώ το E1A σημειώνει τη μέγιστη απόδοση σε αιθανόλη φθάνοντας τα 29,69 g/L (στις αναερόβιες συνθήκες) σημειώνοντας ταυτόχρονα και τη μέγιστη απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,41$ g EtOH /g Glucose. Τέλος, η μικρότερη ποσότητα σε **γλυκερόλη** εντοπίζεται στο στέλεχος $\Theta 1$ (αερόβιες συνθήκες) που παράγει 0,81 g/L.

Πίνακας 6.3.15: Αλκοολική ζύμωση των μικροοργανισμών *S. cerevisiae* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αερόβιες συνθήκες

Strain	Time (h)	Fermentation Day	Consumed Sugars (g/L)	Ethanol (g/L)	Y_{EtOH}	Glycerol g/L)
E1A	46	3	99,68	32,97	0,33	5,87
$\Gamma 2$	28	2	56,79	17,38	0,31	3,41
$\Theta 1$	70	4	82,74	27,24	0,33	6,16
$\Delta 3$	28	2	87,77	32,51	0,37	6,65
B1	40,2	3	96,37	31,54	0,33	6,63

Παρατηρείται ότι: Τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στις συγκεκριμένες συνθήκες εμφανίζουν διαφοροποιήσεις ως προς το χρονικό διάστημα παραγωγής αιθανόλης καθώς και στις μέρες αλλά και στις ώρες. Πιο συγκεκριμένα, ο μ/ος E1A επιτυγχάνει τη μέγιστη τιμή της αιθανόλης (32,97 g/L) σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, αντιθέτως όμως, στην απόδοση σε αιθανόλη ανά g υποστρώματος λαμβάνει τη δεύτερη θέση καθώς την πρώτη θέση έχει το στέλεχος $\Delta 3$ με $Y_{EtOH/S}=0,37$ g EtOH /g Glucose.

Το στέλεχος E1A καταναλώνει τη μέγιστη ποσότητα σε σάκχαρα (99,68 g/L) από το υπόστρωμα ενώ το $\Delta 3$ καταναλώνοντας πολύ λιγότερα σάκχαρα (87,77 g/L) καταφέρνει να δημιουργεί μια σχεδόν όμοια παραγωγή σε αιθανόλη (32,51 g/L).

Ακόμα ένα αξιοσημείωτο εύρημα είναι ότι: το στέλεχος $\Theta 1$ αφήνει στο τελευταίο σημείο αζύμωτα 12,87 g/L σακχάρων ενώ το $\Gamma 2$ αφήνει 41,61 g/L αζύμωτων σακχάρων γεγονός που καταδεικνύει ότι υπάρχει παρεμπόδιση από το υπόστρωμα ανάπτυξης. Τέλος, τη μέγιστη παραγωγή σε **γλυκερόλη** τη δίδει το στέλεχος $\Delta 3$ (6, 65 g/L), ενώ το $\Gamma 2$ παράγει (3,41 g/L).

Πίνακας 6.3.16: Αλκοολική ζύμωση των μικροοργανισμών *S. cerevisiae* σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες σε αναερόβιες συνθήκες

Strain	Time (h)	Fermentation Day	Consumed Sugars (g/L)	Ethanol (g/L)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
E1A	46	3	94,54	46	0,49	4,3
Γ2	46,2	3	77,14	38	0,49	2,2
Θ1	48	3	102,05	48	0,47	5,91
Δ3	46,3	3	102,50	50	0,49	6,58
B1	21,30	2	64,58	30,94	0,48	6,87

Παρατηρείται ότι: Σ' αυτές τις συνθήκες σχεδόν όλα τα στελέχη σχηματίζουν τη μέγιστη παραγωγή σε αιθανόλη κατά την τρίτη ημέρα καθώς και χρονικά πλησιέστερα, εκτός από το στέλεχος B1, που παράγει τη μέγιστη για αυτό αιθανόλη κατά τη δεύτερη μέρα.

Το Δ3 επιτυγχάνει την παραγωγή της μέγιστης ποσότητας σε αιθανόλη η οποία είναι τα 50 g/L EtOH με απόδοση: $Y_{EtOH/S}=0,49$ g EtOH /g Glucose. Όλα τα στελέχη χρειάστηκαν περίπου τις ίδιες ώρες αλλά και μέρες για την παραγωγή της μέγιστης ποσότητας σε αιθανόλη εκτός από το B1 το οποίο παρήγαγε την μέγιστη ποσότητα αιθανόλης για αυτό στις 2 μέρες και στις μισές ώρες από τα άλλα. Ακόμα, το στέλεχος Δ3 που, όπως προαναφέρθηκε παρήγαγε τη μέγιστη ποσότητα σε αιθανόλη, κατανάλωσε τη μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων από το υπόστρωμα σε σχέση με τα άλλα, ενώ το στέλεχος που κατάφερε να παράξει παραπλήσια απόδοση αιθανόλης ως προς τα καταναλωθέντα σάκχαρα είναι το B1 (καταναλώνοντας 64,58 g/L σακχάρων από το υπόστρωμα).

Τέλος, τη μέγιστη ποσότητα σε γλυκερόλη την παράγει το στέλεχος B1 που φθάνει τα 6,87 g/L ενώ την μικρότερη το στέλεχος Θ1 (2,2 g/L) .

Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ όλων των στελεχών που αναπτύχθηκαν στα 100 g/L σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

Σε όλα τα πειράματα που γίνονται στις **αερόβιες** συνθήκες παράγεται λιγότερη ποσότητα σε **αιθανόλη** αλλά και σε απόδοση ($Y_{EtOH/g}$ Glucose). Αντίθετα, στις **αερόβιες** συνθήκες παράγεται μεγαλύτερες ποσότητες σε **γλυκερόλη** σε σχέση με τις αναερόβιες.

Τα φαινόμενα που αφορούν στην ανάπτυξη της βιομάζας, γλυκερόλης, ενδοπολυσακχαριτών καθώς και στην παραγωγή κυτταρικών τοιχωμάτων-πολυσακχαριτών (σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες) θα μπορούσαν να αποδοθούν στους εξής λόγους :

Οι **ζύμες** και πιο συγκεκριμένα ο *S. cerevisiae* τις περισσότερες φορές γίνονται η κυρίαρχη ομάδα στα υποστρώματα με ελεύθερα διαθέσιμους μόνο και ολιγοσακχαρίτες. Τα χαρακτηριστικά που τον αναδεικνύουν << νικητή>> σε όλες τις προσπάθειες επικράτησης στα υποστρώματα που αναπτύσσεται ανταγωνισμός με

άλλους μικροοργανισμούς είναι η γρήγορη κατανάλωση της ζάχαρης, η παραγωγή καθώς και η ανοχή στην αιθανόλη καθώς και η ικανότητα πολλαπλασιασμού σε αναερόβιες συνθήκες (Piskur et al., 2006). Η στρατηγική make-accumulate-consume (δηλαδή δημιουργία- συσσώρευση- κατανάλωση) αναφέρεται στο ότι κατά τη ζύμωση (είτε αερόβια είτε αναερόβια), η ζύμη ανακυκλώνει το NADH κατά τη μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη. Εάν στην συνέχεια υπάρχει οξυγόνο στο περιβάλλον, η συσσωρευμένη αιθανόλη μετατρέπεται σε ακεταλδεΐδη. Η μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη καταλύεται από την αφυδρογονάση της αλκοόλης (Adh), η οποία έχει τη δυνατότητα κατ' αρχήν να καταλύσει την αντίδραση και στις δυο κατευθύνσεις (δηλαδή πιο συγκεκριμένα, ακεταλδευδη-αιθανόλη καθώς και αιθανόλη-ακεταλδεΐδη), βέβαια με διαφορετικές αποδόσεις. Στον *S. cerevisiae*, η κυτταροπλασματική δραστηριότητα Adh κωδικοποιείται από δυο γονίδια που προέκυψαν από ένα γεγονός γενετικής αναπαραγωγής, την Adh1 και την Adh2 που εκφράζεται μόνο στις περιπτώσεις που μειώνεται η εσωτερική συγκέντρωση σακχάρου (Piskur et al., 2006). Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι ορισμένα στελέχη σε περιπτώσεις που υπάρχει οξυγόνο στο περιβάλλον ανάπτυξής τους εμφανίζουν τη δυνατότητα να παρουσιάζουν φαινόμενα διαύξεσης ή διφασικής ανάπτυξης. Δεδομένου ότι μεταβολίζουν το διαθέσιμο σάκχαρο με ζύμωση, δημιουργείται βιομάζα και μετά από την εξάντληση του σακχάρου από το μέσο ανάπτυξης η αιθανόλη μπορεί να οξειδωθεί (επανακαταναλωθεί) από το μικροοργανισμό προκειμένου να δημιουργήσει νέα κύτταρα. Όταν η αιθανόλη είναι διαθέσιμη αλλά δεν υπάρχουν σάκχαρα στο μέσο και η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου είναι πάνω από ένα κρίσιμο επίπεδο, τότε η αιθανόλη που έχει παραχθεί στο παρελθόν αποτελεί τη μοναδική πηγή άνθρακα και χρησιμεύει ως υπόστρωμα για περαιτέρω ανάπτυξη της ζύμης (Sarris and Paranikolaou, 2016).

Η **γλυκερόλη** εμπλέκεται στο μεταβολισμό του άνθρακα του *S. cerevisiae* με διαφορετικούς τρόπους. Αφενός, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοναδική πηγή άνθρακα υπό αερόβιες συνθήκες. Από την άλλη πλευρά, η γλυκερόλη είναι ένα υποπροϊόν που δημιουργείται όταν η γλυκόζη ή άλλα εύκολα ζυμώσιμα σάκχαρα μετατρέπονται σε αιθανόλη.

Όσον αφορά στην ικανότητα παραγωγής **ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών** υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές πηγές οι οποίες θεωρούν ότι η εξάντληση του υποστρώματος της καλλιέργειας σε άζωτο δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για την αποθήκευση των συγκεκριμένων ενώσεων εξαιτίας της αναγκαστικής διάσπασης της AMP, προκειμένου να εξασφαλιστούν οι απαιτήσεις από τα κύτταρα σε άζωτο. Το κύτταρο EMP ενεργοποιεί αλλοστερικά το ενζυμο 6- φώσφοροφρουκτοκινάση (6 PFK) και έτσι η ελάττωση της συγκέντρωσης AMP οδηγεί στην αναστολή της δράσης της 6 PFK (Galiotou- Panayotou et al., 1998; Ratledge and Wynn, 2002; Paranikolaou and Aggelis, 2011a). Σύμφωνα με τον παραπάνω μηχανισμό, πιθανόν να συσσωρεύονται οι ενδοπολυσακχαρίτες.

Στην παρούσα μελέτη οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς εμφάνισαν ικανότητα σύνθεσης αρκετά μεγάλης ποσότητας κατά τα πρώτα στάδια της αύξησης τους υπό συνθήκες παρουσίας αζώτου. Γεγονός που είναι αντίθετο με την βιβλιογραφία (Ratledge, 1988; Paranikolaou and Aggelis, 2011a) καθώς υπάρχει η θεωρία ότι οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της στάσιμης φάσης ανάπτυξης των μικροοργανισμών και με περιοριστικές συνθήκες στο άζωτο. Σε αντίθεση με αυτή την άποψη, άλλες μελέτες

αποδεικνύουν την συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης και με παρουσία του αζώτου στο υπόστρωμα της ζύμωσης. Γεγονός το οποίο έχουν παρατηρήσει και οι Filippousi et al., 2019; Diamantopoulou et al., 2014; Diamantopoulou et al., 2016; Daskalaki et al., 2019; Papanikolaou and Aggelis, 2011 οι οποίοι διαπίστωσαν ότι στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των μικροοργανισμών τους (0-24 ώρες μετά από τον εμβολιασμό) και παρόλο που υπήρχε άζωτο στο μέσο ανάπτυξης, είχαν συσσωρευτεί αξιόλογες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών (IPS>25 % w/w) στα δοκιμασμένα στελέχη. Επίσης, παρόμοια συμπεριφορά είχε παρατηρηθεί από το *Rhodotorula sp. LMBF Y49* καθώς και από άλλα είδη ζύμης όπως το *Cryptococcus curvatus* που δείχνει ότι η θεωρία βάσει της οποίας οι ενδοπολυσακχαρίτες, χρειάζονται περιορισμό αζώτου για να συσσωρευτούν σε σημαντικές ποσότητες εντός των κυττάρων ζύμης φαίνεται ελλιπής (Diamantopoulou et al., 2020; Filippousi et al., 2019).

Στις **ζύμες**, το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει σταθερότητα και προστασία στα κύτταρα και η δομή του περιλαμβάνει πολυσακχαρίτες (κυρίως β-γλυκάνες για ακαμψία), πρωτεΐνες (κυρίως μαννοπρωτεΐνες στο εξώτατο στρώμα), μαζί με μερικά λιπίδια, χιτίνη και ανόργανο φωσφορικό υλικό (Walker and White, 2017). Οι μαννοπρωτεΐνες βρίσκονται στο εξώτατο στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος *S. cerevisiae*. Συνδέονται με αλυσίδες β-1,6 γλυκάνης στο εσωτερικό, ενώδες στρώμα που σχηματίζεται από αλυσίδες β-1,3 γλυκάνης και χιτίνη. Αυτά τα μακρομόρια είναι πολυμερή με υψηλή περιεκτικότητα σε μαννόζη που υπάρχουν ως ομοιοπολικά σύμπλοκα με πρωτεΐνες και απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό μέσο κατά την διάρκεια αυτόλυσης των κυττάρων των ζυμών. Η ποσότητα που απελευθερώνεται εξαρτάται από το είδος της ζύμης καθώς και τις συνθήκες της ζύμωσης (Giovanì and Rosi et al., 2012). Ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae* αναφέρεται μερικές φορές ως προαιρετικά αναερόβια ζύμη, δεν μπορεί στην πραγματικότητα να αναπτυχθεί σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, εκτός αν του παρέχονται ορισμένα λιπαρά οξέα και στερόλες (τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν χωρίς μοριακό οξυγόνο). Στην πραγματικότητα, πιστεύεται ότι υπάρχουν πολύ λίγα είδη ζύμης που είναι υποχρεωτικά αναερόβια. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (πχ. Ελαϊκό οξύ) και οι στερόλες (πχ. Εργοστερόλη) είναι σημαντικά συστατικά των κυττάρων ζύμης και απαιτείται οξυγόνο για την σύνθεση τους καθώς και για τη διατήρηση της λειτουργίας αλλά και της ακεραιότητας της μεμβράνης και της αντοχής στο στρες (Walker and White, 2017). Τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες είχαν υψηλότερο ξηρό βάρος και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη απ αυτά που αναπτύχθηκαν αερόβια, αλλά ίδια συνολική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Η περιεκτικότητα σε τρεαλόζη και σε μικρότερο βαθμό, η συνολική περιεκτικότητα σε γλυκογόνο αυξήθηκε, με μείωση των δομικών πολυσακχαριτών γλυκάνης και μαννάνης. Οι υδατάνθρακες γλυκογόνο και τρεαλόζη αποτελούν το 40% του ξηρού βάρους των κυττάρων που αναπτύχθηκαν αναερόβια χρησιμοποιώντας την γλυκόζη ως πηγή άνθρακα αλλά μόνο το 10% των αντίστοιχα αερόβια αναπτυγμένων κυττάρων (Wilson and Leod, 1976).

7.ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΡΑΓΚΟΣΥΚΟΥ

Η σύνθεση των κλαδωδίων καθώς και των υπόλοιπων μερών του φυτού ποικίλλει ανάλογα με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες που επικρατούν στον τόπο

καλλιέργειας καθώς κι από την εποχή αλλά και την ηλικία του φυτού (Stintzing and Carle, 2005; Batista et al., 2003; Retamal et al., 1987; Rodriguez and Cantwell, 1988).

Ως εκ τούτου, παρατηρούνται σημαντικές παραλλαγές στα δημοσιευμένα δεδομένα. Επομένως, το αντίστοιχο περιεχόμενο σε θρεπτικά συστατικά διαφέρει μεταξύ των ειδών και των ποικιλιών και δεν πρέπει να λαμβάνεται ως απόλυτη τιμή.

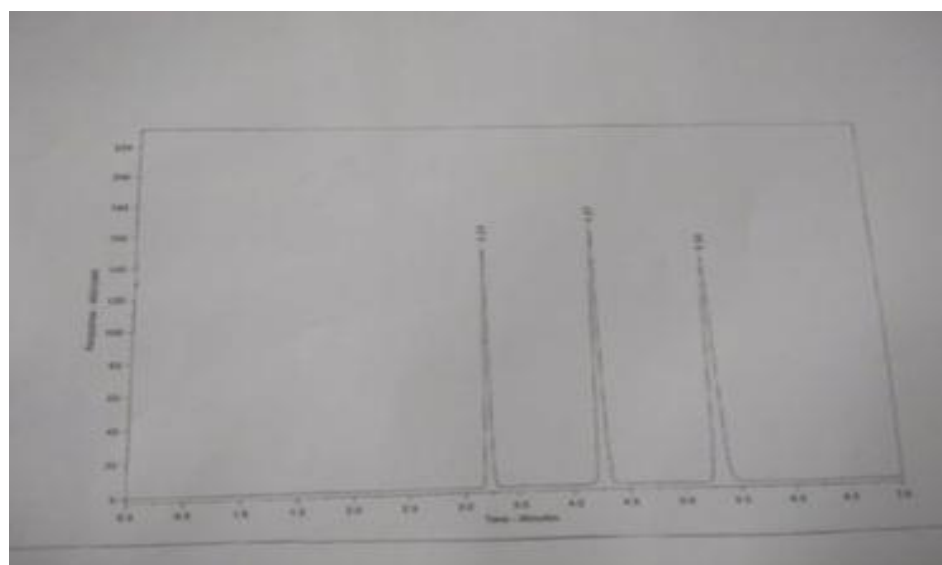
Στα δείγματα του πειράματος και σε διάφορα μέρη του φυτού μετρήθηκαν το pH και βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά (επί νωπού) όπως: σάκχαρα (ολικά κι ανάλυση με HPLC, πρωτεΐνες, υγρασία, ινώδεις και τέφρα (πίνακας 7.17, 7.18, 7.19, 7.20).

α. Προφίλ σακχάρων σε χυμό κλαδώδιου με χρήση HPLC

Αρχικά το κλαδώδιο πλύθηκε, τεμαχίστηκε, λήφθηκαν κομμάτια από πολλά διαφορετικά σημεία αυτού και ακολούθως έγινε ομογενοποίηση με μίξερ. Ακολούθησε διάλυση με μίγμα ακετονιτρίλιο/νερό και μετά την εκχύλιση έγινε ανάλυση σακχάρων με τη μέθοδο HPLC (διάγραμμα 7.33).

Πίνακας 7.17: Σύσταση σε σάκχαρα χυμού κλαδώδιου φραγκοσυκιάς (% w/FM)

Παράμετροι Ανάλυσης	Αποτέλεσμα	Όριο ανίχνευσης
Φρουκτόζη	0.4 % (w/w)	0.1 HPLC-RI
Γλυκόζη	0.5 % (w/w)	0.1 HPLC-RI
Σακχαρόζη	0.1 % (w/w)	0.1 HPLC-RI
Μαννόζη	<DL % (w/w)	0.1 HPLC-RI
Λακτοζη	<DL % (w/w)	0.1 HPLC-RI
Μαλτόζη	<DL % (w/w)	0.1 HPLC-RI



Διάγραμμα 7.31: Χρωματογράφημα ανάλυσης σακχάρων με HPLC χυμού κλαδώδιου

β. Ινώδεις ουσίες (%), Τέφρα (%), Πρωτεΐνες (%), Υγρασία (%) στα διάφορα μέρη του φυτού της φραγκοσυκιάς

Πίνακας 7.18: (%) Μ.Ο Πρωτεϊνών, Τέφρας, Ινωδών (επί ξηρού) & υγρασίας

Δείγμα	Πρωτεΐνες	Υγρασία	Τέφρα	Ινώδεις	pH
Μόνο φλούδα (κλαδωδίου)	3,77 ± 0,23	79,59 ± 0,45	33,99 ± 2,22	13,51 ± 0,38	6,29
Μόνο σάρκα (κλαδωδίου)	2,46 ± 0,07	77,25 ± 1,75	37,90 ± 1,35	11,23 ± 0,39	-
Κλαδώδιο (φλούδα + σάρκα)	3,01 ± 0,11	79,59 ± 0,80	36,86 ± 0,40	16,52 ± 0,89	5,37
Φρούτο (φλούδα + σάρκα φρούτου)	4,32 ± 0,08	-	-	-	5,87

Στον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι τη μέγιστη ποσότητα σε πρωτεΐνες δίδει ο καρπός (φρούτο) του φραγκόσυκου που είναι απόλυτα φυσιολογικό. Επίσης, παρατηρείται ότι δεύτερη σε σειρά με τη μεγαλύτερη ποσότητα σε πρωτεΐνες ανέρχεται η φλούδα που περιβάλλει το κλαδώδιο.

Η τέφρα εμφανίζει κατά πολύ υψηλότερες τιμές από τη βιβλιογραφία (Saenz & Sepulveda, 2001; Santos et al., 2015). Στον πίνακα περιγράφονται επίσης τα αποτελέσματα των ινωδών που αφορούν στα διαφορετικά κομμάτια από τα οποία αποτελείται το κλαδώδιο της φραγκοσυκιάς (φλούδα –επιδερμίδα καθώς και το εσωτερικό κομμάτι του κλαδωδίου).

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η φλούδα του κλαδωδίου έχει τη μεγαλύτερη ποσότητα σε ινώδεις ουσίες ενώ όλο το κλαδώδιο έχει 16,52 % ινώδεις

Η υγρασία που μετρήθηκε σε αυτά τα κομμάτια του φυτού είναι αρκετά υψηλή και συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Γάτσιος, 2018).

7.1. Διάφοροι χειρισμοί στο φραγκόσυκο

Τα κλαδώδια και οι καρποί της φραγκοσυκιάς υποβλήθηκαν σε διάφορους χειρισμούς που περιγράφηκαν διεξοδικά στο πρώτο μέρος της διατριβής και στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

7.1.1. Αποτελέσματα ανάλυσης σακχάρων

Πίνακας 7.1.1.19.: Μέτρηση σακχάρων μετά από διάφορες επεξεργασίες

Δείγμα	Τύπος επεξεργασίας	Μ.Ο Αρχικών Σακχάρων (g/g Ξ.Ο)	Μ.Ο Τελικών Σακχάρων (g/L)	Μ.Ο Τελικών Σακχάρων (g/g Ξ.Ο)	% Αύξηση Σακχάρων (g ανα 100 g Ξ.Ο)
Αποξηραμένο Φρούτο	Ανάδευση με Θέρμανση (1 ώρα, 20 g /L, 90 °C)	0,557	8,62 ± 0,74	0,431	-22,62
Αποξηραμένη Φλούδα	Ανάδευση με Θέρμανση (1 ώρα, 20 g/ L, 90 °C)	0,3725	10,25±0,46	0,5125	37,58
Αποξηραμένο κλαδώδιο	Ανάδευση με Θέρμανση (1 ώρα, 20 g/ L, 90 °C)	0,0965	2,39±0,65	0,1195	23,83
Αποξηραμένο Κλαδώδιο	Υδρόλυση (2,5 g/L)	0,0965	0,76 ± 0,012	0,304	215,03
Αποξηραμένο Φρούτο	Υδρόλυση (2,5 g/L)	0,557	1,22 ± 0,008	0,488	-12,38
Αποξηραμένη Φλούδα	Υδρόλυση (2,5 g/L)	0,3725	1,39 ± 0,0065	0,556	49,26

Γίνεται εύκολα κατανοητό από τον παραπάνω πίνακα ότι οι επεξεργασίες που περιείχαν σαν δείγμα το αποξηραμένο φρούτο δεν συνετέλεσαν σε αύξηση στην ποσότητα των παραγόμενων σακχάρων. Αυτή η αρνητική τιμή που προκύπτει πιθανόν εμφανίζεται λόγω της καταστροφής των σακχάρων κατά την θερμική επεξεργασία στους 90°C για μια ώρα.

Οι επεξεργασίες που αφορούν στη χρήση της αποξηραμένης φλούδας είτε με θερμική αναδευση είτε με υδρόλυση εμφάνισαν αύξηση σακχάρων 37,58% και 49,26 % αντίστοιχα. Ενώ οι αντίστοιχες επεξεργασίες στο αποξηραμένο κλαδώδιο αύξησαν τα σάκχαρα κατά 23,83% και 215,03% (~ 2 φορές αύξηση) αντίστοιχα.

7.1.2 Αποτελέσματα ανάλυσης σακχάρων ανά υπόστρωμα (με φραγκόσουκο – ένζυμο)

Πίνακας 7.1.2.20: Συνδυασμοί ενζύμων-υποστρώματος

Ένζυμο	Υπόστρωμα (g/L)	Ποσότητα ενζύμου (μL)	Μ.Ο Αρχικών Σακχαρών (g/g Ξ.Ο)	Μ.Ο Τελικών Σακχάρων (g/L)	Μ.Ο Τελικών Σακχάρων (g/g Ξ.Ο)	% Αύξηση Σακχάρων (g ανα 100 g Ξ.Ο)
Termamyl	10 κλαδώδιο	20	0,0965	1,68± 0,20	0,168	74,09
Termamyl	20 κλαδώδιο	20	0,0965	3,34± 0,28	0,167	73,06
Termamyl	30 κλαδώδιο	20	0,0965	5,96 ±0,41	0,199	105,87
Termamyl	50 κλαδώδιο	20	0,0965	6,10±0,18	0,122	26,42
Termamyl	100 κλαδώδιο	20	0,0965	7,45±0,03	0,0745	-22,8
Termamyl	50 φρούτο	20	0,557	21,18±2,07	0,4236	-23,95
Termamyl	100 κλαδώδιο	80	0,0965	9,98 ±0,47	0,099	3,42
Termamyl	100 Κλαδώδιο + 40 Φρούτο	60	0,6535	28,94 ±0,26	0,207	-68,37
Celluclast	10 κλαδώδιο	20	0,0965	1,39 ±0,45	0,139	44,04
Celluclast	20 κλαδώδιο	20	0,0965	2,28 ±0,27	0,114	18,13
Celluclast	30 κλαδώδιο	20	0,0965	3,55 ±0,36	0,118	22,63
Celluclast	50 κλαδώδιο	20	0,0965	4,30 ±0,07	0,086	-10,88
Celluclast	50 φρούτο	20	0,557	41,35 ±3,40	0,827	48,47
Celluclast	100 κλαδώδιο	20	0,0965	3,98 ±0,24	0,04	-58,76
Termamyl + Celluclast	100 κλαδώδιο	20	0,0965	8,89 ±0,37	0,09	-7,88

Ο παραπάνω πίνακας δείχνει ότι:

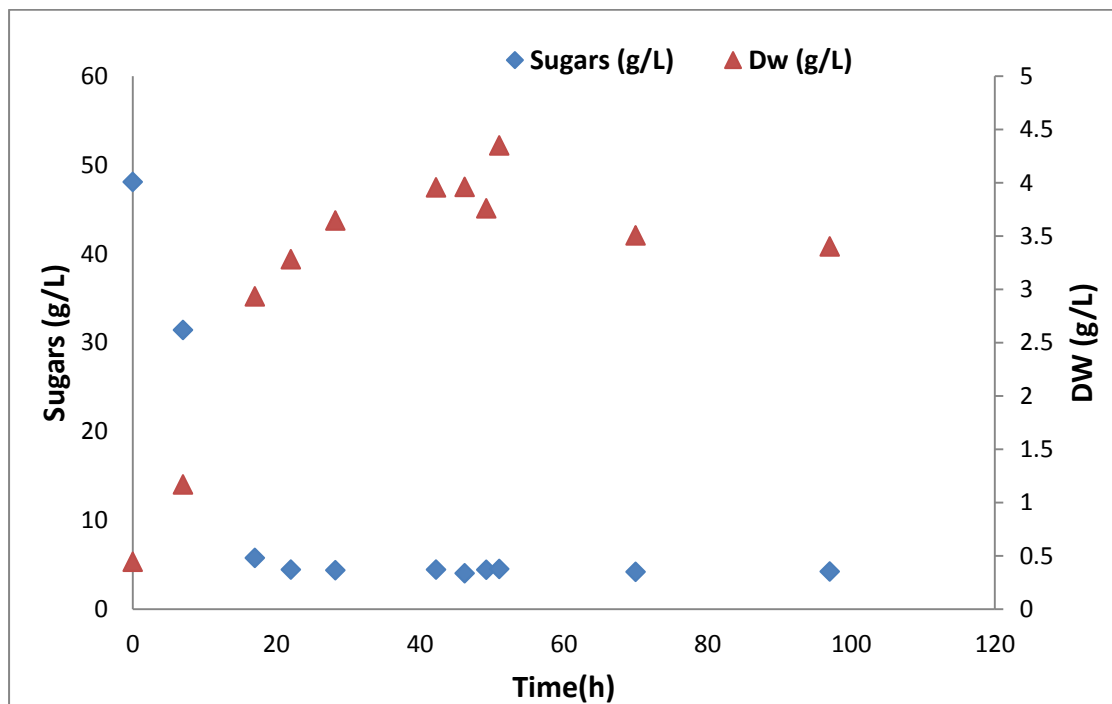
- Καθώς αυξάνεται η ποσότητα του υλικού στο οποίο θα γίνει η χρήση των ενζύμων αυξάνεται και η απόδοση σε σάκχαρα μέχρι ενός σημείου (50g κλαδωδίου). Ταυτόχρονα παρατηρείται ότι:

- Το ένζυμο **Termamyl** αποδίδει **καλύτερα** στις **χαμηλές συγκεντρώσεις κλαδωδίου** σε σχέση με το **Celluclast** που παράγει **λιγότερα σάκχαρα** σε όλες τις συγκεντρώσεις κλαδωδίου.

Διαπιστώνεται ότι: Το ένζυμο **Termamyl** σε όλα τα υποστρώματα αποξηραμένου κλαδωδίου αυξάνεται η ποσότητα των παραγόμενων σακχάρων μέχρι και το 105 % (στο δείγμα με 30 g/L κλαδωδίου). Έπειτα απ' αυτή τη μέγιστη τιμή αύξησης στα παραγόμενα σάκχαρα σταματά να αποδίδει εξίσου καλά σε περαιτέρω αύξηση της ποσότητας του υποστρώματος. Φθάνοντας στα 100 g/L παρατηρείται ότι σταματά επίσης η αύξηση των σακχάρων ενώ στην περίπτωση αύξησης της εφαρμοζόμενης ποσότητας ενζύμου (τετραπλάσια ποσότητα ενζύμου) παρατηρείται μια εκ νέου αύξηση της ποσότητας σακχάρου (3%) χωρίς όμως να είναι συγκρίσιμη με τις πρώτες μεγάλες αποδόσεις που υπήρξαν.

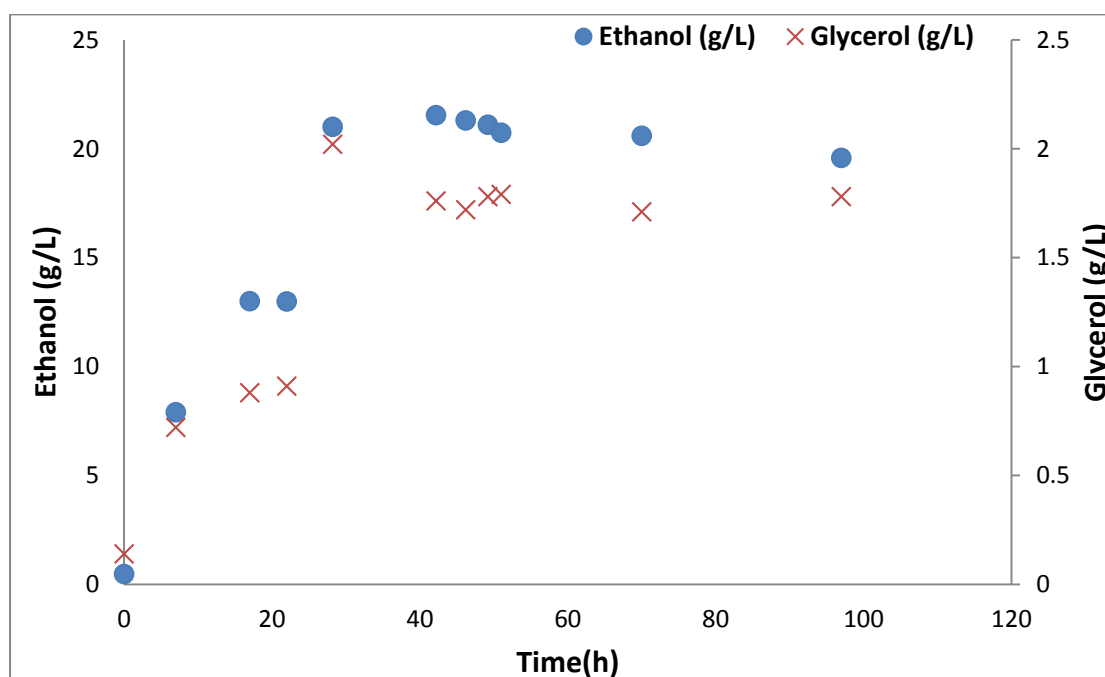
Το **Celluclast** μόνο σε μια δοκιμή παρήγαγε μεγαλύτερη ποσότητα απ' αυτή του **Termamyl** και πιο συγκεκριμένα στα 50 g φρούτου όπου αύξησε τα σάκχαρα κατά 48,47 %. Τέλος, η επεξεργασία με τη χρήση και των δυο ενζύμων ταυτόχρονα (πρώτα του Termamyl και στην συνέχεια του Celluclast) δεν αύξησε τα σάκχαρα του υποστρώματος (- 8%). Ενώ η επεξεργασία του Termamyl στα 100 κλαδώδιο + 40 φρούτο με 60 μL ενζύμου παρόλο που παρήγαγε μεγαλύτερη ποσότητα σακχάρων ανά λίτρο στην ουσία η ποσότητα των σακχάρων του ήταν πολύ μικρότερη απ' αυτή της αρχικής συγκέντρωσης (σε g/g ξηράς ουσίας).

7.2. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε υπόστρωμα με τμήματα του φυτού της φραγκοσυκιάς (*Opuntia ficus indica*, L.) σε μικροαερόφιλες συνθήκες στον αντιδραστήρα



Διάγραμμα 7.2.32: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η ποσότητα των σακχάρων που καταναλώνονται από τον μικροοργανισμό σε pH ~4,0 καθώς και η παραγόμενη ποσότητα σε βιομάζα του μ/ου. Οι **Sepulveda και Saenz (1990)** υποστηρίζουν ότι το προφίλ των σακχάρων που βρίσκονται στον πολτό των φρούτων της φραγκοσυκιάς είναι πολύ απλό και αποτελείται από γλυκόζη και φρουκτόζη σε σχεδόν ίσες ποσότητες γεγονός που επιβεβαιώνεται και στη δική μας περίπτωση, γιατί στο σημείο του εμβολιασμού το υπόστρωμα της ζύμωσης αποτελείται από 28,5 g/L Γλυκόζη και 19,1 g/L Φρουκτόζη. Μετά από 7 ώρες ζύμωσης, η Γλυκόζη έχει μειωθεί στο 14,8 g/L ενώ η Φρουκτόζη στο 14,4 g/L γεγονός που δείχνει ότι ο μ/ος έχει μια ελαφρά προτίμηση στην κατανάλωση της γλυκόζης. Με αυτή την άποψη συμφωνούν και οι **Stewart and Stewart, Walker, Chua et al.** οι οποίοι λένε συγκεκριμένα ότι τα είδη του *S. cerevisiae* ζυμώνουν με ευκολία εξόζες όπως τη γλυκόζη, φρουκτόζη και μαννόζη συνηθίζει όμως να έχει μια πιο επιθετική κατανάλωση σε σχέση με τα υπόλοιπα σάκχαρα στην γλυκόζη. Ακόμα παρατηρούμε ότι ο μ/ος δεν καταναλώνει όλα τα σάκχαρα του υποστρώματος αλλά αφήνει αζύμωτα 4,25 g/L. Τέλος, η παραγωγή βιομάζας από τον μ/ο δε δημιουργεί έντονες διακυμάνσεις και αποδίδει στις 51 ώρες τη μέγιστη ποσότητα η οποία είναι τα 4,35 g/L. Παρόμοια αποτελέσματα διαπίστωσε και ο **Custelar et al. (2008)** σύμφωνα με τα οποία ο μικροοργανισμός εμφάνισε εκθετική αύξηση μετά τις 6 ώρες ζύμωσης ενώ περίπου στις 30 ώρες έφτασε στην στάσιμη φάση και εμφάνισε ~ 5 g/L βιομάζα (ανάλογα με το στέλεχος που είχε χρησιμοποιηθεί).



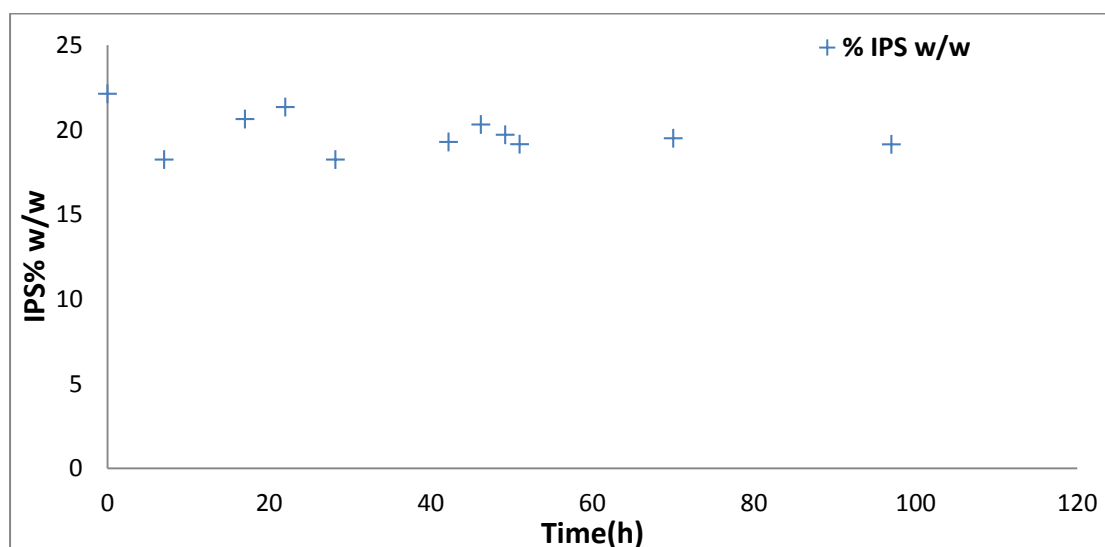
Διάγραμμα 7.2.33: Παραγόμενη αιθανόλη και γλυκερόλη για τον μ/ο E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα εμφανίζεται η παραγόμενη ποσότητα της αιθανόλης αλλά και της γλυκερόλης. Παρατηρείται ότι η **αιθανόλη** αυξάνεται συνεχώς μέχρι τις 28 ώρες και έπειτα μένει σχετικά σταθερή. Στις 42,2 ώρες λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της σε αιθανόλη η οποία είναι 21,54 g/L με απόδοση $Y_{EtOH/S}=0,49$ g EtOH /g υποστρώματος. Η σταθερότητα στις τιμές της αιθανόλης ίσως να οφείλεται στο ότι ο αριθμός των στροφών στον αντιδραστήρα είναι αρκετά

μικρός (150 grm) και δεν έχουμε εξωτερική προσθήκη αερισμού (υπάρχει μόνο μια μικρή θύρα μισάνοιχτη από την οποία πραγματοποιούνται οι δειγματοληψίες) για αυτό και δεν παρατηρείται το φαινόμενο της ανακατανάλωσης της αιθανόλης. Ένας ακόμα λόγος για την συντήρηση της παραγόμενης αιθανόλης πιθανόν να είναι ότι ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί το μεγαλύτερο τμήμα των σακχάρων του υποστρώματος για την παραγωγή της βιομάζας του και μόνο ένα μικρό κομμάτι αυτού για την παραγωγή αιθανόλης αξιοποιώντας βέβαια και τις πρωτεΐνες που υπάρχουν σε πληθώρα στο υπόστρωμα της ζύμωσης. Τέλος, στη **γλυκερόλη** η μέγιστη ποσότητα σημειώνεται κι αυτή στις 28 ώρες δίδοντας την ποσότητα των 2,02 g/L. Μετά το πέρας των 28 ωρών μειώνεται η ποσότητα της ελάχιστα κι ακολούθως διατηρείται σταθερή μέχρι το πέρας της ζύμωσης.

Ενδεικτικά οι τιμές οι οποίες ανιχνεύτηκαν από τη χρήση του kit είναι:

Ώρες ζύμωσης (g/L)	Αιθανόλη (g/L)	Υ EtOH (g/g S)
0	0,159	0,003
7	5,75	0,35
42,2	18,23	0,42
46,2	20,67	0,47
51	21,20	0,49
70	21,62	0,49
97	20,96	0,48



Διάγραμμα 7.2.34: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα από μέρη φραγκοσουκιάς.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνονται οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες. Ο μ/ος δίδει κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού 22,12% ενδοπολυσακχαρίτες η οποία είναι και η μέγιστη τιμή. Στην συνέχεια, της ζύμωσης η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτων διατηρείται σταθερή ενώ στο τέλος η ποσότητα των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών είναι 19,14%.

7.3. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι μικροοργανισμοί του είδους *S. cerevisiae* και πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη E1A, Γ2, Θ1, Δ3 και Β1 αυτού. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε υποστρώματα τα οποία περιείχαν ποικίλες **συγκεντρώσεις σακχάρων** (50, 70, 100 και 150 g/L) σε **αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες** και έπειτα επιλέχθηκε ένα από τα καλύτερα στελέχη προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα του να διενεργεί αλκοολική ζύμωση σε υπόστρωμα το οποίο αποτελούνταν από διάφορα μέρη του φυτού της φραγκοσουκιάς.

Μετά από την εξέταση των παραπάνω στελεχών προκύπτει ότι:

- **Μπορούν να χαρακτηριστούν ως Crabtree θετικοί μικροοργανισμοί, αφού κατά τη διάρκεια της ζύμωσής τους στις αερόβιες συνθήκες, σε σακχαρούχο υπόστρωμα καθώς και με περίσσεια γλυκόζης παράγαν αιθανόλη.**

- Όπως υποστηρίζουν οι **Alexandre, Charpentier et al., (1998), Attfield, (1997), Skowronek et al., (2011)** η αύξηση της συγκέντρωσης **αιθανόλης** κατά τη ζύμωση μπορεί να προκαλέσει αναστολή στην ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών ενώ η αδυναμία του *S. cerevisiae* να αναπτυχθεί σε μέσα που περιέχουν υψηλό επίπεδο αλκοόλης οδηγεί στην **αναστολή** της παραγωγής αιθανόλης.

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των στελεχών στη μέγιστη συγκέντρωση σακχάρων (150 g/L) συμπεραίνεται ότι:

- **Υπήρξε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα στο στελεχος Γ2 .**

- Επιπλέον, παρατηρείται ότι η παρεμπόδιση από το υπόστρωμα επηρεάζει κυρίως το στέλεχος Γ2 στις αερόβιες συνθήκες ενώ στις αναερόβιες συνθήκες δεν δημιουργείται το ίδιο θέμα. Πιο συγκεκριμένα, στο στέλεχος Γ2 στα 150 g/L ο μικροοργανισμός αφήνει αζύμωτα 63,51 g/L, το ίδιο στέλεχος στα 100 g/L αφήνει αζύμωτα 41,69 g/L ενώ το Θ1 αφήνει 12,87 g/L και τέλος το Γ2 στα 70 g/L αφήνει αζύμωτα 13,26 g/L.

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **αιθανόλη** σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων τα **50 g/L σε αερόβιες** συνθήκες ήταν του Γ2 (16,10 g/L) και σε πάρα πολύ κοντινές τιμές τα στελέχη Θ1(15,8 g/L), Δ3(15,97 g/L).

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **αιθανόλη** σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων τα **70 g/L σε αερόβιες** συνθήκες ήταν του Δ3(19,01 g/L).

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **αιθανόλη** σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων τα **100 gr/L σε αερόβιες** συνθήκες ήταν του E1A (32,97 gr/L) και σε πάρα πολύ κοντινές τιμές τα στελέχη Β1(31,54 g/L), Δ3 (32,51 g/L).

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **αιθανόλη** σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων τα **150 gr/L σε αερόβιες** συνθήκες ήταν του E1A (48,24 g/L) και σε πάρα πολύ κοντινές τιμές τα στελέχη Β1(45,7 g/L), Δ3 (47,79 g/L).

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **αιθανόλη** σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων τα **50 gr/L σε αναερόβιες συνθήκες**

ήταν του Δ3 (21,52 g/L) και σε πάρα πολύ κοντινές τιμές τα στελέχη B1(20,63 g/L), Γ2 (21,23 g/L) και E1A (20,46 g/L).

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **αιθανόλη** σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων τα **70 g/L σε αναερόβιες** συνθήκες ήταν του E1A(29,69 g/L) και σε πάρα πολύ κοντινές τιμές τα στελέχη Γ2 (27,52 g/L) και Δ3(28,68 g/L).

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **αιθανόλη** σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση **σακχάρων τα 100 g/L σε αναερόβιες** συνθήκες ήταν του Δ3 (50 g/L) και σε πάρα πολύ κοντινές τιμές τα στελέχη Θ1 (48 g/L) και E1A(46 g/L).

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **αιθανόλη** σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση **σακχάρων τα 150 g/L σε αναερόβιες** συνθήκες ήταν του B1(63,44 g/L) και σε πάρα πολύ κοντινές τιμές τα στελέχη Γ2 (63,35 g/L) και E1A(62,31 g/L).

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **γλυκερόλη** σε όλες τις συγκεντρώσεις υποστρωμάτων αλλά και σε όλες τις συνθήκες ήταν αυτή του στελέχους Θ1 στις αερόβιες συνθήκες και στα **150 g/L** που ήταν 8,49 g/L.

- Η παραγόμενη **βιομάζα** από τα στελέχη παραμένει σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, περίπου 2,15-5,8 g/L. το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα τα οποία έχουν παρουσιαστεί από τον Sarris et al., 2009 (δεδομένου ότι στην συγκεκριμένη μελέτη η μέγιστη ποσότητα παραγόμενης βιομάζας ήταν από 8-10 g/L). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση σε παραγόμενη **βιομάζα** σε όλες τις συγκεντρώσεις υποστρωμάτων αλλά και σε όλες τις συνθήκες ήταν αυτή του στελέχους Θ1 στις **αερόβιες συνθήκες και στα 150 g/L** που ήταν 5,8 g/L.

- Όσον αφορά στην ικανότητα παραγωγής **ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών**, οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς εμφάνισαν ικανότητα σύνθεσης αρκετά μεγάλης ποσότητας κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους υπό συνθήκες παρουσίας αζώτου.

- Η χημική και η μεταλλική σύνθεση του φραγκόσουκου δείχνει να είναι παρόμοια με την θρεπτική αξία άλλων φρούτων (Saenz and Sepulveda, 2001) ενώ τα σάκχαρα με το μεγαλύτερο ποσοστό είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη (Russell and Felker, 1987; Sawaya et al., 1983; Kuti and Galloway, 1994).

Όσον αφορά στη ζύμωση στον αντιδραστήρα:

- Σ' αυτήν επετεύχθηκε μια αρκετά ικανοποιητική ποσότητα **σακχάρων** (~ 48 g/L) για τα δεδομένα που αφορούν στη φραγκοσυσκία τα οποία καταναλώνοντάς τα ο μικροοργανισμός παρήγαγε 21,54 g/L **αιθανόλη** με απόδοση: $Y_{EtOH/S}=0,49$ g EtOH /g υποστρώματος.

- Η μέγιστη ποσότητα **βιομάζας** για το μικροοργανισμό είναι τα 4,35 g/L αποτέλεσμα το οποίο έχει εμφανιστεί αρκετές φορές και στα συνθετικά υποστρώματα με γλυκόζη γεγονός που δείχνει ότι ο μικροοργανισμός δεν παρεμποδίζεται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

- Επίσης, η ικανοποιητική ανάπτυξη του στο υπόστρωμα αυτό που περιέχει γλυκόζη και φρουκτόζη δείχνει ότι το στέλεχος αυτό έχει την ικανότητα να αναπτυχτεί και σε υπόστρωμα που έχει φρουκτόζη σαν πηγή άνθρακα. Επιπλέον, η μέγιστη παραγωγή σε **γλυκερόλη** είναι τα 2,02 g/L. Παρόλα αυτά, ο μικροοργανισμός δεν επιτυγχάνει να καταναλώσει όλα τα σάκχαρα του υποστρώματος αφήνοντας αζύμωτα 4,25 g/L.

Πίνακας 7.3.21. Συγκριτικά αποτελέσματα με άλλες μελέτες

Yeast strain	Culture Type	Substrate	Conditions	EtOH(g/L)	Y _{EtOH/S}	References
<i>S. cerevisiae</i> A2	Bioreactor	Glucose	Aerated	-	0,38	Hagman et al.
<i>S. cerevisiae</i> A1	Bioreactor	Glucose	Aerated	-	0,39	Hagman et al.
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Flask	Molasses	Aerated	37,3	0,44	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Flask	Molasses + 20% Olive Mill Waste	Aerated	33,9	0,41	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Flask	Molasses + 50% Olive Mill Waste	Aerated	24,2	0,27	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i> MAK-1	Bioreactor	Molasses + 20% Olive Mill Waste	NO-Aerated	44,4	0,49	Sarris et al., 2014
<i>S. cerevisiae</i> RL-11	Flask	Spent Coffee Ground	Aerated	11,7	0,26	Mussato et al.2012
<i>S. cerevisiae</i> MTCC 173	Bioreactor	Sorghum Stover	Aerated	68	0,34	Sathesh-Prabu. Et Murugesan (2011)
<i>S. cerevisiae</i> KL 17	Flask	Galactose+ Glucose	Aerated	9,43	0,47	Kim et al. (2014)
<i>S. cerevisiae</i> KL 17	Flask	Glucose	Aerated	8,78	0,44	Kim et al. (2014)
<i>S. cerevisiae</i> KL 17	Flask	Galactose	Aerated	41,47	0,41	Kim et al. (2014)
<i>S. cerevisiae</i> CHY1011	5L Jar	Cassava Starch	Aerated	89,1	0,46	Choi et al. (2010)
<i>S. cerevisiae</i> CHFY0901	5L Jar	Cassava Starch	Aerated	83,8	0,43	Choi et al. (2010)
<i>S. cerevisiae</i> CHFY0901	Flask	YPD	Aerated	42,2	0,44	Choi et al. (2010)
<i>S. cerevisiae</i> CHY1011	Flask	YPD	Aerated	44,3	0,47	Choi et al. (2010)
<i>S. cerevisiae</i> ZU 10	Flask	Corn Stover	NO-Aerated	20,9	0,27	Zhao et al. (2010)
<i>S. cerevisiae</i> ZU 10	Flask	Corn Stover	NO-Aerated	41,2	0,41	Zhao et al. (2010)
<i>S. cerevisiae</i> RPRT90	Bioreactor	Ipomea Carnea	Aerated	29	0,46	Kumari and Pramanik (2013)
<i>S. cerevisiae</i> CHFY0321	5L Jar	Cassava Starch	Aerated	89,8	0,46	Choi et al. (2010)
<i>S. cerevisiae. bayanus</i>	Flask	potato peel waste	NO-Aerated	7,58	0,46	D. Arapoglou et al. (2010)
<i>S. cerevisiae. Y-0528</i>	Bioreactor	Opuntia ficus-indica cladodes	NO-Aerated	19,6	0,4	Olukayode Kuloyo et al. (2013)
<i>S. cerevisiae</i> PE2	Flask	Cactus	Aerated	8,44	0,84	Gonçalves et al. (2014)
E1A	Flask	(150 g/L) Glucose	Aerated	48,24	0,34	Current Study
Γ2	Flask	(150 g/L) Glucose	Aerated	21,73	0,31	Current Study
Θ1	Flask	(150 g/L) Glucose	Aerated	35,57	0,25	Current Study
Δ3	Flask	(150 g/L) Glucose	Aerated	47,79	0,35	Current Study
B1	Flask	(150 g/L) Glucose	Aerated	45,70	0,31	Current Study

E1A	Flask	(100 g/L) Glucose	Aerated	32,97	0,33	Current Study
Γ2	Flask	(100 g/L) Glucose	Aerated	17,38	0,31	Current Study
Θ1	Flask	(100 g/L) Glucose	Aerated	27,24	0,33	Current Study
Δ3	Flask	(100 g/L) Glucose	Aerated	32,51	0,37	Current Study
B1	Flask	(100 g/L) Glucose	Aerated	31,54	0,33	Current Study
E1A	Flask	(70 g/L) Glucose	Aerated	13,55	0,22	Current Study
Γ2	Flask	(70 g/L) Glucose	Aerated	12,98	0,30	Current Study
Θ1	Flask	(70 g/L) Glucose	Aerated	12,07	0,21	Current Study
Δ3	Flask	(70 g/L) Glucose	Aerated	19,01	0,28	Current Study
B1	Flask	(70 g/L) Glucose	Aerated	15	0,33	Current Study
E1A	Flask	(50 g/L) Glucose	Aerated	14,91	0,31	Current Study
Γ2	Flask	(50 g/L) Glucose	Aerated	16,10	0,32	Current Study
Θ1	Flask	(50 g/L) Glucose	Aerated	15,8	0,34	Current Study
Δ3	Flask	(50 g/L) Glucose	Aerated	15,97	0,33	Current Study
B1	Flask	(50 g/L) Glucose	Aerated	13,29	0,29	Current Study
E1A	Flask	(150 g/L) Glucose	NO-Aerated	62,31	0,47	Current Study
Γ2	Flask	(150 g/L) Glucose	NO-Aerated	63,35	0,48	Current Study
Θ1	Flask	(150 g/L) Glucose	NO-Aerated	53,42	0,41	Current Study
Δ3	Flask	(150 g/L) Glucose	NO-Aerated	41,38	0,41	Current Study
B1	Flask	(150 g/L) Glucose	NO-Aerated	63,44	0,49	Current Study
E1A	Flask	(100 g/L) Glucose	NO-Aerated	46	0,49	Current Study
Γ2	Flask	(100 g/L) Glucose	NO-Aerated	38	0,49	Current Study
Θ1	Flask	(100 g/L) Glucose	NO-Aerated	48	0,47	Current Study
Δ3	Flask	(100 g/L) Glucose	NO-Aerated	50	0,49	Current Study
B1	Flask	(100 g/L) Glucose	NO-Aerated	30,94	0,48	Current Study
E1A	Flask	(70 g/L) Glucose	NO-Aerated	29,69	0,41	Current Study
Γ2	Flask	(70 g/L) Glucose	NO-Aerated	27,52	0,39	Current Study
Θ1	Flask	(70 g/L) Glucose	NO-Aerated	24,23	0,34	Current Study
Δ3	Flask	(70 g/L) Glucose	NO-Aerated	28,68	0,40	Current Study
B1	Flask	(70 g/L) Glucose	NO-Aerated	22,52	0,31	Current Study
E1A	Flask	(50 g/L) Glucose	NO-Aerated	20,46	0,43	Current Study
Γ2	Flask	(50 g/L) Glucose	NO-Aerated	21,23	0,41	Current Study
Θ1	Flask	(50 g/L) Glucose	NO-Aerated	16,26	0,32	Current Study
Δ3	Flask	(50 g/L) Glucose	NO-Aerated	21,52	0,42	Current Study
B1	Flask	(50 g/L) Glucose	NO-Aerated	20,63	0,4	Current Study
E1A	Bioreactor	Opuntia Ficus Indica	Micro-aerophiles	21,54	0,49	Current Study

●Σύμφωνα λοιπόν με όλα τα παραπάνω αλλά και με τη βοήθεια του συγκριτικού πίνακα της παρούσας μελέτης με άλλες γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι το **στελέχος E1A** καθώς και όλα τα υπόλοιπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι **ανταγωνιστικά** σε σχέση με τα βιβλιογραφικά αποτελέσματα. **Αυτό προκύπτει, πέρα από το ότι κάνουν αλκοολική ζύμωση, επίσης κι απ' το ότι αποδίδουν σχετικά υψηλές αποδόσεις στο σύνολο τους.**

Συνεπώς, θα ήταν επιθυμητή συνέχιση των πειραμάτων:

●Με αυτά τα στελέχη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων (200 g/L, 300 g/L) και κάτω από διαφορετικές συνθήκες pH, ανάδευσης και θερμοκρασίας ζύμωσης.

Όσον αφορά στο υπόστρωμα από μέρη του φυτού της φραγκοσουκιάς θα θα ήταν ενδιαφέρουσα περαιτέρω έρευνα:

●Με χρήση διαφορετικών ενζύμων απ αυτά που δοκιμάστηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς και διαφορετικών μεθόδων εξαγωγής σακχάρων. Αυτό το συμπέρασμα ανάγεται στο γεγονός ότι η περιεκτικότητα των διαφόρων μερών της φραγκοσουκιάς σε ζυμώσιμα σάκχαρα είναι συγκρίσιμη με τα ζυμώσιμα σάκχαρα άλλων πρώτων υλών όπως αυτό της βαγάσας από σακχαροκάλαμο (Neureiter et al., 2002), stover καλαμποκιού(National Renewable Energy Laboratory, 2013) καθώς του άχυρου του κριθαριού (Garcia et al., 2011).

●Επιπρόσθετα, το φυτό της φραγκοσουκιάς (που, απ'ότι δείχτηκε εδώ κι υποστηρίζεται και βιβλιογραφικά, κάποια μέρη του έχουν τη δυνατότητα, κάτω από ειδικές συνθήκες κι επεξεργασία, να παράγουν αιθανόλη) έχει το πλεονέκτημα να καλλιεργείται σε ξηρές και ημίξηρες ζώνες, όπου οι παραπάνω καλλιέργειες δεν ευδοκιμούν. Συνεπώς, στο μέλλον, δεδομένης της περιορισμένης ανάγκης αυτού του φυτού για νερό και της προοπτικής μειωμένης διαθεσιμότητας νερού, το γεγονός αυτό πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη από τη βιομηχανία βιοκαυσίμων (Santos, Dutra et al., 2016).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Α. Ελληνική

Αγνάντης Π. Μεταπτυχιακή εργασία: Παραγωγή αφρώδους οίνου με χρήση ακινητοποιημένων ζυμών προεγκλιματισμένων σε κανονικές συνθήκες και σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, (2016).

Αρχοντόπουλος Κ. Μεταπτυχιακή εργασία: Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή ζυμώσιμων προς βιοαιθανόλη σακχάρων, (2010).

Βαλλιανάτου Β. Μεταπτυχιακή διατριβή. Ανάλυση Περιβαλλοντικών επιπτώσεων από την παραγωγή και χρήση βιοκαυσίμων στα αυτοκίνητα (σε όλο τον κύκλο ζωής κι από τις πρώτες ύλες: Σιτάρι, καλαμπόκι, ζαχαροκάλαμο)-συγκριτική ανάλυση,(2013).

Βασιληάς Ε. Προοπτικές της αγοράς του βιοντίζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελλάδα, (2012). Σχολή τεχνολογικών εφαρμογών, Ηράκλειο.

Γεντίκης Α., Μεταπτυχιακή διατριβή, Παραγωγή βιοαιθανόλης από διατροφικά απορρίμματα με τη χρήση μικτής καλλιέργειας του μύκητα *Fusarium oxysporum* και της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, (2017). ΕΜΠ.

Διαμαντίδης Γ. Εισαγωγή στη βιοχημεία, 3^η έκδοση, University studio press, (2010).

Ιωαννίδης Χ. Η βιοαιθανόλη στην Ελλάδα. Παρόν και προοπτικές. (2013). Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καβάλας.

Κατσαμάς Γεώργιος, Αξιοποίηση βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων στην Ελλάδα, (2013). Πανεπιστήμιο Πειραιώς, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Πειραιάς.

Βιοκαύσιμα Αλκοόλες (Αιθανόλη, Μεθανόλη) (2018).

Κόλλιας Λουκάς Παραγωγή Βιοντίζελ από Μικροφύκη, (2013). Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Γάτσιος, Κ. Φραγκοσουκιά, (2018)

Λαγουδάκης Α. Η χώρα προέλευσης ως παράγοντας ζήτησης για προϊόντα φραγκόσουκου. (2015). Αθήνα.

Νερατζής Η. Π. Ταταρίδης & Σ. Λογοθέτης, Βιοτεχνολογία & Βιομηχανικές ζυμώσεις, (2016). Εκδόσεις έμβρυο.

Παπανικολάου Β. Μέθοδοι και Υλικά Ακινητοποίησης Βιοκαταλυτών για την Παραγωγή Καύσιμης και Βιομηχανικής Αλκοόλης σε Βιοαντιδραστήρα Διαλειπόντος Έργου. (2006). Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πάτρα.

Παπανικολάου Σ. Παν/μιακές παραδόσεις στο μάθημα Βιομηχανικής Βιοτεχνολογίας. (2019).

Πατρινού Β. Μεταπτυχιακή διατριβή Αγρίνιο: “Χρήση βιομάζας μικροφυκών για παραγωγή βιοαιθανόλης” (2017). Πολυτεχν. Σχ. Τμ. Διαχ. Περιβ. & Φυσικ. Πόρ. Πρόγρ. Μεταπτ. Σπ.: «Εφαρμογές προστασίας και Διαχ. Περιβ., Παν/μιο Πατρών.

Πλατανούπουλου Μ., Μεταπτυχιακή διατριβή. Μελέτη της παραγωγής αιθανόλης κατά την καλλιέργεια στελεχών του γένους *kazachstania* σε σακχαρούχα υποστρώματα, (2017).

Ποϊκλή Α., Μαύρου,Μ., Παγκόσμια Παραγωγή Βιοκαυσίμων. (2012) Τεχνολ. Εκπαιδ. Ίδρ. Καβάλ. Σχ. Τεχνολ. Εφαρμ. Τμ.Τεχνολ. Πετρελ. & Φυσικ. Αερ. Πτ. Εργ.: Παραγωγή Βιοαιθανόλης από βιομάζα.

Σουφλερός Ε., Οινολογία: Επιστήμη και τεχνολογία τόμος 1, (2009).

Τριανταφυλίδης, Κ. Αξιοποίηση βιομάζας για παραγωγή καυσίμων και χημικών: Έρευνα και τεχνολογία –περιβάλλον –οικονομία, (2012). ΑΠΘ. Τμήμα χημείας εργαστήριο γενικής και ανόργανης χημικής τεχνολογίας.

Χατζηαντωνίου, Κ. και Δαβόρας, Β. Βιοκαύσιμα, Βιοαιθανόλη: Συμβάλλουν στη βιώσιμη λύση του ενεργειακού προβλήματος; (2012). Τμήμα Χημείας ΑΠΘ & ΔΙΧΗΝΕΤ. ΕΜΠ. Τμ. Χημ. Μηχ. Τομ. Σύνθ. & Ανάπτ. Βιομηχ. Διαδικ. Εργ. Βιοτεχν.

Χριστακόπουλος, Π. Τόπακας, Ε. Βιοτεχνολογική Παραγωγή Βιοκαυσίμων 2ης και 3ης γενιάς βιοκαύσιμα. (2015).

Υπουργείο Γεωργίας, Αγροτ. Ανάπτ. & Περιβ., Τμ. Γεωργ.: Η καλλιέργεια της φραγκοσουκιάς. (2016). Λευκωσία.

B. Διεθνής

Abidi S., H. Ben Salem, V. Vasta and A. Priolo. (2009). Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica f. inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay. *Small ruminant research*, 87 (1-3), 9-16.

Aggelis, G., (2007). *Microbiology and Microbial Technology*, A, Stamoulis Publishers, Athens, Greece.

Alencara, B., Dutrab, E., Sampaiob, E., Menezes b, R. and Morais, R., (2017). *Bioresource Technology*.

Alexandre, H., Charpentier, C. (1998). Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20 20–27.

Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.*, 101, 4851-4861. (n.d.).

Arapoglou D., Varzakas Th., Vlyssides A.C, Israilides C. (2010). Ethanol production from potato peel waste (PPW).

Arifin Y., Tanudjaja E., Dimiyati A., Pinontoan R. (2014). A second generation biofuel from cellulosic agricultural by product fermentation using *Clostridium* species for electricity generation. *Energy Procedia* 47:310–5.

Attfield, P.V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast, *Nat. Biotechnol.* 15 1351–1357.

Avelino Gonçaves Fabiano, Ruiz Hctor A., Nogueira Cleitiane da Costa, Silvino dos Santos Everaldo, Teixeira Josi A., Ribeiro de Macedo Gorete (2014). Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies

Batista, A. M., Mustafa, A. F., Mc Allister, T., Wang, Y., Soita, H., Mc Kinnon, J. J., (2003). Effects of variety on chemical composition, in situ nutrient disappearance and in vitro gas production of spineless cacti. *J. Sci. Food Agric.* 83, 440–445.

Balat, M., Balat, H., Oz, C., (2008). Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 551–573. (n.d.-a).

Balat, M., Balat, H., Oz, C., (2008). Progress in bioethanol processing. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 551–573. (n.d.-b).

- Batista, A. M., Mustafa, A. F., Mc Allister, T., Wang, Y., Soita, H., Mc Kinnon, J. J., (2003). Effects of variety on chemical composition, in situ nutrient disappearance and in vitro gas production of spineless cacti. *J. Sci. Food Agric.* 83, 440–445.
- Benitez, T., Gasent-Ramirez, J.M., Castrejon, F., Codon, A.C., (1996). Development of new strains for the food industry. *Biotechnological Progress* 12, 149–163.
- Berg J.M, Tymoczko, J.L. & Stryer L. (2002). *Biochemistry*. 5th. New York: WH Freeman, 38(894),76.
- Carriquiry M.A., Timilsina Du.X., GR. (2011). Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy* 39: 4222–34.
- Chandel, A.K. Es, C., Rudravaram. R., Narasu, M.L., Rao. L.V., Ravindra. P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: An appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2. 14-32.
- Choi, G.W. Um, H.J. Kim, Y. et al., (2010). Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol production on Cassava starch, *Biomass-Bioenergy* 34, 1223–1231.
- Choi, G.W.Um, H.J. Kang, H.W. et al., (2010). Bioethanol production by a flocculent hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *S. Cerevisiae* and *S. bayanus*, *Biomass- Bioenergy* 34, 1232–1242.
- Compagno C, Dashko S.& Piskur (2014). Introduction to carbon metabolism in yeast. In: *Molecular Mechanisms inYeast Carbon Metabolism* (Compagno C. & Piskur J., eds) pp.1-21, Springer, Heildelberg. (In press) ISBN 978-3-642-55012-6.
- Custeler, M.R., T.M. Obon, M., Acacid and Fernadez-Lote, J.A. (2008). *J. Agric. Food Chem.* 56, 4253-7.
- Dashko S., Zhou N. Compagno C. & Piskur J. (2014). Why when and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*,14 (6), 826-832.
- Daskalaki A., Perdikouli D., Aggelis D. et al., (2019). Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Microbiol Biotechnol* 103:8585-96.
- Demirbas, A., (2009). Biofuels securing the planet’s future energy needs. *Energy Convers. Mgmt.* 50, 2239–2249.
- Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Aggelis G., Philippoussis A., . (2016). Adaptation of *Volvariella volvacea* metabolism in high carbon to nitrogen ratio media. *Food Chem.* 196:272-280.
- Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A., (2014). Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose- based submerged cultures. *Bioprocess Biosyst Eng.* 37:1385-1400.
- Diamantopoulou P., Filippousi R., Antoniou D., Varfi E., Xenopoulos E., Sarris D. and Papanikolaou S., (2020). Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *FEMS Microbiol. Lett.* 367:fnaa063
- Dimarogona M., Topakas E., Christakopoulos P. (2012). Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2(3) (E201209015, DOI : <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201209015>).
- Ezeilo U.R., Zakaria I.I., Huyop F., Wahab R.A. (2017). Enzymatic breakdown of

- lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monoxygenases, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31:4, 647-662, (DOI: 10.1080/13102818.2017.1330124)
- Festel, G.W., (2008). Biofuels-economic aspects. *Chem. Eng. Technol.* 31, 715–720.
- Fiedurek, J., Skowronek, M., Gromada, A. (2011). Selection and adaptation of *S. Cerevisiae* to increased ethanol tolerance and production, *Pol. J. Microbiol.* 60, 51–58.
- Filippoussi R., Antoniou D., Tryfinopoulou P. et al., (2019). Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid, *J. Appl. Microbiol.* 127.1080-100.
- Fleet, G.H., (1992). Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 12, 1–44. (n.d.).
- Fleet, G.H., (1997). Wine. In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology, Washington, p. 671.
- Florian C. Stintzing and Reinhold Curle, (2005). Cactus stems (*Opuntia spp*) : A review on their chemistry ,technology and uses, *Moi .Nutr.Food.Res*49,175-194
- Gable, M., Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 108, 41-65.
- Galbe. M., Zacclii, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59. 618-628.
- Garcia-Aparicio M.P, Oliva J.M, Manzanares P, Ballesteros M, Ballesteros I, Gonza´lez A, Negro MJ (2011). Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 90:1624–1630. doi:10.1016/j.fuel.2010.10.052
- Gebremariam T. , Melaku S. and Yami A. (2006). Effect of different levels of cactus (*Opuntia ficus indica*) inclusion on feed intake, digestibility and body weight gain in tef (*Eragrostis tef*) straw – based feeding of sheep
- Giovani G., Rosi I. and Betruccioli M. (2012). Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non- *Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation, *International journal of food microbiology*, 160 113-118.
- Green K.R, Lowenbach W.A. (2001). MTBE contamination: Environmental, legal, and public policy challengesguest editorial. *Environ Forensics* 2:3–6.
- Hagman A., Sall T., Compagno C., Piskur J., (2013). Yeast Make-Accumulate-Consume Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process than Predates the whole Genome Duplication, *PLOS ONE*.
- Hamdi M. (1997). Prickly pear cladodes and fruits as a potential raw material for the bioindustries. *Bioprocess Engineering* 17387-91.
- Harris, E., Beglinger, E., Hajny, G., and Sherrard, E. (1945). “Hydrolysis of wood: Treatment with sulfuric acid in a stationary digester,” *Ind. Eng. Chem.* 37(1), 12-23.
- Harris, J., Baker, A., and Zerbe, J. (1984). “Two-stage, dilute sulfuric acid hydrolysis of hardwood for ethanol production,” *Energy Biomass Wastes* 8, 1151-1170.
- Harun, R., Danquah, M.K., (2011). Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry* 46, 304-309.
- Hashem, A. M. and Rashad, M. M. (1993). “Production of ethanol by yeasts grown on hydrolyzate of Egyptian sweet potato,” *Egypt Journal of Food Science* 21(2),

171-180.

- Havlik P., Schneider O.A., Schmid E., Bottcher H., Fritz S., Skalsky R., et al. (2011). Global land-use implications of first and second generation biofuel targets. *Energy Policy* 39:5690–702.
- Kuloyo O. O. • Du Preez J. C. • García-Aparicio M. del P. • Kilian S. G. • Steyn L. • Gorgens J. (2013). *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*.
- Kumari, R. Pramanik, K. (2013). Bioethanol production from *Ipomea Carnea* biomass using a potential hybrid yeast strain, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 1771–1785.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, 100, 10-18.
- Hintz K., Yount G., Kadar I., Schwartz G., Hammerschlag R., Lin S., (2003). *BioEnergy Definitions and Research Guidelines, Alternative Therapies in Health & Medicine*, 9, 13-30.
- Ho S., Shu-Wen Huang, Chun-Yen Chenb, Tomohisa Hasunumac, Akihiko Kondoc, Jo-Shu Chang. (2012). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock.
- Ho S.H., Ye X., Hasunuma T., Chang J.S., Kondo A. (2014). Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae- A critical review. *Biotechnology Advances* 32 1448–1459.
- Jackson, R.S. *Wine science principles and applications*, (2014), Academic Press. (n.d.).
- Jambo S.A., Abdulla R., Azhar S. H. M., Marbawi H., Gansau J.A., Ravindra P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 65 756–769.
- Jones, J., and Semrau, K. (1984). “Wood hydrolysis for ethanol production – Previous experience and the economics of selected processes,” *Biomass* 5, 109-135.
- Kar Y, Deveci H. (2006). Importance of P-series fuels for flexible-fuel vehicles (FFVs) and alternative fuels. *Energy Sources Part A* 28:909–21.
- Karimi, K., Kheradmandinia, S., and Taherzadeh, M. J. (2006b). “Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis,” *Biomass Bioenergy* 30(3), 247-253.
- Katzen, R., Madson, P. W., and Monceaux, D. A. (1995). ‘Use of cellulosic feedstocks for alcohol production,’ in *The Alcohols Textbook*, Lyons, T. P., Murtagh, J. E., and Kelsall, D.R., (eds.), Nottingham University Press, 37-46.
- Khan M. I., Lee M. G., Shin J. H. and Kim J. D. (2017). Pretreatment optimization of the biomass of *Microcystis aeruginosa* for efficient bioethanol production. *AMB Expr* 7:19 DOI 10.1186/s13568-016-0320-y.
- Kim, J.H. Ryu, J. Huh, I.Y. et al., (2014). Ethanol production from galactose by newly isolated *S. cerevisiae* KL17, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 371871–1878.
- Kim, S., Dale, B., (2006). Ethanol fuels: E10 or E85–life cycle perspectives (5 pp). *Int. J. Life Cycle Assess.* 11, 117–121.
- Kopsahelis, N., Bosnea, L., Bekatorou, A., Tzia, C. et al., (2012). Alcohol production from sterilized and non-sterilized molasses by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on brewer’s spent grains in two types of continuous bioreactor systems. *Biomass Bioenerg.* 45, 87–94.
- Kopsahelis, N., Nisiotou A., Kourkoutas Y., Panas P., Nychas G. J-E., Kanellaki M. (2009). Molecular characterization and molasses fermentation performance

- of a wild yeast strain operating in an extremely wide temperature range. *Bioresource Technology* 100 4854–4862.
- Kristensen, J., Thygesen, L., Felby, C., Jorgensen, H., Elder, T. (2008). Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 1, 1-9.
- Kumar, P., Barret D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48, 3713-3729.
- Kuti, J.O. and Galloway, C.M. (1994). Sugar composition and invertase activity in prickly pear. *J. Food Science* 59(2):387-393
- Larsson, S., Quintana-Sainz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N. O., and Jonsson, L. J. (2000). "Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-6, 617-632.
- Lenihan P., Orozco A., O'Neill E., Ahmad M.N.M., Rooney D.W., Walker G.M. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal* 156(2), 395-403.
- Lin, Y., Tanaka, S., (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 627–642. [43] Najafpour, G., *Biochemical Engineering and Biotechnology*, First Edition, Elsevier Science, Amsterdam (2006).
- Lynd LR. (1996). Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. *Annu Rev Energy Environ.* 21:403–65.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (3), 506–577.
- Maitan-Alfenas G.P., Visser E.M., Guimarães V.M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, Volume 1, 44-49.
- Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., Georgakakis, D., (2013). Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Energies* 6, 3937-3950; doi: 10.3390/en6083937.
- McCarthy JE, Tiemann M. (1998). MTBE in gasoline: Clean air and drinking water issues. Washington, DC, USA; .
- Medipally Srikanth Reddy, Fatimah Md. Yusoff, Sanjoy Banerjee and M. Shariff (2012). Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production, *BioMed Research International Article ID 519513*.
- Miller, (1959). *Anal. Chem.* 31 (3) 426-458.
- Millet et al, (1976). Cadoche and Lopez 1989, Shafizadeh and Lai, 1975, Harun and Danquah, (2011).
- Millet MA, Baker A.J, Scatter L.D. (1976). Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnol Bioeng Symp* 6:125–53.
- Mondragon J.C., Perez G.S., (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations " Cactus (*Opuntia spp.*) as Forage". *Food & Agriculture Org.*, 2001.
- Mosier, N.; Wyman, CE. ; Dale, BD. ; Elander, RT. ; Lee, YY. ; Holtzapple, M. & Ladisch, CM. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of

- lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Vol.96, No.6, (April 2005), pp. 673–86, ISSN 09608524.
- Mussato, S.I. Machado, E.M.S. Carneiro, L.M. Teixeira, J.A. (2012). Sugar metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates, *Appl. Energy* 92, 763–768.
- National Renewable Energy Laboratory (2013). Biomass Feedstock Composition and Property Database. www.nrel.gov/biomass/data_resources.html Accessed 13 June 2013.
- Neureiter M, Danner H, Thomasser C, Saidi B, Braun R (2002). Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 98–100:49–58.
- Nevoigt E., Stahl U., (1997). Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *S. cerevisiae* *FEMS Microbiology reviews* 21, 231-241.
- Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52–68. [https://doi.org/10.1016/j.pecs.\(2010\).01.003](https://doi.org/10.1016/j.pecs.(2010).01.003).
- Nigam PS, Singh A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog Energy Combust Sci.* 37:52–68.].
- Nobel P.S., (1995). Recent ecophysiological advances for *Opuntia ficus-indica* and other cacti, in: Annual conference of the professional association for cactus development, 1, San Antonio, Professional association for cactus development, Dallas, (1995), pp. 1e11.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2011 a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci Technol.* 113:1031-51.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011 b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential application. *European Journal of Lipid Science and Technol.*, 113 (8), 1052-1073.
- Pfeiffer T& Morley A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 17.
- Pickett J, Anderson D, Bowles D, Bridgwater T, Jarvis P, Mortimer N, et al. (2008). Sustainable biofuels: Prospects and challenges. London, UK: The Royal Society.
- Piskur Jure, Elzbieta Rozpedowska, Silvia Polakova, Anna Maria Merico and Concetta Compagno, (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Elsevier, Trends in genetics vol. 22NO4.*, 183-186.
- Prasad, S., Singh, A., Joshi, H., (2007) Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recycl.*, 50, 1–39.
- Pronk, J.T., Steensma, H.Y., Van Dijken, (1996). Pyruvate metabolism in *Sacharomycae cerevisiae* *Yeast*, 1607-1633.
- Qureshi, N., and Manderson, G. (1995). “Bioconversion of renewable resources into ethanol: An economic evaluation of selected hydrolysis, fermentation, and membrane technologies,” *Energy Sources* 17, 241-265.
- Ragauskas, A.J., Williams, C. K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick Jr., W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J., Liotta, C.L., Mielenz, J.R., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T., (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311, 484–489.

- Ratledge, C., Yeast physiology—a micro-synopsis. *Bioproc. Eng.* (1991). 6, 195–203.
- Ratledge, C., (1988). Biotechnology group meeting extremophiles. *J Chem Technol Biotechnol.*, 42, 289 - 322
- Retamal, N., Dur_n, J. M., Fern_nde, J., (1987). Seasonal variations of chemical composition in prickly pear (*Opuntia ficus indica* (L.) Miller). *J. Sci. Food Agric.* 38, 303–311.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Don`eche, B., Lonvaud, A. et al., (Ed.), (2006). Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathways of wine yeasts, *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*, John Wiley & Sons, New York pp. 53–77.
- Ribeiro, B.E. (2013). Beyond common place biofuels: Social aspects of ethanol. *Energy Policy* 57:355–62.
- Ribeiro B. A. A., Dutrab E. D., Sampaio E. V. de Sa B., Romulo Simoes Cezar Menesb* and Morais M. A. Jr (2018). Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production, *Bioresoyrce Technology*, 250, 273-280.
- Ribereau-Gayon P. (1964). *Les composes phainolueq du raisin et du vin*, Institute National de la Recherche Agronomique de Paris.
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., & Dubourdieu D. (2006). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments: Second edition (Vol 2)*.
- Rodriguez-Felix, A., Cantwell, M., (1988). Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods Hum. Nutr.* 38, 83–93.
- Rodrigues-F., Ludovico, P.Leao, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism (ed.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Springer, 101-121.
- Roukas, T., (1995). Ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells on the mineral kissiris. *Food Biotechnol.* 9, 175 188.
- Russell, C. and Felker, P. (1987). The prickly-pears (*Opuntia spp.*, Cactaceae): A source of human and animal food in semiarid regions. *Economic Botany* 41:433-445.
- Saenz C. and Sepulveda E., (2001): Cactus –pear Juices
- Sampaio E.V.S.B, *Fisiologia da palma*, in: R.S.C. Menezes, D.A. Simoes, E.V.S.B. Sampaio (Eds.), (2005). *A palma no nordeste do Brasil. Conhecimento atual e novas perspectivas de uso*, Editora Universit_aria da UFPE, Recife.
- Saenz, C. (1990). Chemical and physical characteristics of prickly pear (*Opuntia ficus indica l*) pulp. *Rev. de Agroukim. y Technol. des Alim.*, 30, 551-5.
- Sanchez, S., Demain, A. L., (2008). Metabolic regulation and over production of primary metabolites. *Microb. Biotechnol.* 1, 283–319.
- Santos T.do Nascimento, Dutra E.D., Gomes do P.A., Leite C.B., et al. (2016). Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. *Biomass & Bioenergy* 85 215-22.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., Aikat, K., (2012). Bioethanol production from

- agricultural wastes: An overview. *Renew. Energy* 37, 19–27.
- Sarris, D., Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M. et al., (2013). Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 958–969.
- Sarris, D., Matsakas, L., Aggelis, G., Koutinas, A. A. et al., (2014). Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Ind. Crops. Prod.* 56, 83–93.
- Sarris, D., Matsakas, L., Aggelis, G., Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2014). Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under non-aseptic conditions. *Industrial Crops and Products*, 56, 83–93. doi:10.1016/j.indcrop.2014.02.040
- Sathesh-Prabu, C. Murugesan, A.G. (2011). Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces Cerevisiae*, *Bioresour. Technol.* 102, 2788–2792.
- Sawaya, W.N., Khatchadourian, H.A., Safi, W.M. and Al-Hammad, H.M. (1983a). Chemical characterization of prickly pear pulp, *Opuntia ficus indica*, and the manufacturing of prickly pear jam. *J. Food Technol.* 18:183-193.
- Schneider, R. C. S., Bjerk, T. R., Gressler, P. D., Souza, M. P., Corbellini V. A. and Lobo E.A., (2013). Potential Production of Biofuel from Microalgae Biomass Produced in Wastewater. Chapter 1, <http://dx.doi.org/10.5772/52439>.
- Shafizadeh F, Lai YZ. (1975). Thermal degradation of 2-deoxy-d-arabino-hexonic acid and 3-deoxy-d-ribo-hexono-1, 4-lactone. *Carbohydr Res* 42:39–53.
- Singh A., Olsen S.I., (2011). A critical review of biochemical conversion, sustainability and lifecycle assessment of algal biofuels. *Appl Energy* 88:3548–55.).
- Sun Y. & Cheng J. (2002). “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review”. *Bioresource Technology*, vol. 83, pp.1-11.
- Stewart GG. GG. Stewart Associates, Cardiff. KK. (2014). *Saccharomyces cerevisiae*
- Taherzadeh, M. J., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C., and Lidén, G. (1997). “Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood,” *Ind. Eng. Chem. Res.* 36(11), 4659-4665.
- Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.*, 101, 4744-4753.
- Tampier, M., Smith, D., Bibeau, E., Beauchemin, P. et al., (2004). Identifying Environmentally Preferable Uses for Biomass Resources, Environmental Services Inc., Vancouver, Canada 132pp.
- Tomas-Pejo E., Oliva J.M., Ballesteros M., (2008). Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: A review, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67(11), 874-84.
- Turker N., Coskuner Y., Ekuz H.I., Aksay S., Karababa E. (2001). The effects of fermentation on the thermostability of the yellow-orange pigments extracted from cactus pear (*Opuntia ficus – indica*) *Eur. Food Res. Technol.* 212: 213-6.
- Viljoen, B.C. Heard, G.M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* GG Stewart, GG Stewart Associates, Cardiff, UK _ 2014 Elsevier Ltd, volume 3, pp 1918–1925.

- Van Dijken, J.P. and Scheffer, W.A., (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. FEMS Microb. Rev. 199-224.
- Walker, G., Stewart G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages
- Wang, M., Han, J., Dunn, J. B., Cai, H. et al., (2012). Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use. Environ. Res. Lett. 7, 045905.
- Wilson K. and Leod B. J. (1976). The influence of conditions of growth on the endogenous metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* effect on protein, carbohydrate, sterol and fatty acid content and on viability, Antonie van Leeuwenhoek 42 397-410.
- Zabeda, H., Sahuc, J.N., Suelya, A., Boycea, A.N. Faruq G Cadoche L, Lopez GD. (1989). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. Biol Wastes 30:153–7.
- Zamora, F., (Ed.), (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation, Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, New York pp. 3–26.
- Zhao, J. Xia, L. (2010). Bioconversion of corn stover hydrolysate to ethanol by a recombinant yeast strain, Fuel Process Technol. 91, 1807–1811.

INTERNET

Πρωτόκολλο Κιότο:

1. https://el.wikisource.org/wiki/%CE%A0%CF%81%CF%89%CF%84%CF%8C%CE%BA%CE%BF%CE%BB%CE%BB%CE%BF_%CF%84%CE%BF%CF%85_%CE%9A%CE%B9%CF%8C%CF%84%CE%BF,
2. <https://unfccc.int/>
3. https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A0%CF%81%CF%89%CF%84%CF%8C%CE%BA%CE%BF%CE%BB%CE%BB%CE%BF_%CF%84%CE%BF%CF%85_%CE%9A%CE%B9%CF%8C%CF%84%CE%BF
4. <https://www.symagro.com/fragosiko/>

Φραγκόσυκο

<https://www.symagro.com/fragosiko/>

Σακχαροκάλαμο, σακχαρότευτλο, Γλυκό σόργο, Αραβόσιτος –Καλαμπόκι, Κενάφ, Αργιαγκινάρα, Ευκάλυπτος, Ψευδακακία

(<https://www.google.com/search>)

Γλυκόλυση

(<https://dimitra-spanoy.webnode.gr/products/oi-arches-tis-chimeias-kai-tis-chimikis-thermodynamikis-stis-antidraseis-toy-metavolismoy-anaerovia-glykololysi-embden-meyerhof1/>)

Είδη φραγκοσυκιάς

A. https://www.google.com/search?q=Sulfarina&newwindow=1&sxsrf=ALeKk03SQ79_xSVb-WFH-eKtbHO2T6b1nQ:1605293485761&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiv5-mfmIDtAhXVCRAIHTFyDScQ_AUoAXoECAwQAw&biw=1536&bih=754#imgrc=bZw4XZk18uY_EM

B. https://www.google.com/search?q=sanguina+opuntia+ficus+indica&tbm=isch&ved=2ahUKEwiQu7mxmIDtAhXz7uAKHbpIDEUQ2-cCegQIABAA&oq=sanguina+opuntia+ficus+indica&gs_lcp=CgNpbWcQAzoECAAQEzoGCAAQHhAToggIABAFEB4QEzoGCAAQBRAeOgYIABAIEB5Q6BhYi0Bg40FoAHAAeACA AaoCiAGPGZIBBjAuMjAuMZgBAKABAaoBC2d3cy13aXotaW1nwAEB&sclient=img&ei=0tWuX5CKK_Pdgwe6kbGoBA&bih=754&biw=1536

C. https://www.google.com/search?q=muscareda&newwindow=1&tbm=isch&sxsrf=ALeKk01xv_H6xFIX2YtwbTIHIVZSjaYPBg:1605293951854&source=Inms&sa=X&ved=0ahUKEwjhgYr-mYDtAhXCwosKHru6BW0Q_AUICygB&biw=1536&bih=754&dpr=1.25#imgrc=6eTGS S_oQq5D6M

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα υπό μορφή διαγραμμάτων και πινάκων της αλκοολικής ζύμωσης των μελετούμενων στελεχών *S.cerevisiae* σε συνθετικό υπόστρωμα υπό ασηπτικές συνθήκες, αερόβια κι αναερόβια, στις συγκεντρώσεις γλυκόζης 50, 70 και 100 g/L. Συγκεκριμένα δίδεται:

1. Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης
2. Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του στελέχους E1A, Γ2, Θ1, Δ3 ή Β1 του μ/ου *S. cerevisiae* σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL , T= 30±1, ανάδευση 140±5)
3. Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του στελέχους E1A, Γ2, Θ1, Δ3 ή Β1 του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50, 70 & 100 g/L (Γλυκόζη)

Γενικές παρατηρήσεις

Στην συσχέτιση της κατανάλωσης γλυκόζης με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για όλα τα στελέχη στην συγκέντρωση **50 g/L γλυκόζης**

Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης σε όλα τα στελέχη (εκτός του Β1) και στο μεγαλύτερο ποσοστό των λοιπών συγκεντρώσεων.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία με απότομη άνοδο κατά τη χρονική περίοδο που διαπιστώνεται απότομη πτώση των σακχάρων. Η βιομάζα παραμένει σταθερή για αρκετές ώρες και στην συνέχεια σημειώνεται εκ νέου άνοδος της συγκέντρωσής της μέχρι κάποια μέγιστη τιμή, γεγονός που συμβαίνει πιθανώς, λόγω του ότι ο μικροοργανισμός συνηθίζει το περιβάλλον ανάπτυξης του.

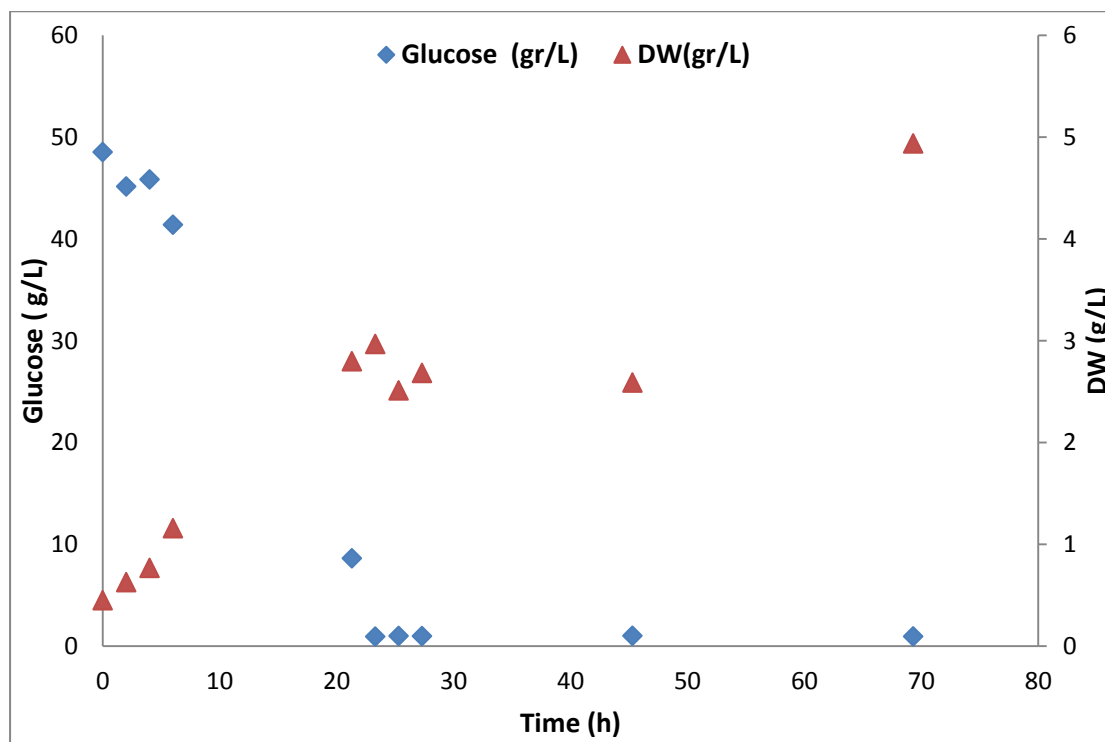
- Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρήθηκε η παραγωγή **γλυκερόλης** σε πολύ μικρή ποσότητα όμως.

- Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρείται ότι, κατά τις πρώτες ώρες του φαινομένου, ο μικροοργανισμός συσσωρεύει τις μέγιστες τιμές του σε **ενδοπολυσακχαρίτες**.

- Η μέγιστη τιμή της **αιθανόλης** πρόεκυψε τη χρονική περίοδο που ο μ/ος έχει καταναλώσει σχεδόν όλο το σάκχαρο και έχει παράξει τη μέγιστη ποσότητα αιθανόλης για το πείραμα αυτό.

8.1. Αερόβιες Συνθήκες

8.1.1 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.34: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ος *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* E1A.

Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία η οποία έχει απότομη άνοδο κατά την χρονική περίοδο που παρατηρείται απότομη πτώση των σακχάρων. Η βιομάζα παραμένει σταθερή για αρκετές ώρες και στην συνέχεια διαπιστώνεται εκ νέου άνοδος της συγκέντρωσης της βιομάζας, της οποίας η μέγιστη τιμή είναι 4,94 g/L, γεγονός που συμβαίνει πιθανώς, λόγω του ότι ο μικροοργανισμός συνηθίζει το περιβάλλον ανάπτυξης του.

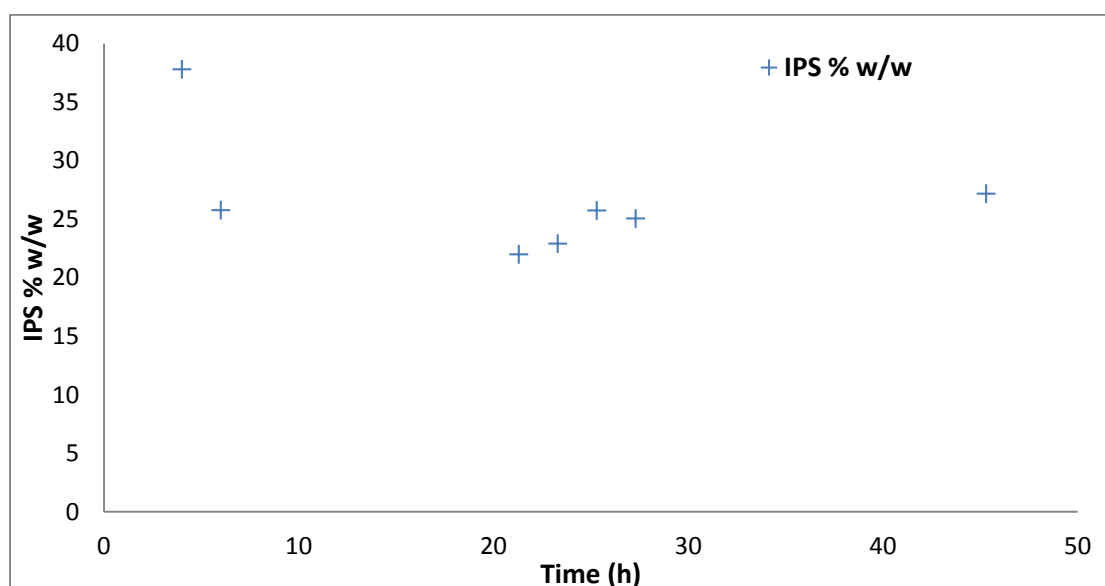
Πίνακας 8.1.1.22: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* E1A σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L)	Y _{EtOH}	Glycerol
21,3	8,62	39,92	14,78	0,37	1,48
23,3	0,94	47,60	14,91	0,31	1,59
25,3	0,99	47,55	7,33	0,15	1,67
27,3	0,98	47,55	-	-	-
45,3	1,02	47,52	13,74	0,29	1,28
69,3	0,96	47,58	-	-	-

Στον παραπάνω πίνακα περιγράφεται η κινητική του στελέχους **E1A** του σακχαρομύκητα σε υπόστρωμα γλυκόζης. Στο πείραμα αυτό ο μ/ος κατάφερε να παράγει 14,91 g/L αιθανόλης που αντιστοιχεί στη μέγιστη ποσότητα η οποία παράχθηκε περίπου στις 23 ώρες ζύμωσης και ο συντελεστής μέγιστης απόδοσης που εκφράζει αυτή η ποσότητα είναι $Y_{EtOH/S}=0,31$ g EtOH/ g S (S=καταναλωθέντα σάκχαρα).

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρήθηκε η παραγωγή γλυκερόλης σε πολύ μικρή ποσότητα όμως. Η μέγιστη συγκέντρωση της γλυκερόλης έφτασε τα 1,67 g/L και σημειώθηκε κατά την 25^η ώρα και μέχρι το τέλος της ζύμωσης αυτή παρέμεινε σχετικά σταθερή.

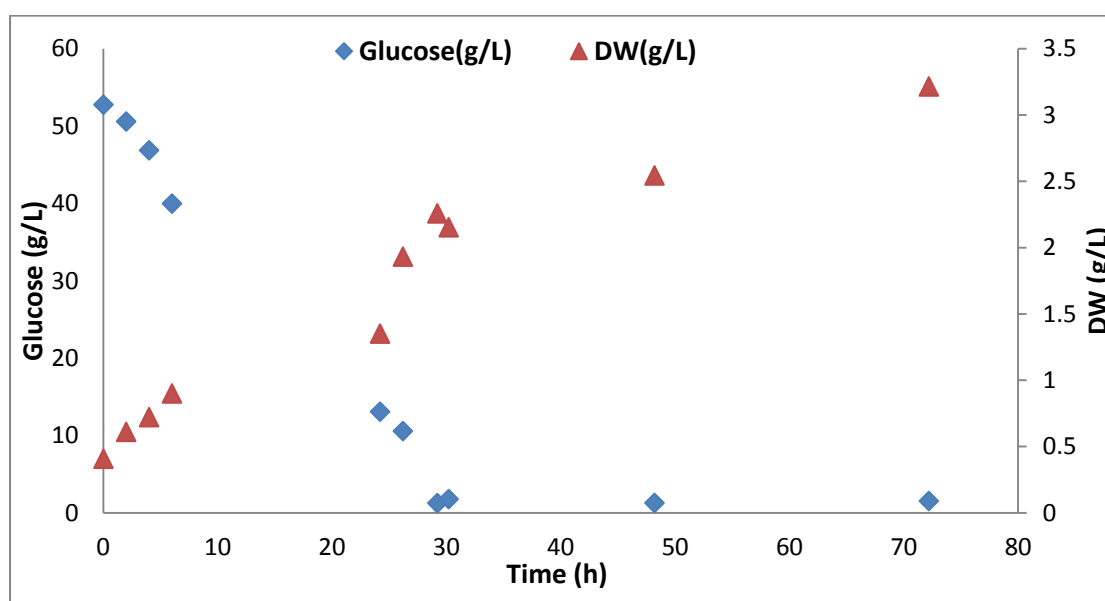
Παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη τιμή της αιθανόλης πρόεκυψε τη χρονική περίοδο που ο μ/ος έχει καταναλώσει σχεδόν όλο το σάκχαρο και έχει παράξει τη μέγιστη ποσότητα αιθανόλης για το πείραμα αυτό.



Διάγραμμα 8.1.1.35: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρείται ότι, κατά τις πρώτες ώρες του φαινομένου, ο μικροοργανισμός συσσωρεύει τις μέγιστες τιμές του σε ενδοπολυσακχαρίτες. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη τιμή των ενδοπολυσακχαριτών φτάνει το 37,81% w/w και σημειώνεται στις πρώτες ώρες της ζύμωσης. Ακολούθως, απ' αυτό το σημείο παρατηρείται πτώση τους ενώ στο τέλος της ζύμωσης λαμβάνουν την τιμή 27,18% w/w.

8.1.2 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.2.36: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Γ2

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Γ2. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία με απότομη άνοδο κατά τη χρονική περίοδο που παρατηρείται απότομη πτώση των σακχάρων. Η βιομάζα αυξάνεται σταθερά για αρκετές ώρες κι έπειτα παρατηρείται ότι στο τελευταίο σημείο της ζύμωσης έχει λάβει τη μέγιστη τιμή της, η οποία είναι 6,43 g/L που συμβαίνει πιθανώς λόγω του ότι ο μικροοργανισμός συνηθίζει το περιβάλλον ανάπτυξης του.

Πίνακας 8.1.2.23: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

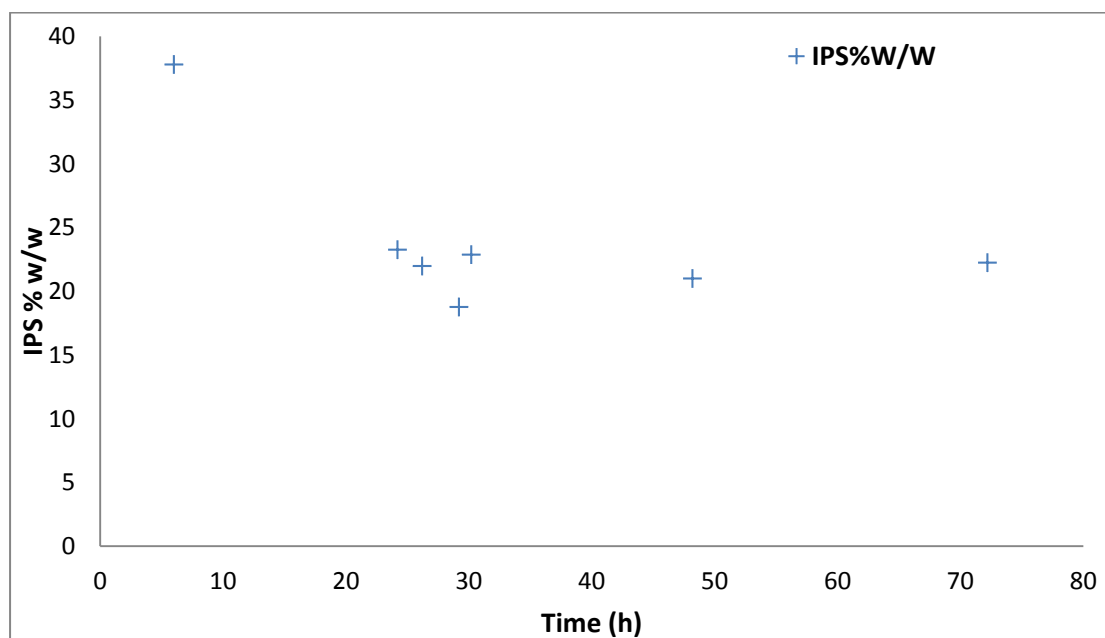
Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (HPLC) (g/L)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH (KIT) (g/L)	Y _{EtOH}
24,20	13,08	39,68	14,39	0,36	1,48	16,73	0,42
26,20	10,58	42,18	15,72	0,37	1,74	-	-
29,20	1,26	51,50	11,35	0,22	1,25	13,91	0,27
30,20	1,78	50,98	16,10	0,32	1,91	-	-
48,20	1,29	51,47	-	-	-	-	-
72,20	1,53	51,23	-	-	-	-	-

Στον παραπάνω πίνακα περιγράφεται η κινητική του στελέχους **Γ2**.

Στο πείραμα αυτό ο μ/ος επέτυχε να δώσει 16,1 g/L αιθανόλης που αντιστοιχεί στη μέγιστη ποσότητα και η οποία παράχθηκε στις 30 ώρες ζύμωσης ενώ ο συντελεστής απόδοσης που εκφράζει αυτή η ποσότητα είναι $Y_{EtOH/S}=0,28$ g EtOH/g S (S=υποστρώματος).

Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρήθηκε η παραγωγή γλυκερόλης αλλά σε πολύ μικρή ποσότητα. Η μέγιστη συγκέντρωση της γλυκερόλης έφθασε τα 1,91 g/L και σημειώθηκε κατά την 30^η ώρα.

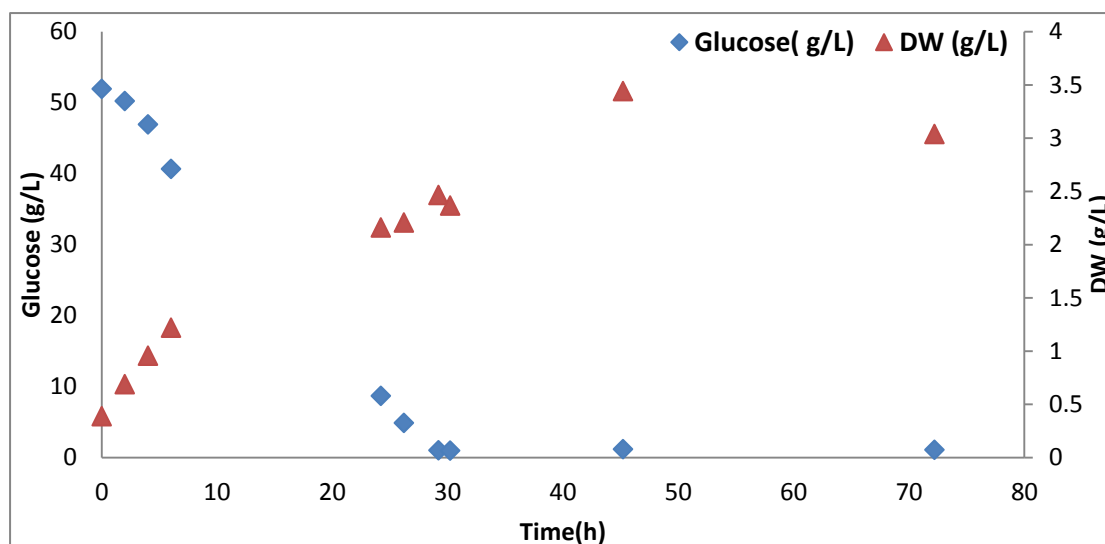
Παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη τιμή της αιθανόλης πρόέκυψε τη χρονική περίοδο που ο μ/ος έχει καταναλώσει σχεδόν όλο το σάκχαρο και έχει παράξει τη μέγιστη ποσότητα αιθανόλης για το πείραμα αυτό.



Διάγραμμα 8.1.2.37: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται ότι, κατά τις πρώτες ώρες του φαινομένου, ο μικροοργανισμός συσσωρεύει τις μέγιστες τιμές του σε **ενδοπολυσακχαρίτες**. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη τιμή των ενδοπολυσακχαριτών φτάνει το 37,8% w/w. Μετά απ' αυτό το σημείο παρατηρείται πτώση τους ενώ φθάνουν στο τέλος της ζύμωσης να καταγράφουν το 22,2% w/w.

8.1.3. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

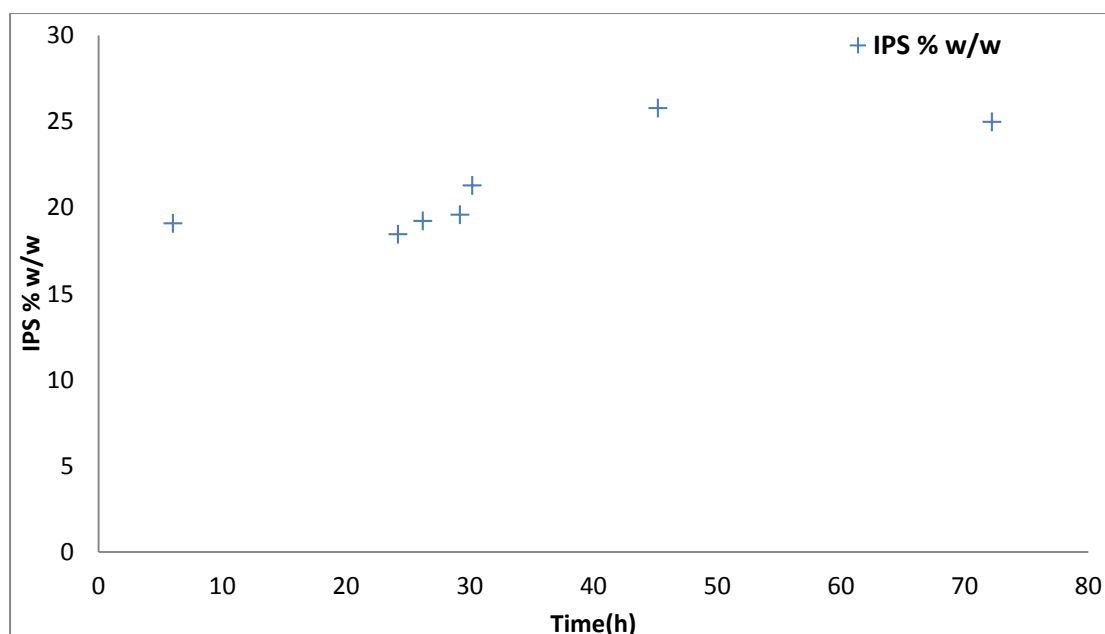


Διάγραμμα 8.1.3.38: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Θ1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία με απότομη άνοδο κατά τη χρονική περίοδο που παρατηρείται απότομη πτώση των σακχάρων. Η βιομάζα αυξάνεται σταθερά για αρκετές ώρες και έπειτα διαπιστώνεται ότι στο τελευταίο σημείο υπάρχει πτώση της, με μέγιστη τιμή για το πείραμα αυτό τα 3,44 g/L.



Διάγραμμα 8.1.3.39: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται ότι κατά τις πρώτες ώρες του φαινομένου ο μικροοργανισμός δίδει τις μέγιστες τιμές του σε **ενδοπολυσακχαρίτες**. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη τιμή των ενδοπολυσακχαριτών φθάνει το 25,79% w/w και σημειώνεται στις 45 ώρες . Μετά απ' αυτό το σημείο παρατηρείται πτώση τους ενώ προσεγγίζοντας το τέλος της ζύμωσης δίδει ως τελική τιμή τα 24,99% w/w.

Πίνακας 8.1.3.24: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες (50 g γλυκόζη). (Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε φιάλες των 250 mL , T= 30±1, ανάδευση 140±5)

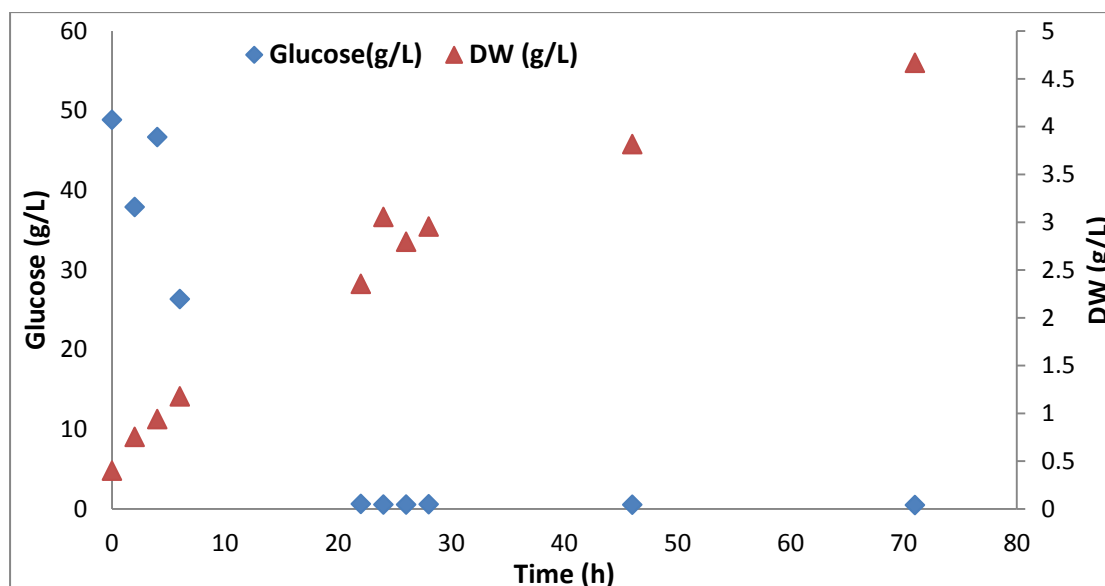
Time	Glucose	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol	EtOH (KIT)	Y _{EtOH}
24,2	8,72	43,25	9,01	0,21	1,37	-	-
26,2	4,9	47,07	15,8	0,34	2,09	21,2	0,45
29,2	1,04	50,93	7,82	0,15	1,03	-	-
30,2	1	50,98	9,67	0,19	1,31	-	-
45,2	1,2	50,77	-	-	-	-	-
72,2	1,13	50,84	-	-	-	-	-

Στον παραπάνω πίνακα περιγράφεται η κινητική του στελέχους **Θ1**. Στο πείραμα αυτό ο μ/ος επέτυχε να παράγει 15,8 g/L αιθανόλης που αντιστοιχεί στη μέγιστη ποσότητα και η οποία παράχθηκε στις 26 ώρες ζύμωσης ενώ ο συντελεστής

μέγιστης απόδοσης που εκφράζει αυτή η ποσότητα είναι $Y_{EtOH/S}=0,34$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος). Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρήθηκε η παραγωγή γλυκερόλης αλλά σε πολύ μικρή ποσότητα. Η μέγιστη συγκέντρωση της γλυκερόλης έφτασε τα 2,09 g/L και σημειώθηκε κατά την 26^η ώρα και μέχρι το τέλος της ζύμωσης αυτή παρέμεινε σχετικά σταθερή.

Παρατηρήθηκε ότι, η μέγιστη τιμή της αιθανόλης πρόεκυψε τη χρονική περίοδο που ο μ/ος έχει καταναλώσει σχεδόν όλο το σάκχαρο και έχει παράξει τη μέγιστη ποσότητα αιθανόλης για το πείραμα αυτό.

8.1.4 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

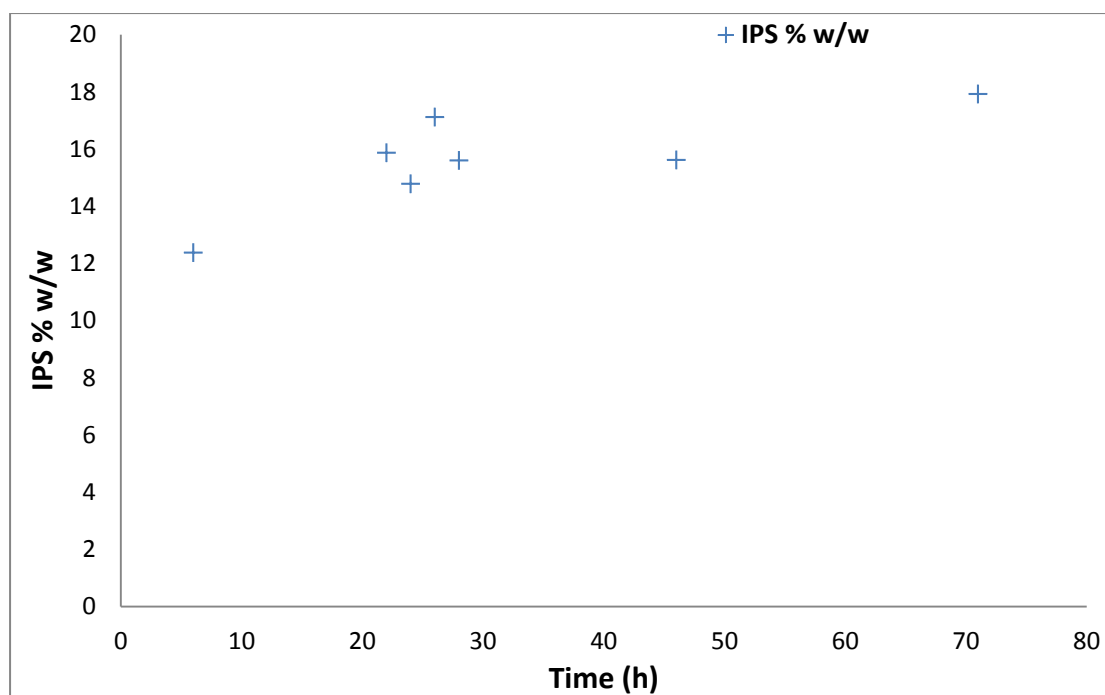


Διάγραμμα 8.1.4.40: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Δ3

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για το μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Δ3. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία η οποία έχει απότομη άνοδο κατά τη χρονική περίοδο που παρατηρείται απότομη πτώση των **σακχάρων**. Η βιομάζα αυξάνεται σταθερά για αρκετές ώρες και στο τελευταίο σημείο έχει τη μέγιστη τιμή, η οποία φθάνει τα 4,67 g/L.



Διάγραμμα 8.1.4.41: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται ότι κατά τις πρώτες ώρες του φαινομένου ο μικροοργανισμός συσσωρεύει χαμηλές τιμές σε ενδοπολυσακχαρίτες ενώ όσο πλησιάζει η περάτωση του φαινομένου παρατηρείται μια αύξηση. Πιο συγκεκριμένα, στο σημείο του εμβολιασμού έχουμε την ελάχιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών (12,38% w/w) ενώ προς το τέλος της ζύμωσης σημειώνεται εκ νέου αύξηση και η τελική τους τιμή είναι 17,92% w/w.

Πίνακας 8.1.4.25: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

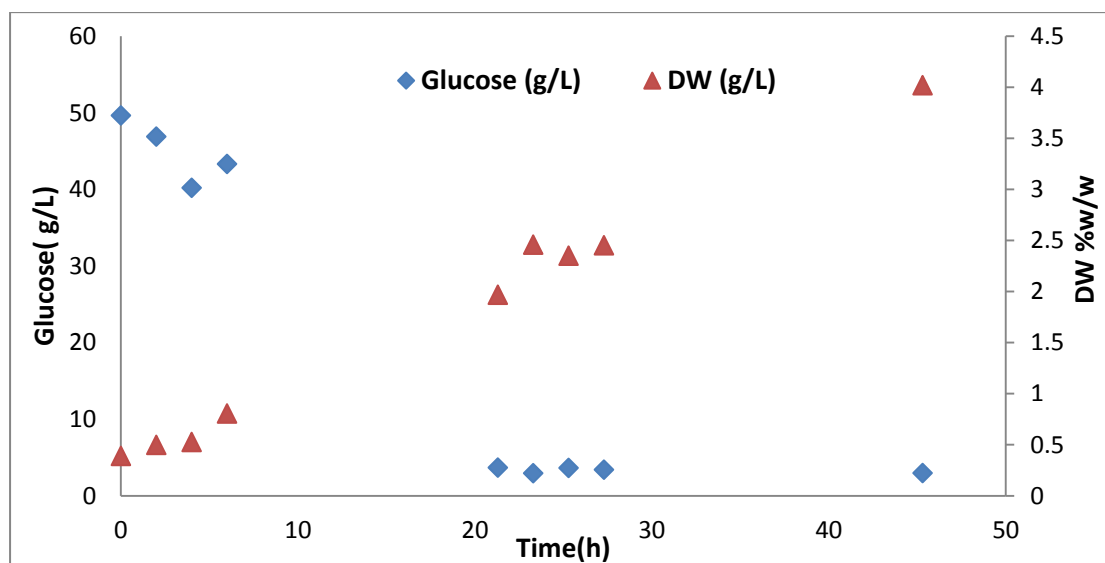
Time(h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH(g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH(g/L) (KIT)	Y _{EtOH}
22	0,63	48,24	15,97	0,33	0,18	24,06	0,5
24	0,54	48,33	15,38	0,32	1,83	16,35	0,34
26	0,54	48,33	9,12	0,19	0,91	24,06	0,5
28	0,59	48,27	-	-	-	-	-
46	0,53	48,39	15,15	0,31	1,66	-	-

Στον παραπάνω πίνακα περιγράφεται η κινητική του στελέχους Δ3. Στο πείραμα αυτό ο μ/ος επέτυχε να παράγει 15,97 g/L αιθανόλης που αντιστοιχεί στη μέγιστη ποσότητα και η οποία παράχθηκε στις 22 ώρες ζύμωσης και ο συντελεστής μέγιστης απόδοσης που εκφράζει αυτή η ποσότητα είναι $Y_{EtOH/S}=0,33$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος). Κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης παρατηρήθηκε η παραγωγή γλυκερόλης σε πολύ μικρή ποσότητα όμως. Η μέγιστη συγκέντρωση της

γλυκερόλης έφτασε τα 1,83 g/L και σημειώθηκε κατά την 24^η ώρα και μέχρι το τέλος της ζύμωσης αυτή παρέμεινε σχετικά σταθερή.

Παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη τιμή της αιθανόλης πρόεκυψε τη χρονική περίοδο που ο μ/ος έχει καταναλώσει σχεδόν όλο το σάκχαρο και έχει παράξει τη μέγιστη ποσότητα αιθανόλης για το πείραμα αυτό.

8.1.5 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

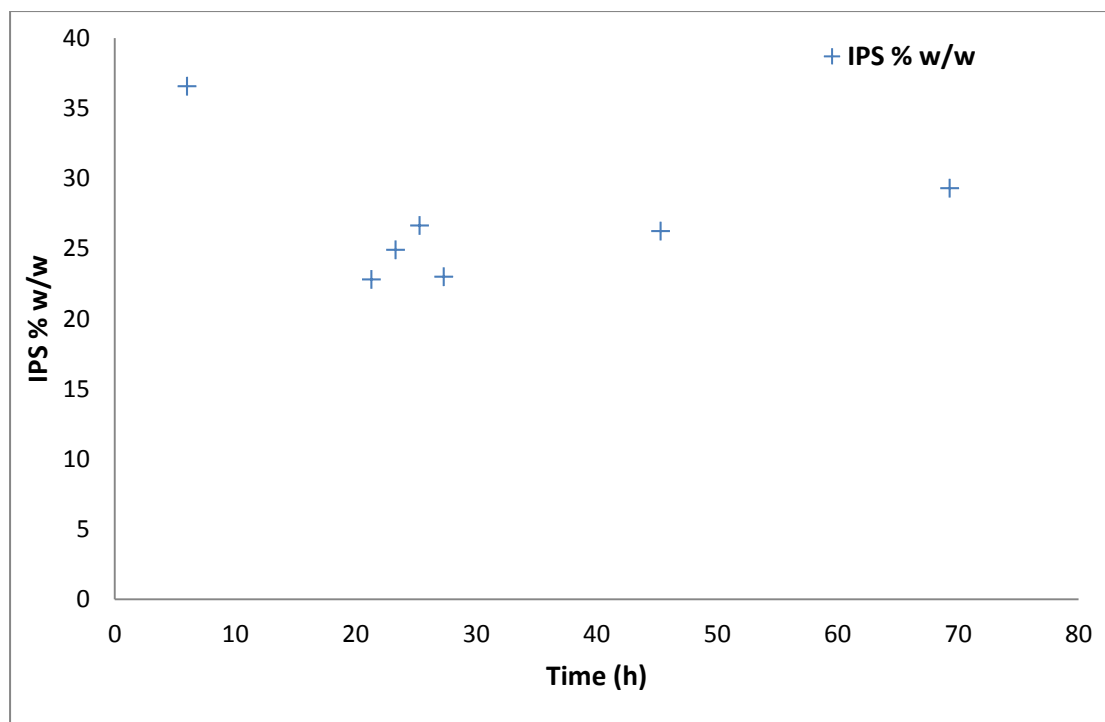


Διάγραμμα 8.1.5.42: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* B1

Στο παρόν διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για το μικροοργανισμό *S. cerevisiae* B1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως αφήνοντας ο μικροοργανισμός αζύμωτα 2,98 g/L σακχάρων με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει ανοδική πορεία η οποία έχει άνοδο κατά τη χρονική περίοδο που παρατηρείται απότομη πτώση των σακχάρων. Η βιομάζα αυξάνεται σταθερά για αρκετές ώρες φτάνοντας στο τελευταίο σημείο στο οποίο επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή για το στέλεχος αυτό 4,02 g/L.



Διάγραμμα 8.1.5.43: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η μέγιστη ποσότητα **ενδοπολυσακχαριτών** στην αρχή της ζύμωσης ήταν 36,57% w/w ενώ η ποσότητα μειώθηκε φθάνοντας στο τέλος τα 29,31 % w/w.

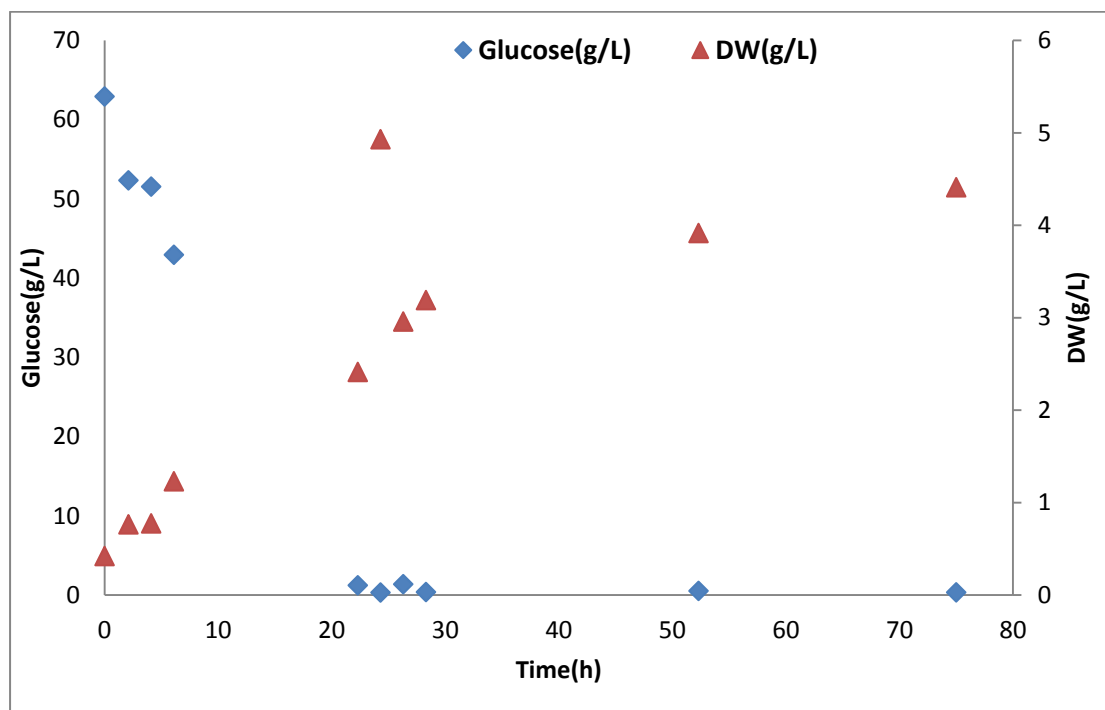
Πίνακας 8.1.5.26: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* B1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH(g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH (g/L) (KIT)	Y _{EtOH}
21,3	3,68	45,95	13,29	0,29	1,33	5,07	0,11
23,3	2,96	46,68	8,72	0,19	1,23	11,09	0,24
25,3	4	46	7,18	0,16	0,74	7,52	0,24
27,3	3,64	46	6,42	0,14	0,7	-	-
45,3	3,41	46,22	-	-	-	-	-
69,3	2,98	46,66	-	-	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 13,29 g/L με Y_{EtOH/S}=0,29 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 1,33 g/L (21 ώρες).

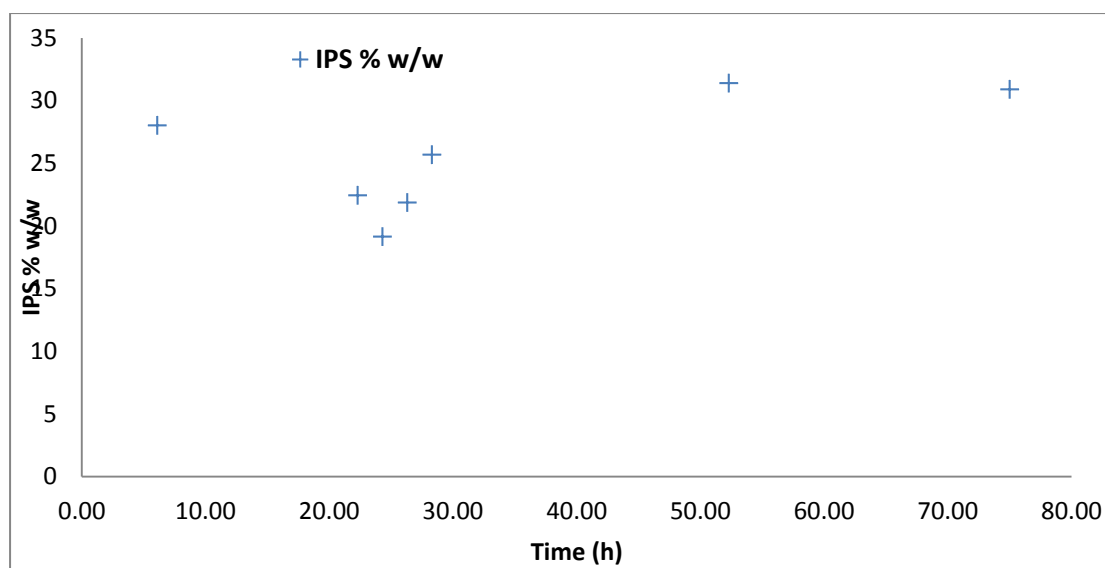
8.1.1.1 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.1.44: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* E1A. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 4,93 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.1.45: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει πως: Η μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών, (31,40 %) εμφανίζεται ~στις 52 ώρες ζύμωσης ενώ η ποσότητα πέφτει μέχρι την τιμή 30,9 % στο τέλος του πειράματος.

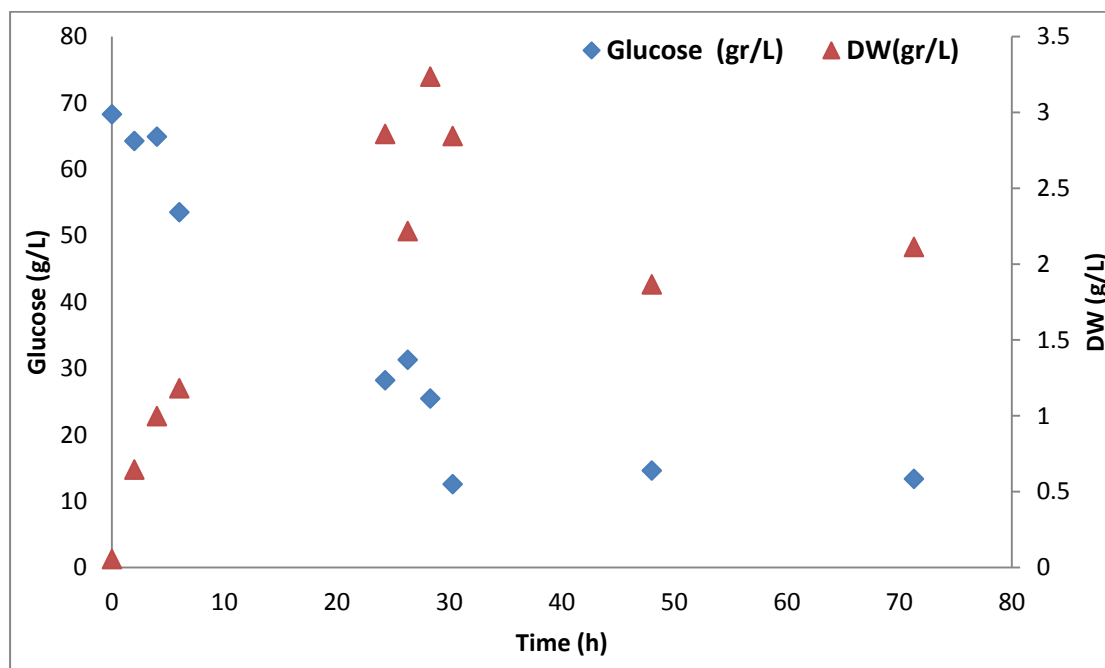
Πίνακας 8.1.1.1.27: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* E1A σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH(g/L) (KIT)	Y _{EtOH}
22,3	1,23	61,68	3,03	0,05	0,59	3,2	0,05
24,3	0,33	62,58	7,84	0,13	2,14	11,4	0,18
26,3	1,36	61,55	6,68	0,11	0,63	-	-
28,3	0,38	62,54	-	-	-	6,58	0,11
52,3	0,51	62,40	13,55	0,22	0,97	-	-
75	0,34	62,57	-	-	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 13,55 g/L με Y_{EtOH/S}=0,22 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,14 g/L (~24 ώρες)

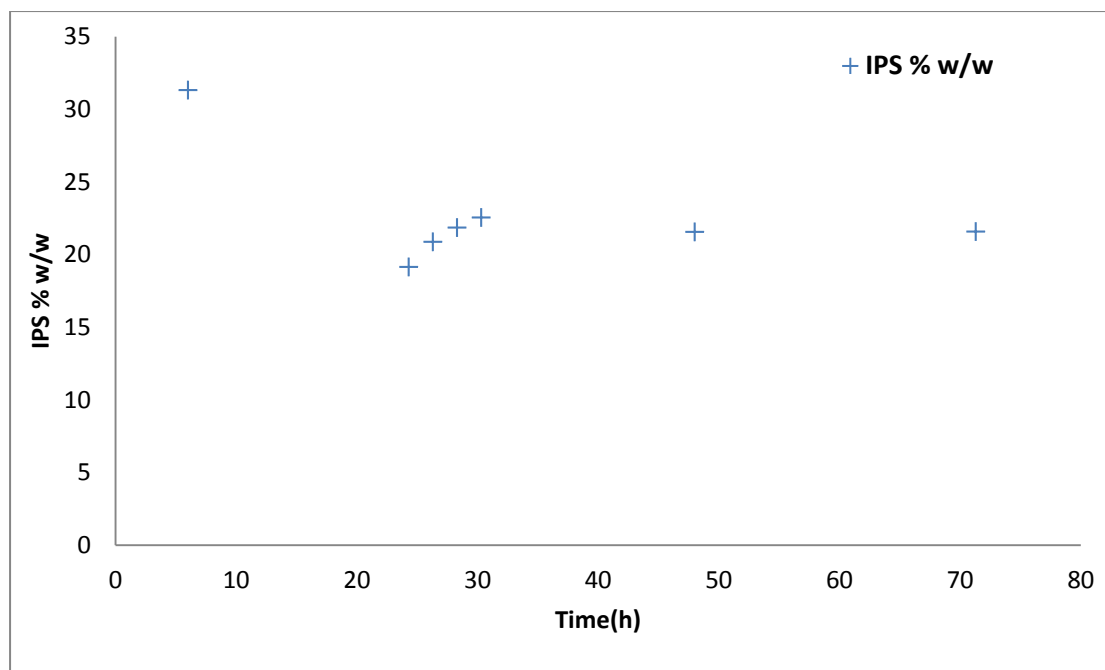
8.1.1.2. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.2.46: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Γ2

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Γ2. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως αφήνοντας αζύμωτα 13,36 g/L σακχάρων με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 3,24 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.2.47: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών στα 31,33 % στις πρώτες ώρες της ζύμωσης ενώ η ποσότητα μειώνεται μέχρι το τέλος που φτάνει 21,59 %.

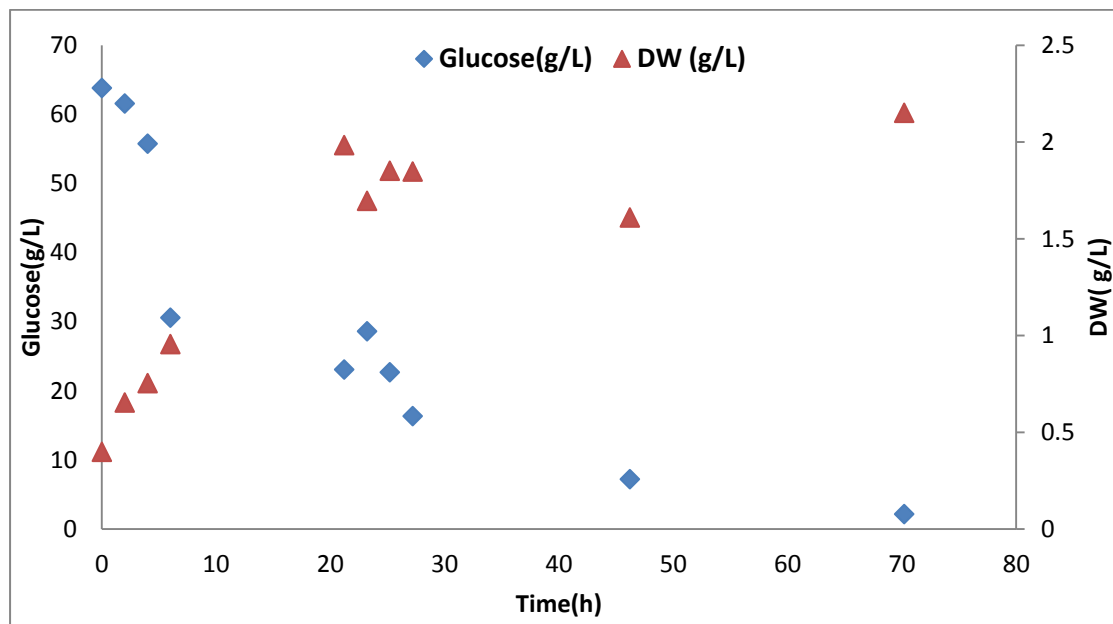
Πίνακας 8.1.1.2.28: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες (70 g γλυκόζη). (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time	Glucose	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol
24,3	28,21	40,07	8,18	0,20	0,84
26,3	31,3	36,98	-	-	-
28,3	25,47	42,81	12,98	0,30	1,44
30,3	12,56	55,72	6,16	0,11	0,7
48	14,6	53,68	-	-	-
71,3	13,36	54,92	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 12,98 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,30$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 1,44 g/L (33 ώρες).

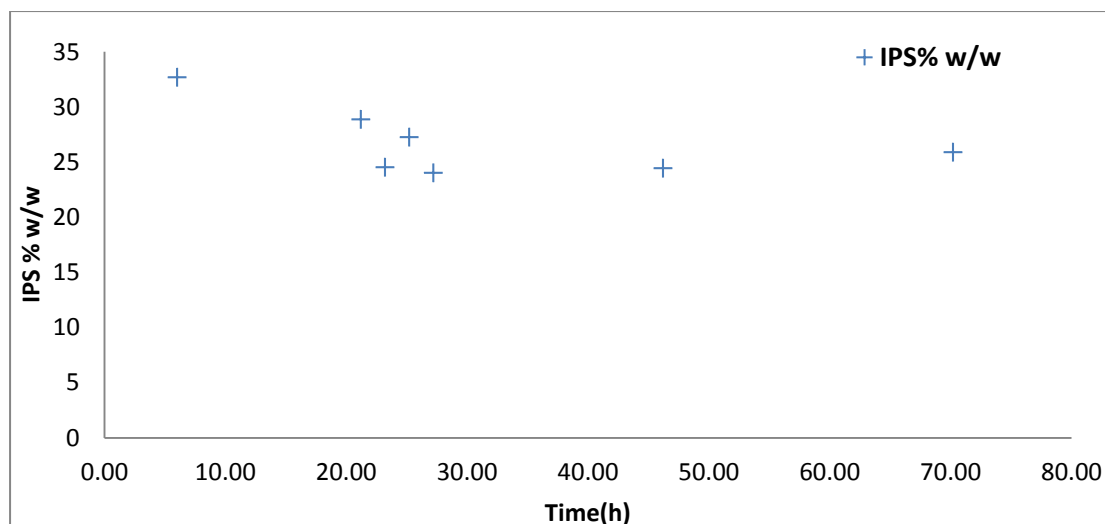
8.1.1.3 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.3.48: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Θ1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως κι ο μικροοργανισμός αφήνει αζύμωτα 2,17 g/L σακχάρων με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 2,15 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.3.49: Ποσοστά των **ενδοπολυσακχαριτών** στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών μετράται στις πρώτες ώρες της ζύμωσης (32,69 % w/w) ενώ η ποσότητα αυτών μειώνεται ως την τιμή 25,90 % w/w.

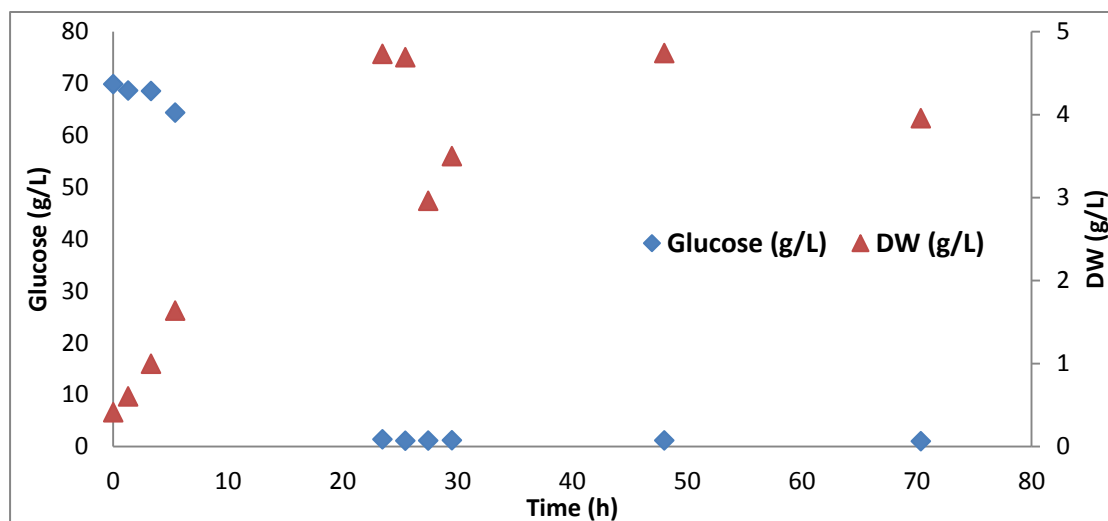
Πίνακας 8.1.1.3.29: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL , T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time(h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
21,2	23,08	40,75	7,15	0,18	1,33
23,2	28,63	35,20	11,54	0,33	0,81
25,2	22,69	41,14	8,28	0,20	1,47
27,2	16,36	47,47	-	-	-
46,2	7,23	56,60	12,07	0,21	2,21
70,2	2,17	61,66	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 12,07 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,21$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,21 g/L (46 ώρες).

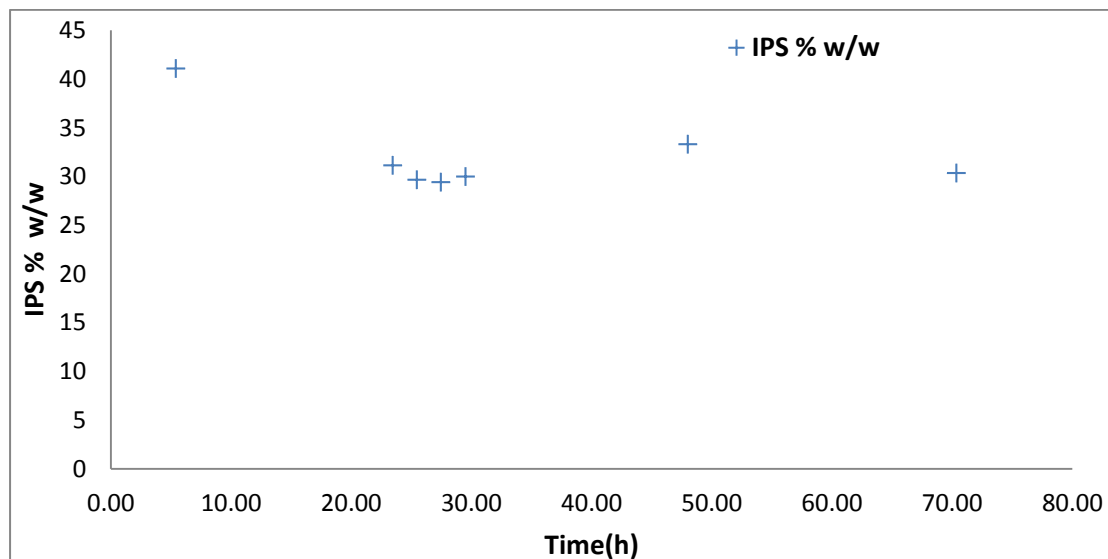
8.1.1.4 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.4.50: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Δ3

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Δ3. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** δίδει μέγιστη τιμή στα 4,74 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.4.51: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών στις πρώτες ώρες της ζύμωσης 41,08 % w/w ενώ η ποσότητα πέφτει και στο τέλος έχουμε 30,35 % w/w .

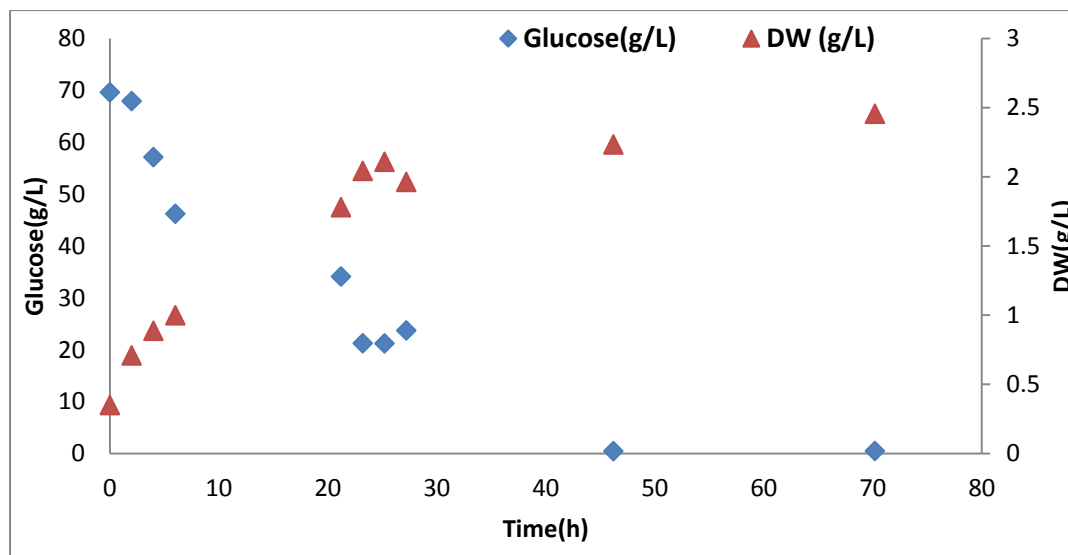
Πίνακας 8.1.1.4.30: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
23,45	1,39	68,50	9,29	0,14	1,28
25,45	1,13	68,76	19,01	0,28	2,74
27,45	1,17	68,73	12,70	0,18	1,90
29,50	1,20	68,69	9,72	0,14	1,52
48	1,17	68,72	-	-	-
70,35	1,04	68,86	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 19,01 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,28$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,74 g/L (~26 ώρες).

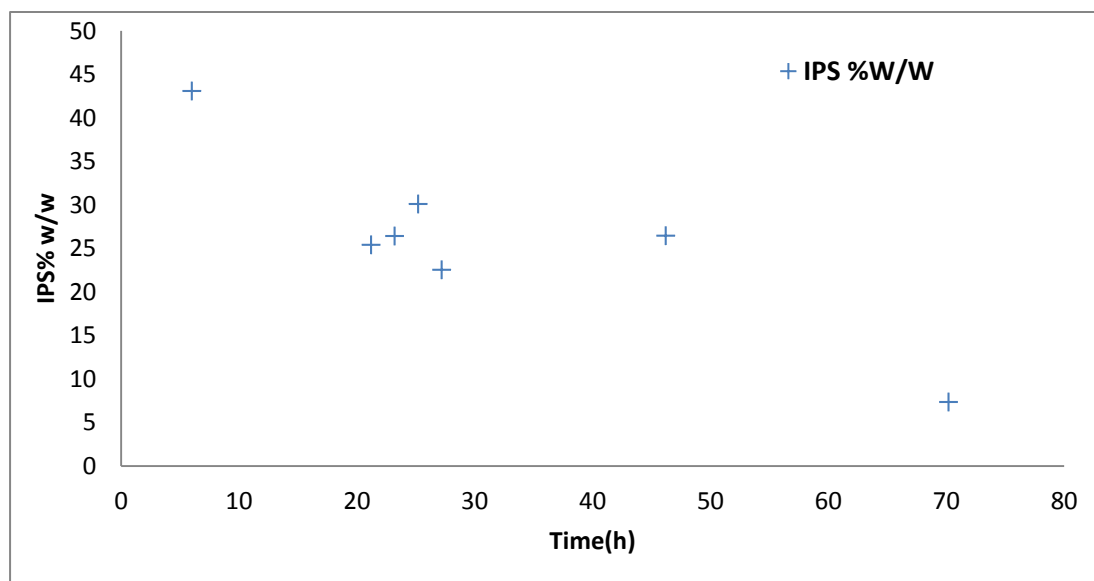
8.1.1.5. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.5.52: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* B1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* E1A. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** εμφανίζει μέγιστη τιμή στα 2,46 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.5.53: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα **ενδοπολυσακχαριτών** στις πρώτες ώρες της ζύμωσης 43,1 % ενώ η ποσότητα μειώνεται μέχρι τα 7,37 %.

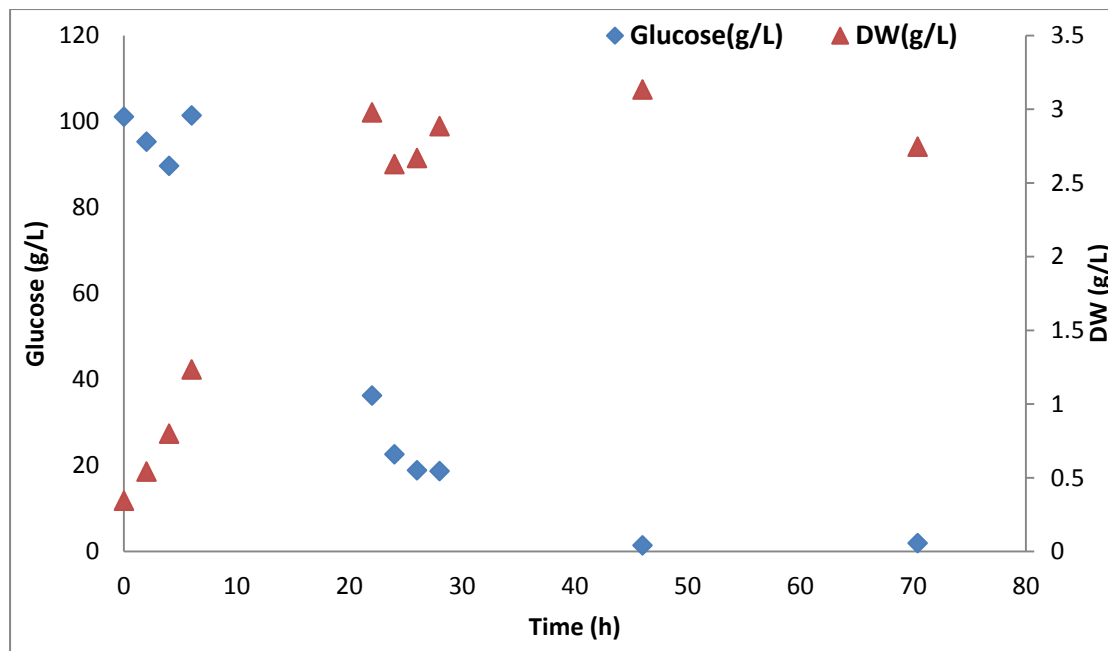
Πίνακας 8.1.1.5.31: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* B1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time(h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (HPLC) (g/L)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH(g/L) (KIT)	Y _{EtOH}
21,2	34,12	35,53	5,72	0,16	0,98	10,53	0,30
23,2	21,27	48,37	13,29	0,27	0,32	12,22	0,25
25,2	21,23	48,42	9,66	0,2	1,81	-	-
27,2	23,73	45,92	15	0,33	2,69	-	-
46,2	0,46	69,18	-	-	-	-	-
70,2	0,50	69,14	-	-	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 15 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,33$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,69 g/L (~24 ώρες).

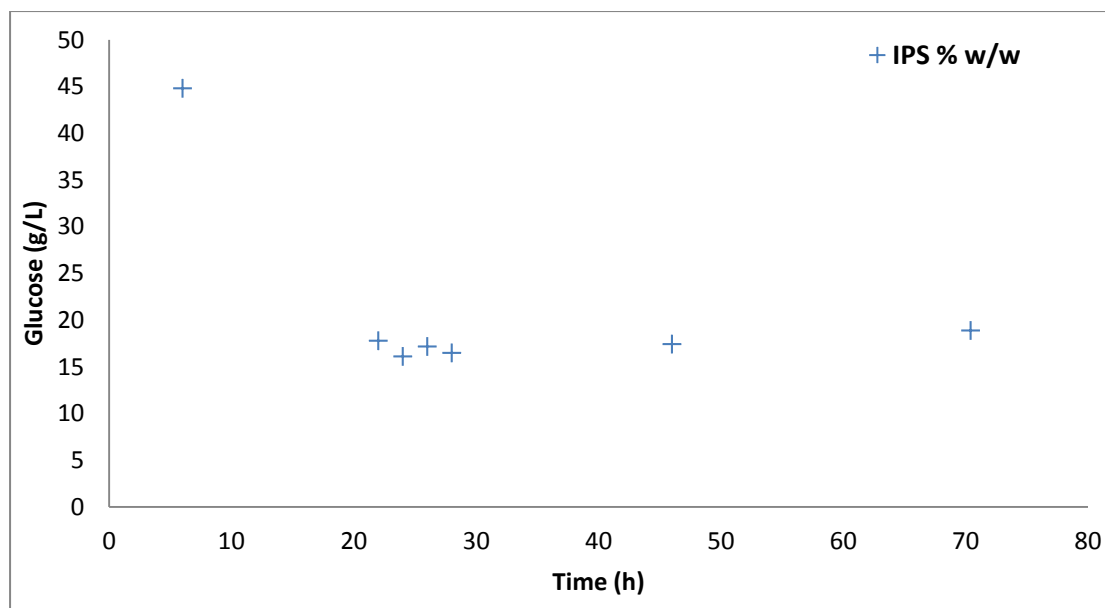
8.1.1.1.1. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.1.1.54: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* E1A. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 3,14 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.1.155: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών % στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης 44,83 % w/w ενώ η ποσότητα ελαττώνεται και στο τέλος έχουμε 18,9 % w/w.

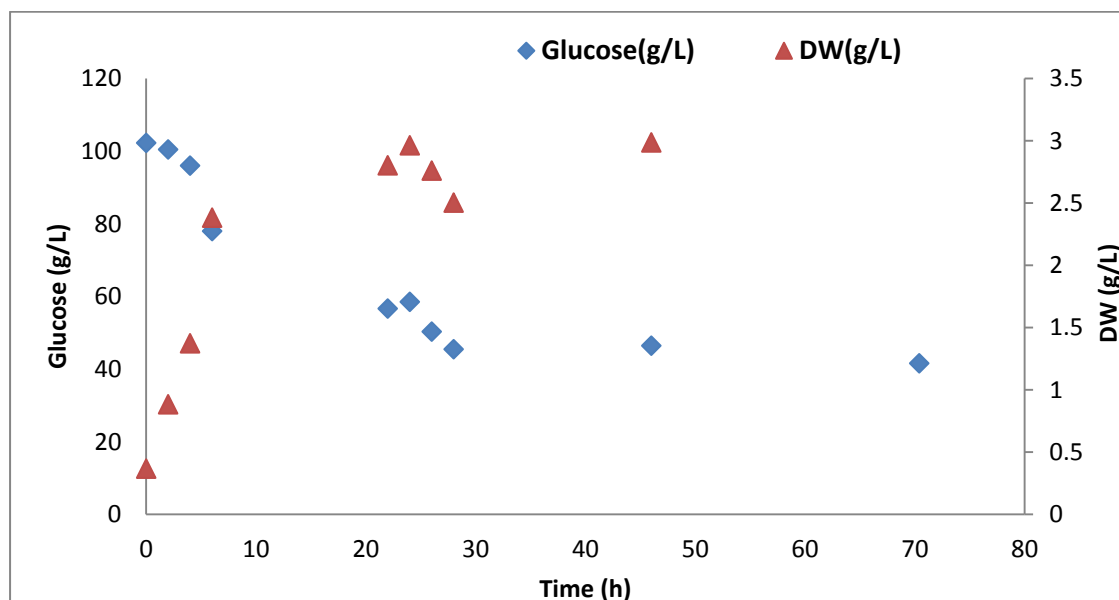
Πίνακας 8.1.1.1.132: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* E1A σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22	36,29	64,84	-	-	-
24	22,61	78,52	11,12	0,14	2,58
26	18,89	82,25	26,32	0,32	5,64
28	18,72	82,41	27,22	0,33	5,62
46	1,45	99,68	32,97	0,33	5,87
70,4	1,96	99,17	20,14	0,20	4,51

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα αιθανόλης 32,97 g/L με Y_{EtOH/S}=0,33 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα γλυκερόλης 5,87 g/L (46 ώρες).

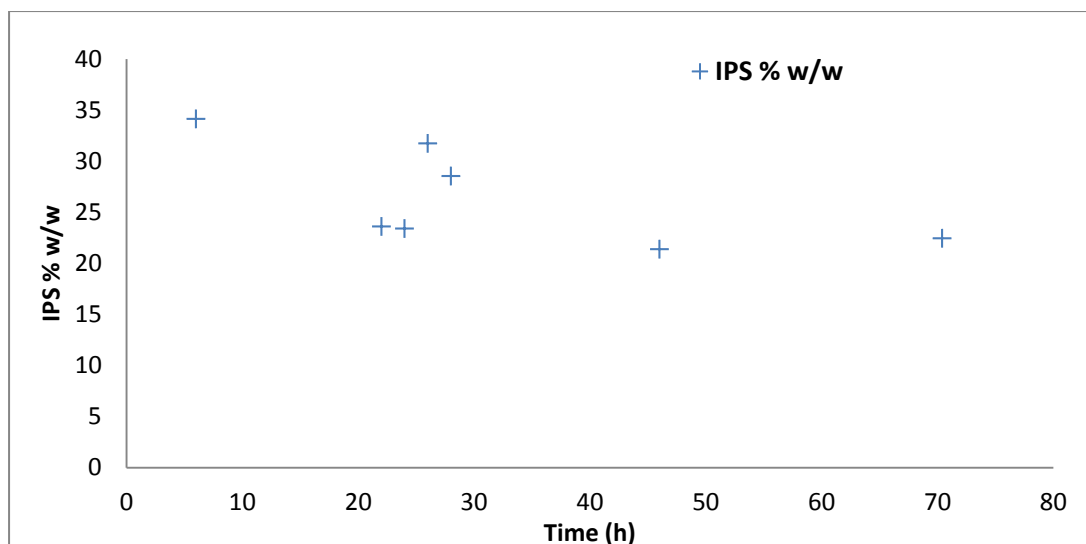
8.1.1.1.2 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.1.2.56: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Γ2

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Γ2. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως κι ο μικροοργανισμός αφήνει αζύμωτα 41,6 g/L σακχάρων με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** δίδει μέγιστη τιμή τα 2,99 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.1.2.57: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης 34,14 % w/w ενώ η ποσότητα πέφτει και στο τέλος έχουμε 22,46 % w/w.

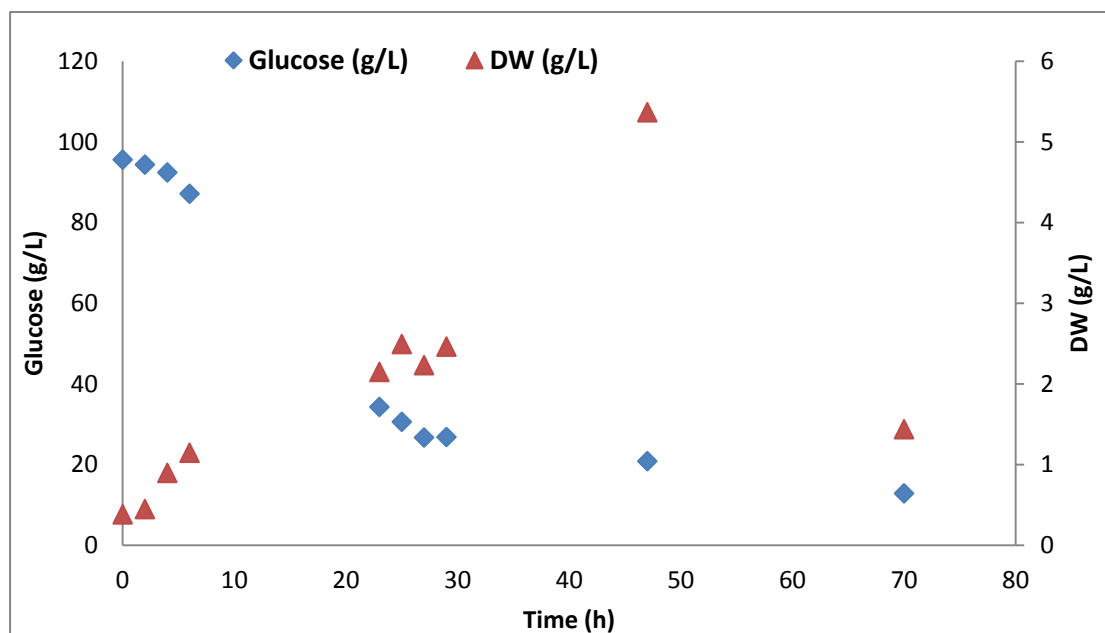
Πίνακας 8.1.1.1.2.33: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH(g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH (g/L) (KIT)	Y _{EtOH}
22	56,64	45,60	-	-	-	-	-
24	58,51	43,73	6,86	0,15	1,03	11,28	0,26
26	50,32	51,92	16,41	0,32	3,01	16,35	0,31
28	45,45	56,79	17,38	0,31	3,20	19,17	0,34
46	46,45	55,79	17,24	0,31	3,41	-	-
70,4	41,60	41,60	8,73	0,14	1,28	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 17,38 g/L με Y_{EtOH/S}=0,31 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 3,41 g/L (46 ώρες).

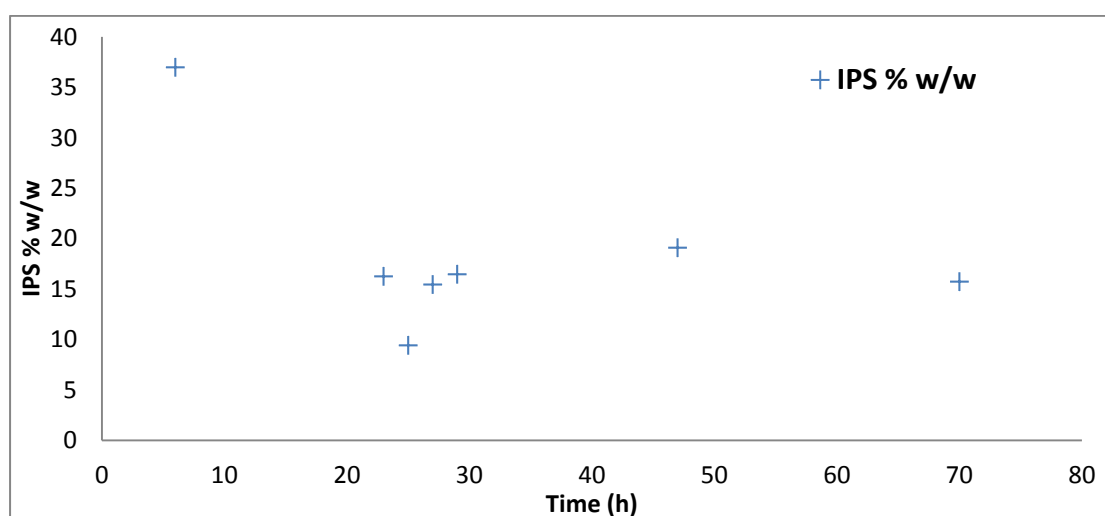
8.1.1.1.3 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.1.3.58: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Θ1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως κι ο μικροοργανισμός αφήνει αζύμωτα 12,87 g/L σακχάρων με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** εμφανίζει μέγιστη τιμή τα 5,37 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.1.3.59: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης 36,98 % w/w ενώ η ποσότητα πέφτει και στο τέλος έχουμε 15,73 % w/w.

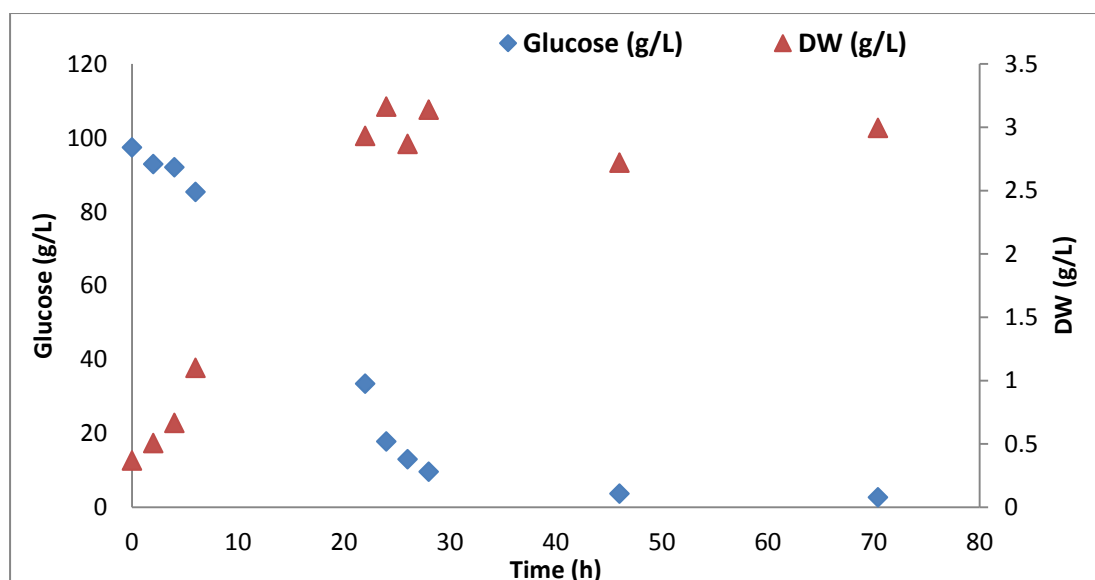
Πίνακας 8.1.1.1.3.34: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL , T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
23	34,32	61,28	-	-	-
25	30,62	65	10,20	0,16	2,30
27	26,72	68,9	24,17	0,35	5,24
29	26,86	68,75	16,99	0,25	3,01
47	20,88	74,73	13,63	0,18	3,31
70	12,87	82,74	27,24	0,33	6,16

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως:

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 27,24 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,33$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 6,16 g/L (70 ώρες).

8.1.1.1.4.: Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

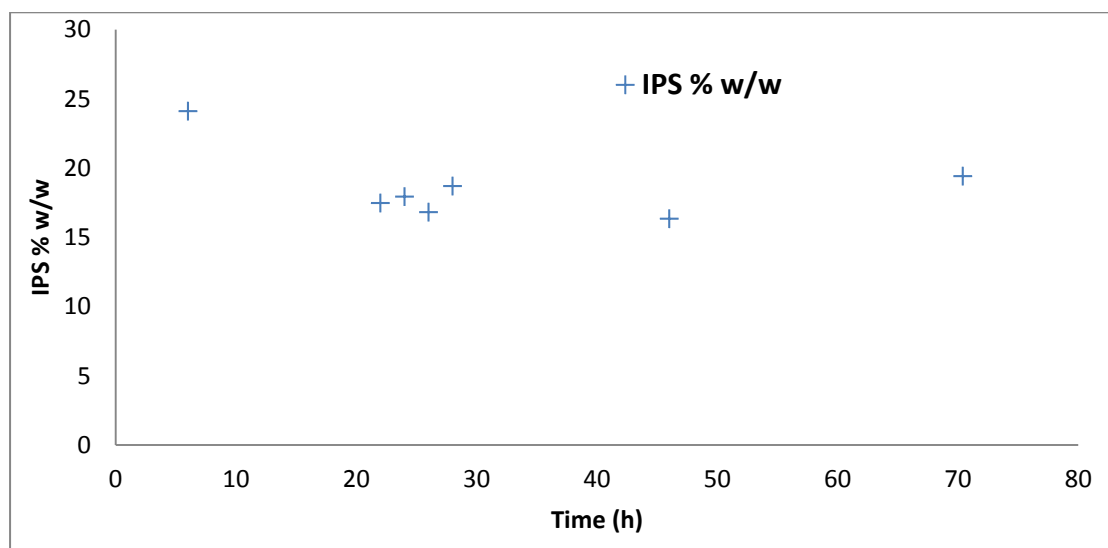


Διάγραμμα 8.1.1.1.4.60: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Δ3

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Δ3. Διαπιστώνεται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως αφήνοντας ο μικροοργανισμός αζύμωτα 2,69 g/L σακχάρων με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 3,16 g/L



Διάγραμμα 8.1.1.4.61: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης 24,11 % w/w ενώ η ποσότητα ελαττώνεται και στο τέλος έχουμε 19,42 % w/w.

Πίνακας 8.1.1.4.35: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. Cerevisiae* Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

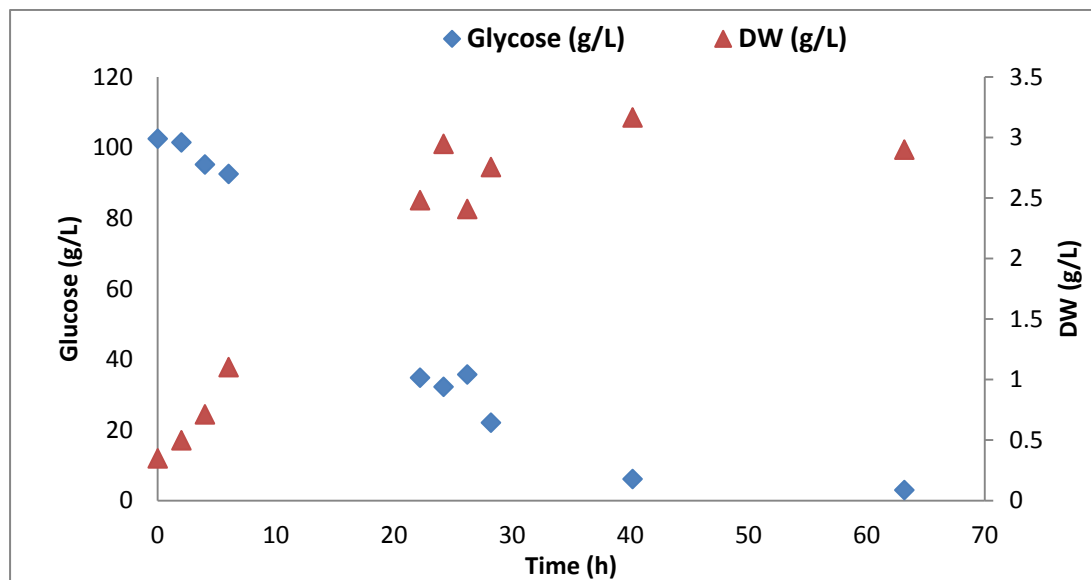
Time(h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol(g/L)
22	33,45	63,96	-	-	-
24	17,81	79,60	12,25	0,15	1,76
26	13,01	84,41	16,77	0,2	3,20
28	9,64	87,77	32,51	0,37	5,39
46	3,69	93,73	30,54	0,33	6,65
70,4	2,69	94,73	13,85	0,15	4,97

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 32,51 g/L με Y_{EtOH/S}=0,37 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).

- Μέγιστη ποσότητα γλυκερόλης 6,65 g/L (46 ώρες).

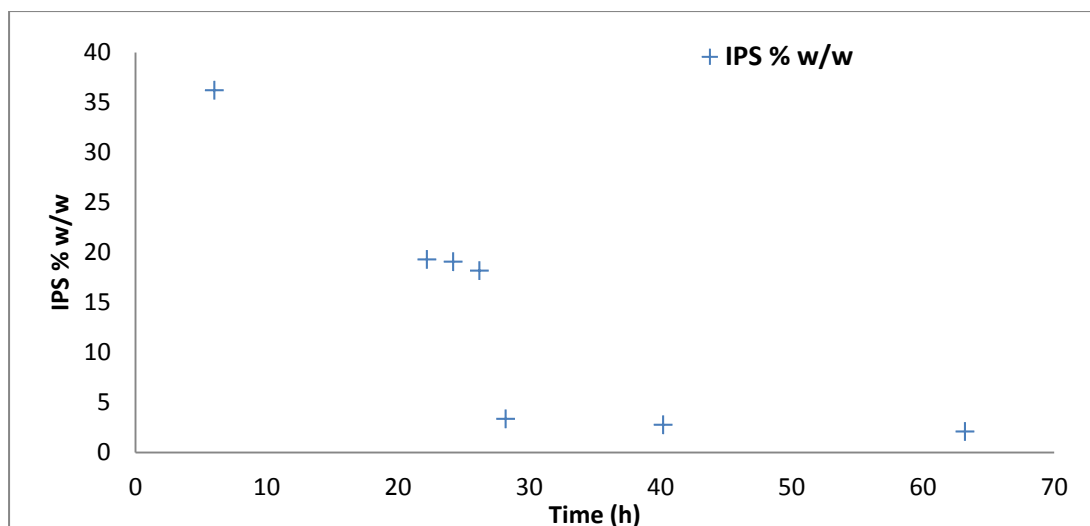
8.1.1.1.5. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.1.1.1.5.62: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* B1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* B1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως αλλά ο μικροοργανισμός αφήνει αζύμωτα 3 g/L σακχάρων με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 3,17 g/L.



Διάγραμμα 8.1.1.1.5.63: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών (%) στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης 36,23 % w/w ενώ η ποσότητα μειώνεται μέχρι τα 2,1 % w/w.

Πίνακας 8.1.1.1.5.36: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* B1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

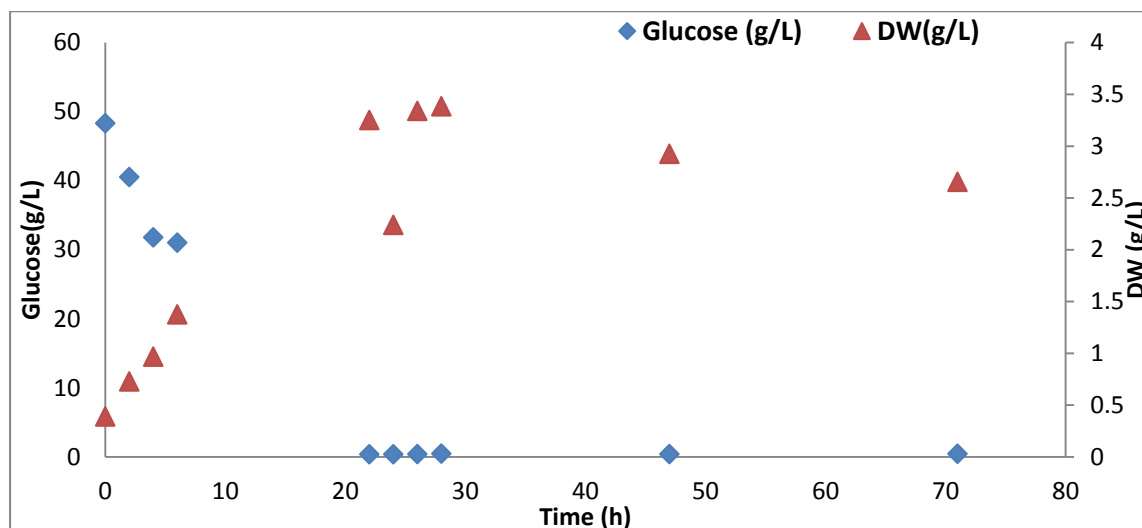
Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22,2	34,84	67,65	-	-	-
24,2	32,22	70,28	11,35	0,16	2,34
26,2	35,75	66,75	12,35	0,18	2,53
28,2	22,08	80,42	29,46	0,37	5,47
40,2	6,12	96,37	31,54	0,33	6,54
63,2	3	99,5	30,22	0,30	6,63

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 31,54 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,33$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 6,63 g/L (63 ώρες).

8.2. Αναερόβιες Συνθήκες

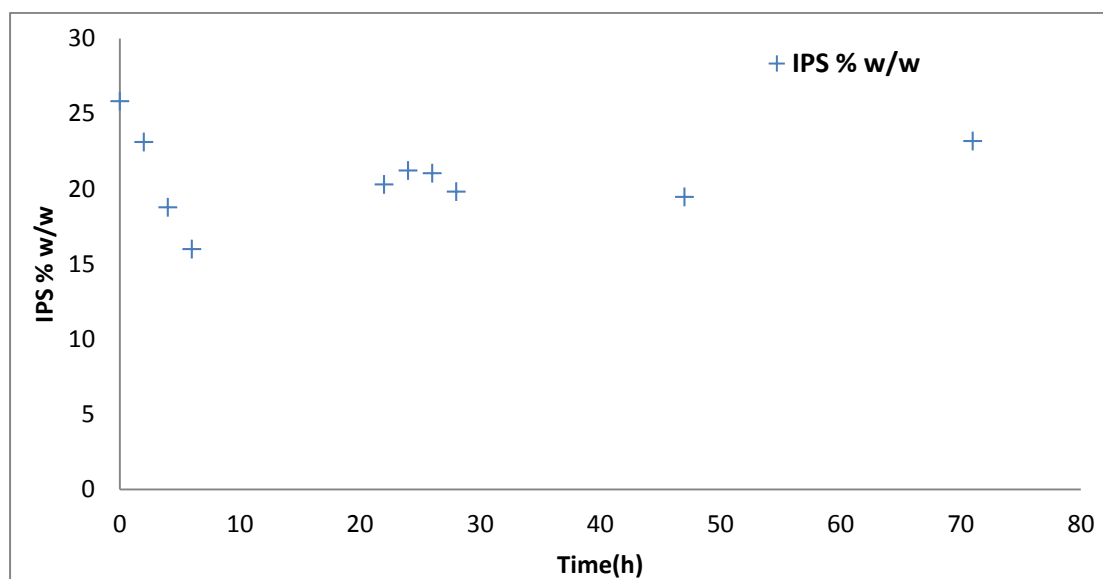
8.2.1. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.1.64: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* E1A. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 3,39 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.65: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών 25,83 % w/w στην αρχή της ζύμωσης ενώ η ποσότητα μειώνεται και στο τέλος λαμβάνουμε 23,18 % w/w.

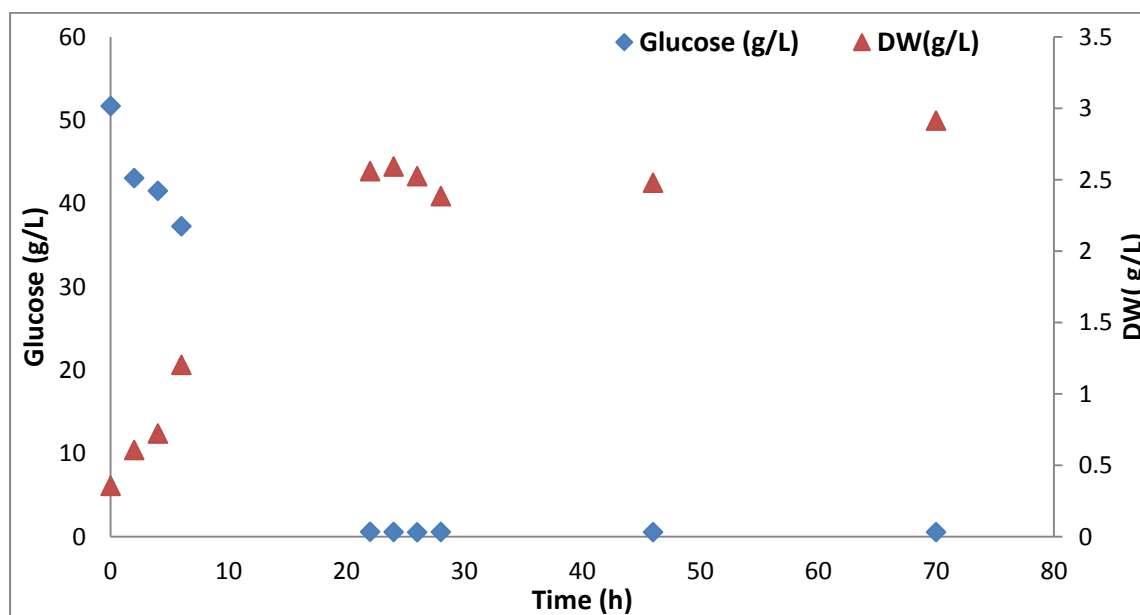
Πίνακας 8.2.1.37: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* E1A σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22	0,38	47,94	7,95	0,17	1,23
24	0,38	47,94	6,62	0,14	0,81
26	0,41	47,91	-	-	-
28	0,47	47,86	9,74	0,20	1,06
47	0,41	47,91	20,46	0,43	1,74
71	0,44	47,88	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 20,46 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,43$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 1,74 g/L (47 ώρες) .

8.2.2. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

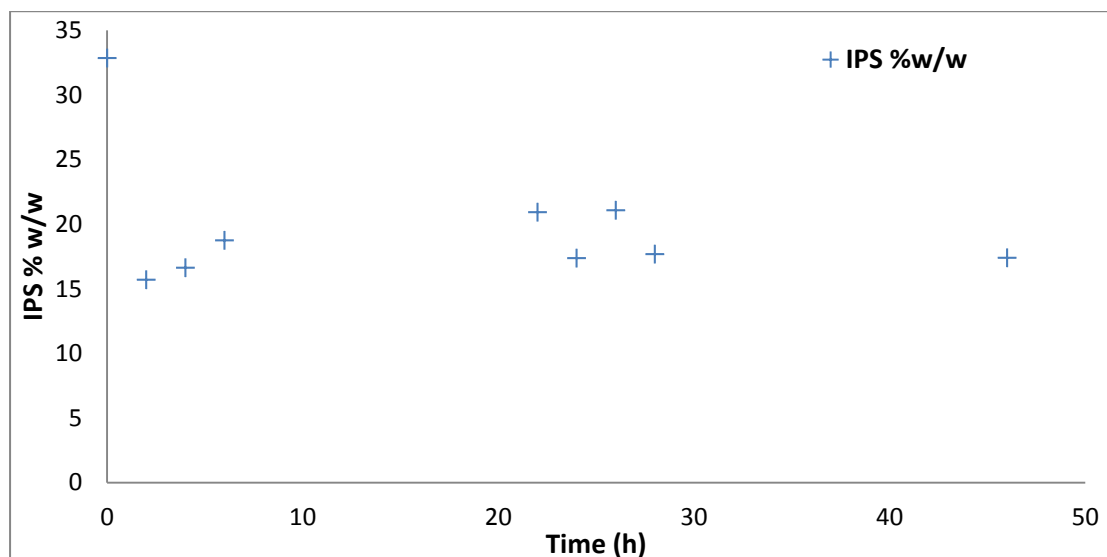


Διάγραμμα 8.2.2.66: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Γ2

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Γ2. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή της στα 2,92 g/L.



Διάγραμμα 8.2.2.67: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η μέγιστη ποσότητα **ενδοπολυσακχαριτών** το 32,85 % παρατηρήθηκε στην αρχή της ζύμωσης εν συνεχεία η ποσότητα μειώνεται ως το 17,40 % .

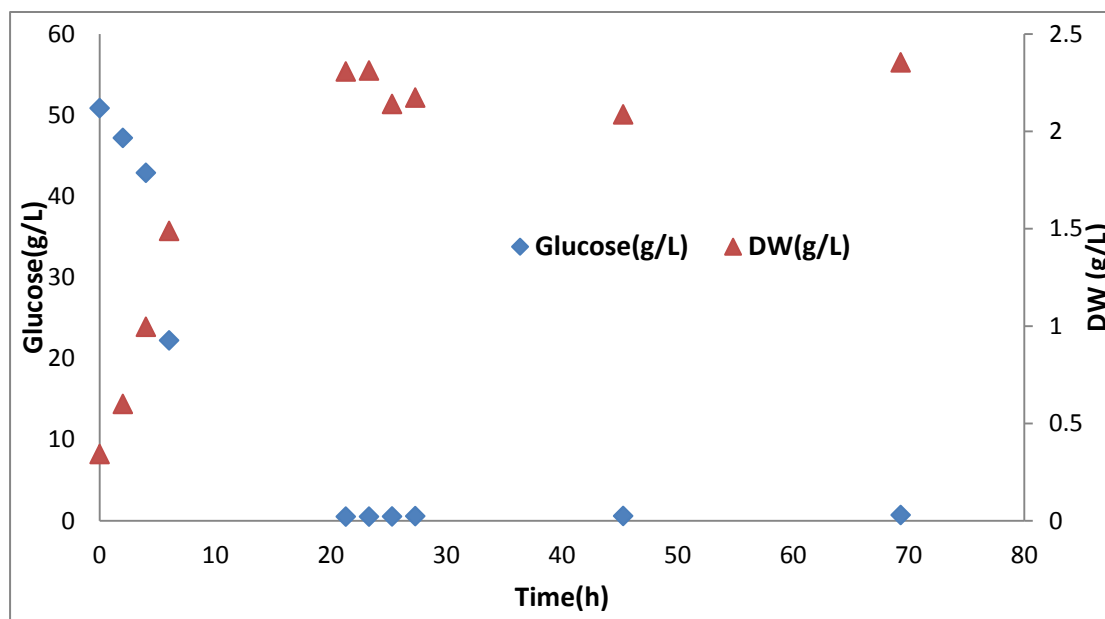
Πίνακας 8.2.2.38: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL , T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time	Glucose	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (HPLC) (g/L)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH (KIT)	Y _{EtOH}
22	0,60	51,12	9,13	0,18	0,66	-	-
34	0,58	51,14	10,26	0,20	0,78	13,91	0,27
26	0,54	51,18	-	-	-	11,65	0,23
28	0,57	51,15	8,79	0,17	0,65	-	-
46	0,55	51,17	21,23	0,41	1,46	-	-
70	0,55	51,17	-	-	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 21,23 g/L με Y_{EtOH/S}=0,41 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 1,46 g/L (46 ώρες) .

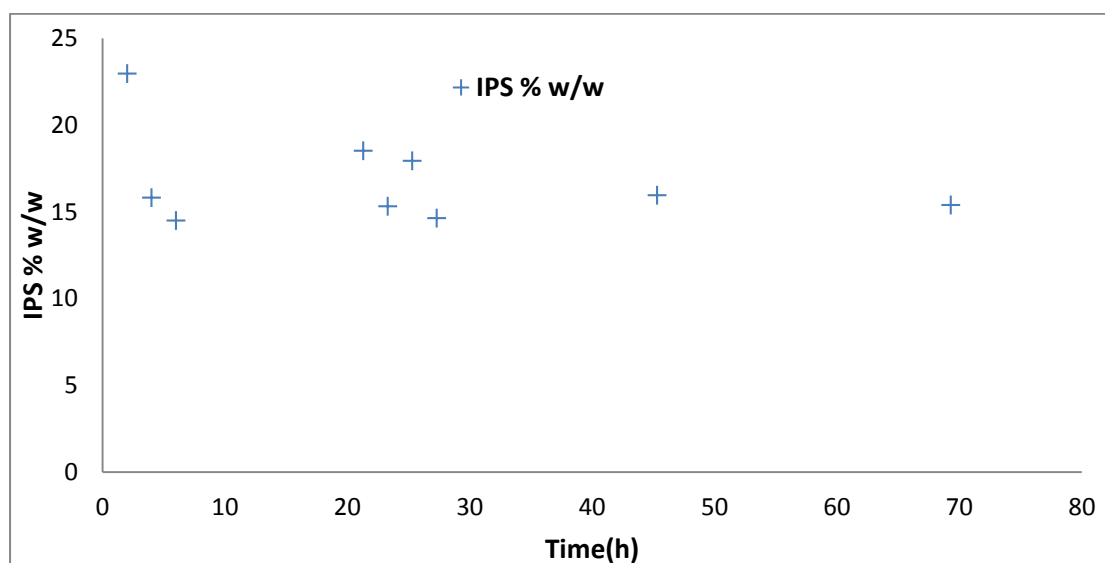
8.2.3. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.3.68: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Θ1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 2,36 g/L.



Διάγραμμα 8.2.3.69: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών 22,96 % w/w λαμβάνεται στην αρχή της ζύμωσης ακολούθως η ποσότητά της ελαττώνεται μέχρι τα 15,39 % w/w.

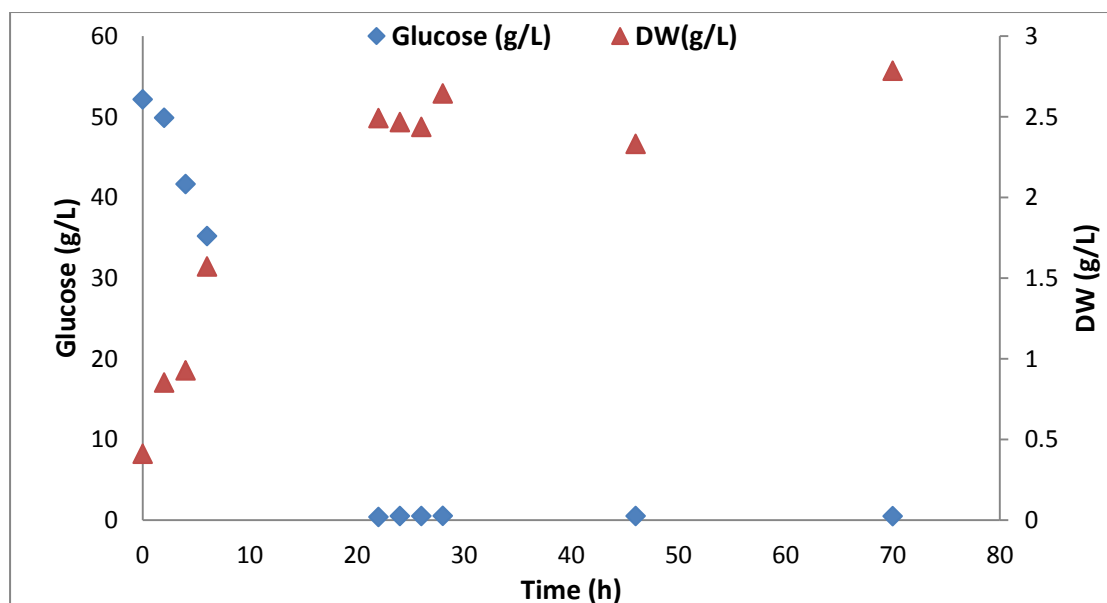
Πίνακας 8.2.3.39: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH(g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
21,3	0,52	50,35	7,81	0,16	0,97
23,3	0,51	50,36	16,26	0,32	2,18
25,3	0,54	50,33	-	-	-
27,3	0,58	50,29	-	-	-
45,3	0,59	50,28	9,44	0,19	1,19
69,3	0,71	50,16	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** ήταν 16,26 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,32$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,18 g/L (23 ώρες).

8.2.4. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

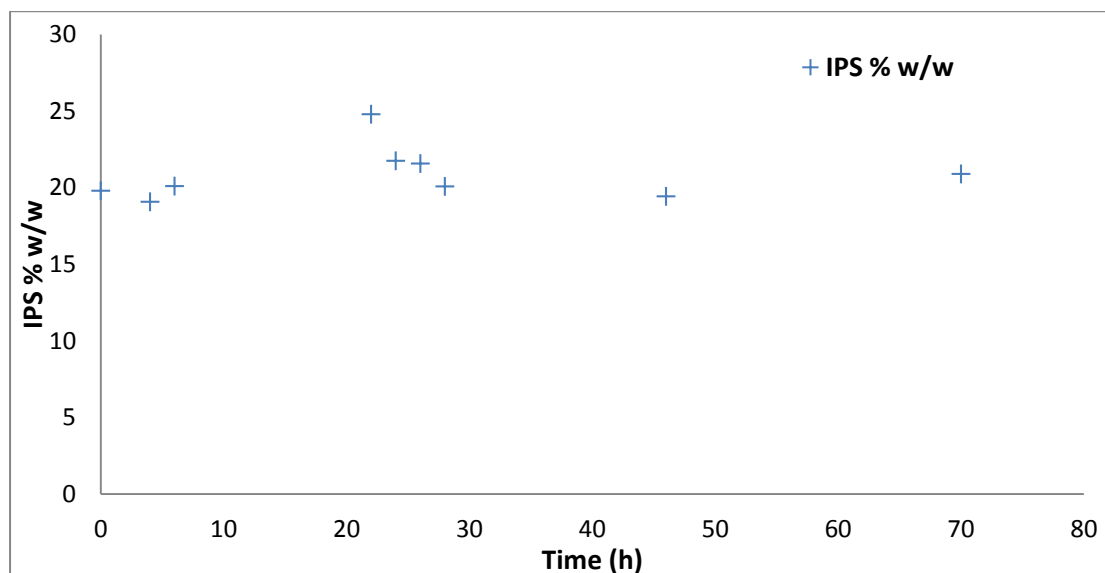


Διάγραμμα 8.2.4.70: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Δ3

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Δ3. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή της στα 2,79 g/L.



Διάγραμμα 8.2.4.71: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών στις 22 ώρες της ζύμωσης (24,80 % w/w) ενώ η ποσότητα πέφτει μέχρι τα 20,9 % w/w.

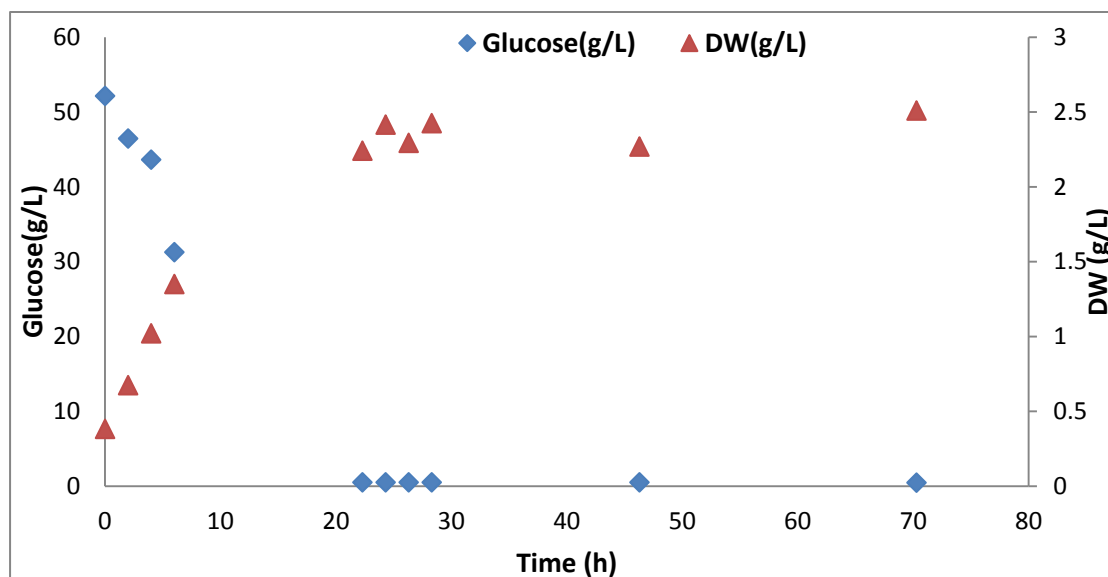
Πίνακας 8.2.4.40: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH(g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH (g/L) (KIT)	Y _{EtOH}
22	0,40	51,75	8,53	0,16	1,05	-	-
24	0,52	51,63	8,49	0,16	0,92	-	-
26	0,52	51,63	-	-	-	-	-
28	0,54	51,62	8,68	0,17	0,93	-	-
46	0,51	51,64	21,52	0,42	2,08	15,98	0,31
70	0,5	51,65	-	-	-	17,85	0,35

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει:

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 21,52 g/L με Y_{EtOH/S}=0,42 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,08 g/L (46 ώρες).

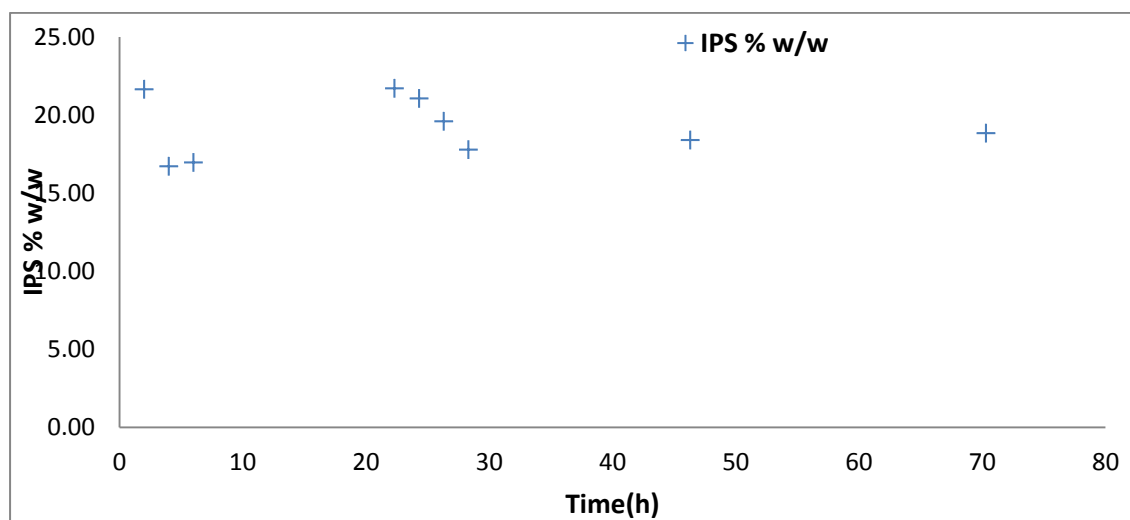
8.2.5. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.5.72: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* B1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* B1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 2,51 g/L.



Διάγραμμα 8.2.5.73: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 50 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει πως η μέγιστη ποσότητα **ενδοπολυσακχαριτών** παράγεται στις 22 ώρες της ζύμωσης (37,39 % w/w) και η ποσότητα ελαττώνεται μέχρι το 18,84 % w/w.

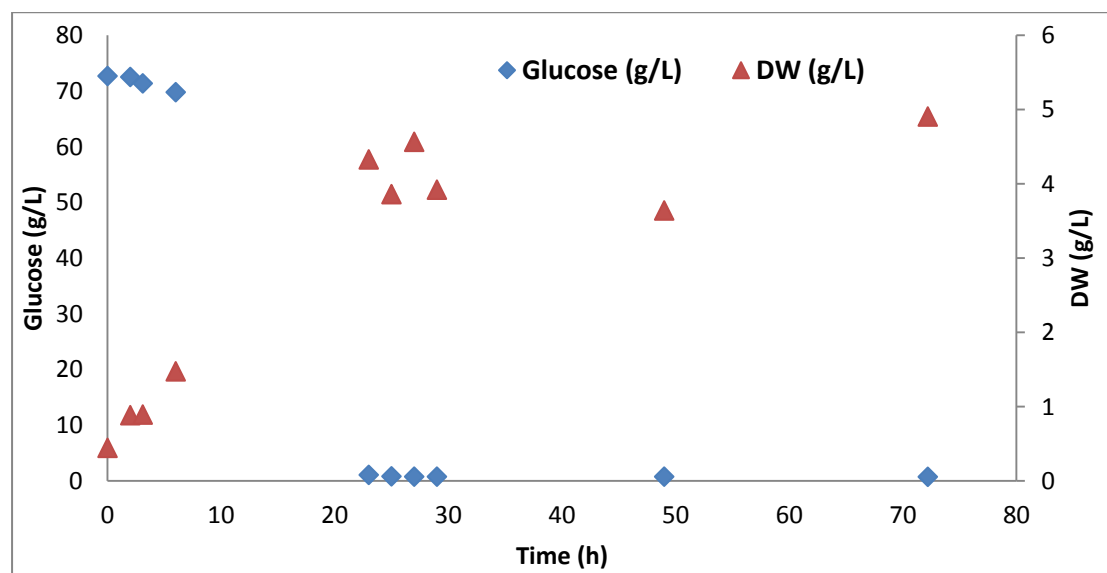
Πίνακας 8.2.5.41: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* B1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22,3	0,52	51,63	8,65	0,17	1,17
24,3	0,53	51,62	7,71	0,15	1,02
26,3	0,53	51,62	-	-	-
28,3	0,53	51,62	6,77	0,13	1,17
46,3	0,53	51,62	20,63	0,4	2,19
70,3	0,47	51,68	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 20,63 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,40$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,19 g/L (46 ώρες) .

8.2.1.1 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

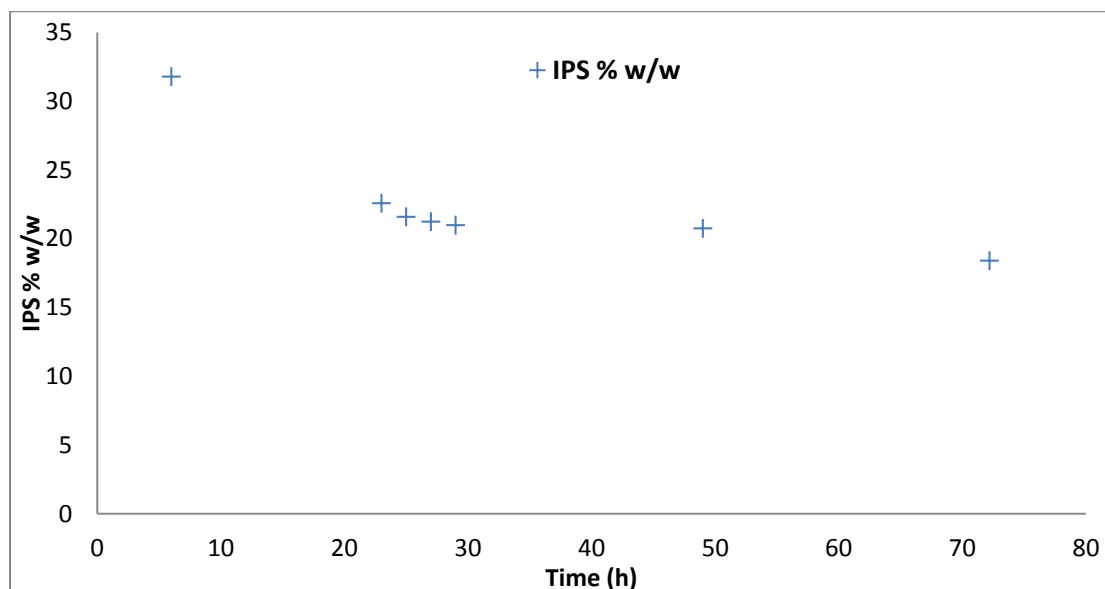


Διάγραμμα 8.2.1.1.74: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* E1A. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή της στα 4,91 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.1.75: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε τη μέγιστη ποσότητα **ενδοπολυσακχαριτών** στην αρχή της ζύμωσης στα 31,78 % κι αυτή μειώνεται ώστε στο τέλος να φθάσει τα 18,39 % .

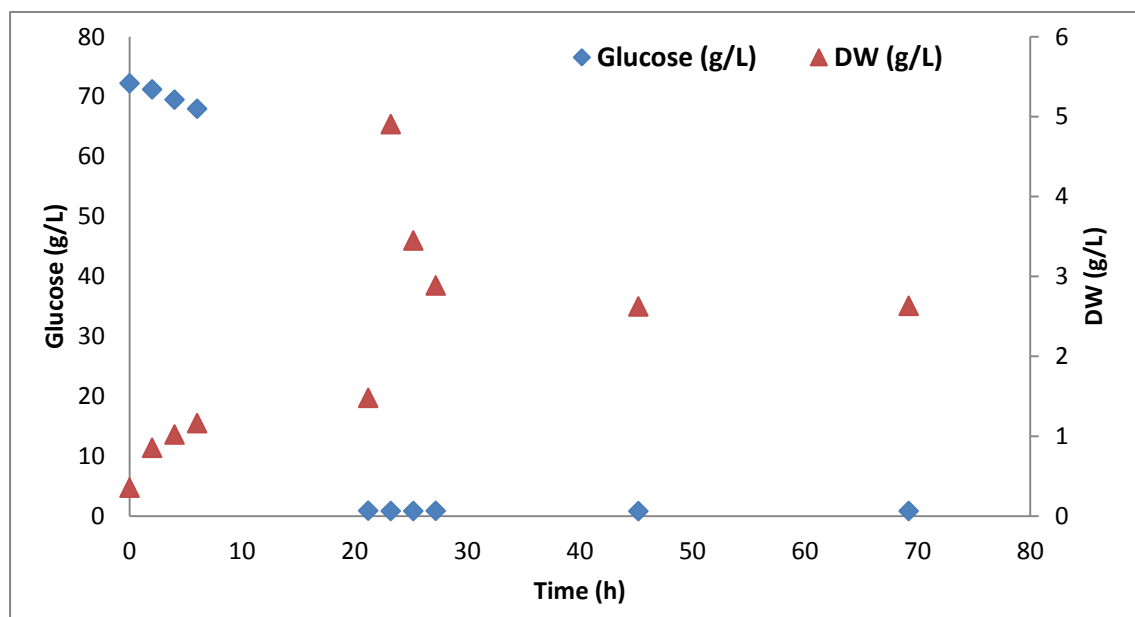
Πίνακας 8.2.1.1.42: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* E1A σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL , T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
23	1,09	71,59	11,89	0,17	1,09
25	0,83	71,85	15,29	0,21	1,25
27	0,78	71,90	-	-	-
29	0,77	71,90	13,80	0,19	1,17
49	0,76	71,91	29,69	0,41	2,30
72	0,74	71,93	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 29,69 g/L με Y_{EtOH/S}=0,41 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,30 g/L (49 ώρες).

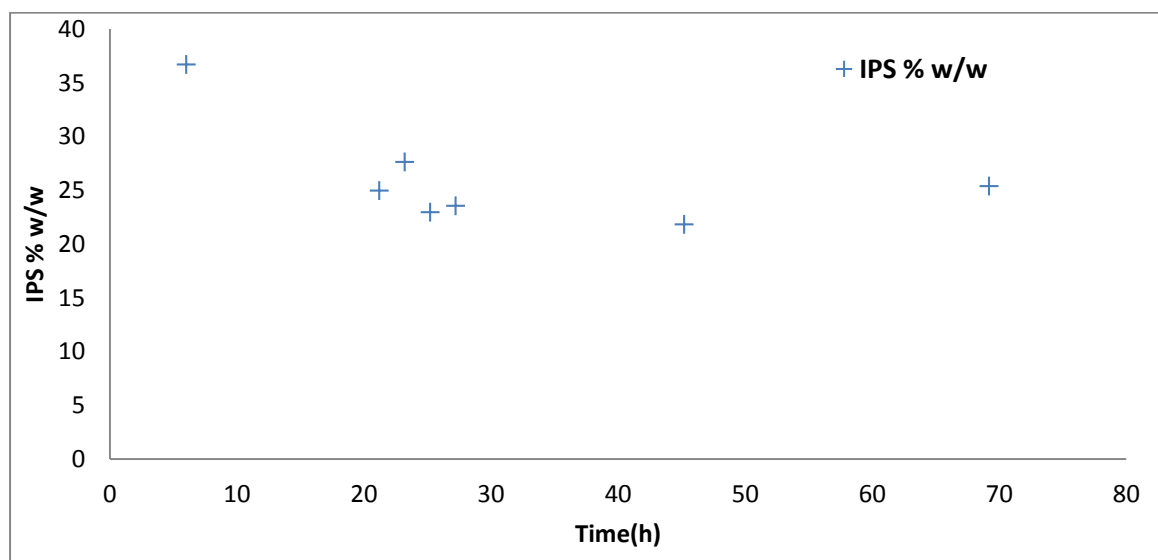
8.2.1.2. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.1.2.76: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Γ2

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για το μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Γ2. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** δίδει μέγιστη τιμή στα 4,91 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.2.77: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε μέγιστη ποσότητα **ενδοπολυσακχαριτών** κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης 36,70 % w/w ενώ η ποσότητα πέφτει και στο τέλος φθάνει τα 25,39 % w/w.

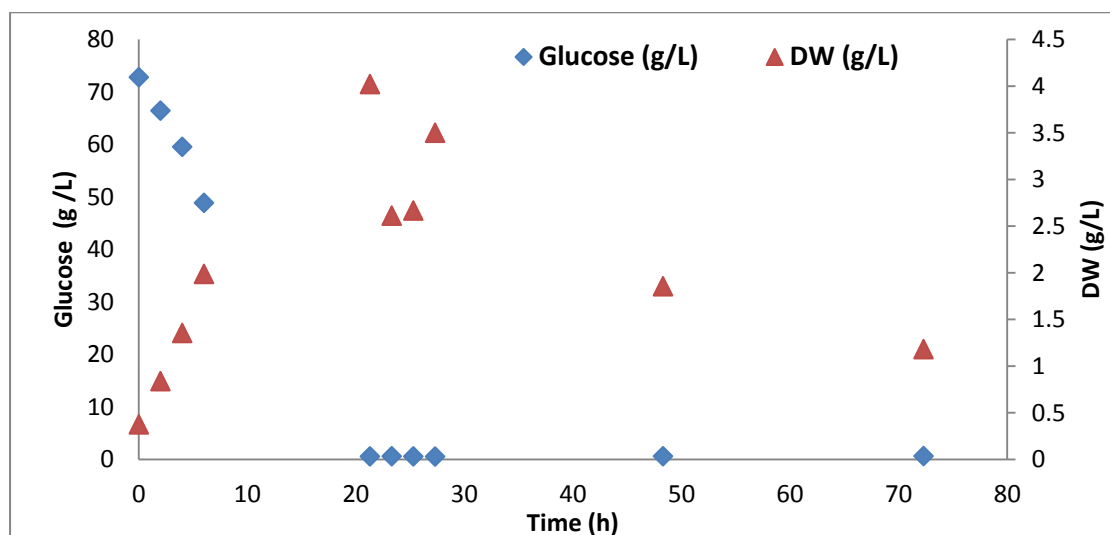
Πίνακας 8.2.1.2.43: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
21,2	0,91	71,32	11,60	0,16	0,99
23,2	0,86	71,37	12,48	0,17	0,96
25,2	0,86	71,37	-	-	-
27,2	0,87	71,35	7,80	0,11	0,81
45,2	0,83	71,40	27,52	0,39	1,87
69,2	0,87	71,36	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 27,52 g/L με Y_{EtOH/S}=0,39 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 1,87 g/L (45 ώρες).

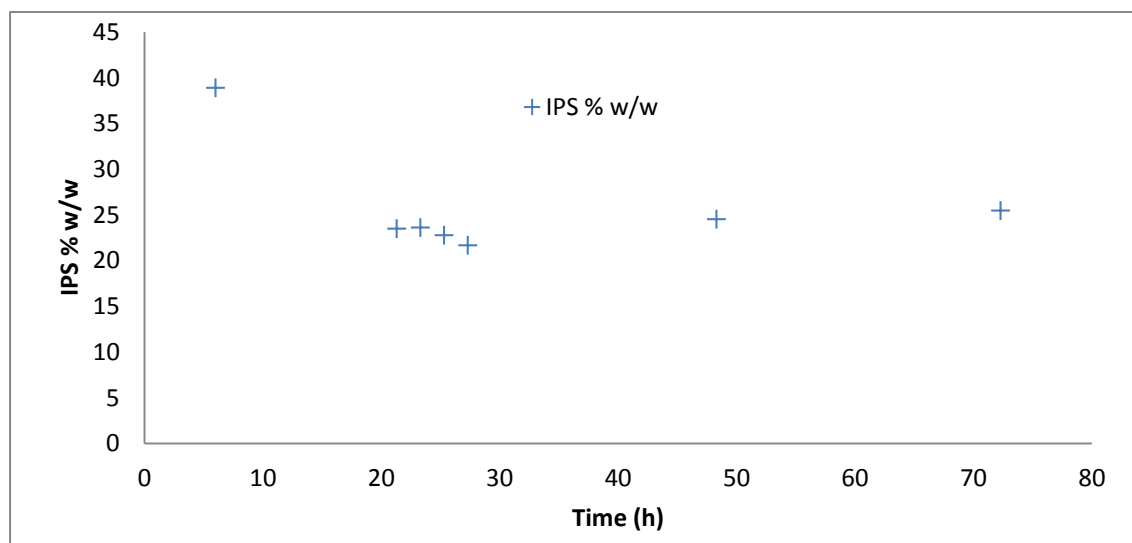
8.2.1.3 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.1.3.78: Παραγωγή **βιομάζας** και κατανάλωση **γλυκόζης** από τον μ/ο *S. cerevisiae* Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Θ1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 4,02 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.3.79: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε τη μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών 38,91 % στην αρχή της ζύμωσης ενώ η ποσότητα μειώνεται και καταλήγει στα 25,48 % .

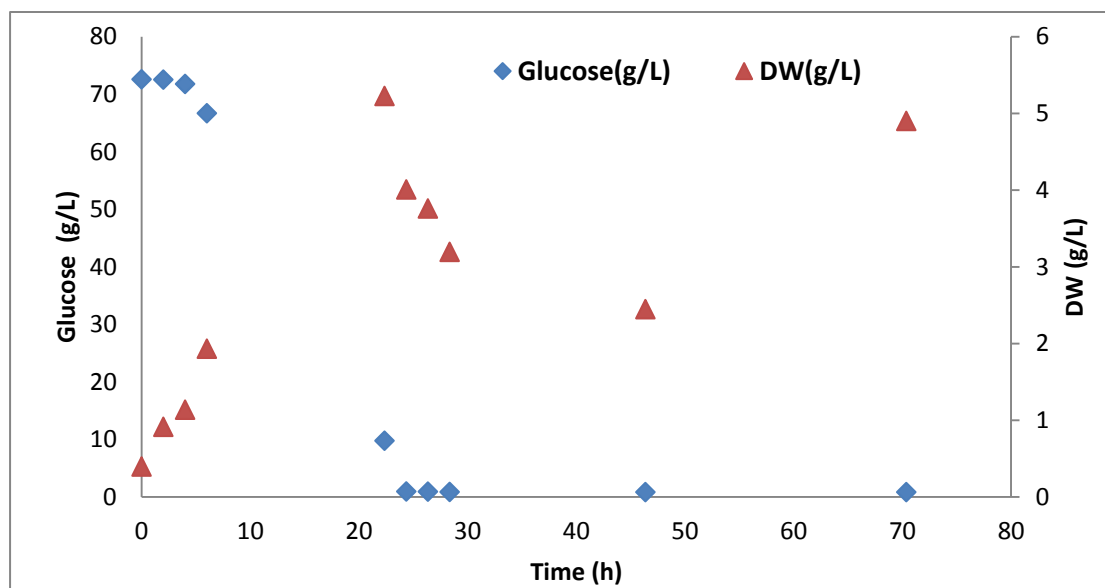
Πίνακας 8.2.1.3.44: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y_{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH (g/L) (KIT)	Y_{EtOH}
21,30	0,59	72,23	8,65	0,12	1,38	-	-
23,30	0,60	72,23	11,86	0,16	1,29	-	-
25,30	0,58	72,25	-	-	-	17,67	0,24
27,30	0,56	72,27	9,24	0,13	1,09	13,72	0,19
48,30	0,62	72,21	24,23	0,34	2,42	-	-
72,30	0,65	72,18	-	-	-	-	-

Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 24,23 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,34$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,42 g/L (48 ώρες).

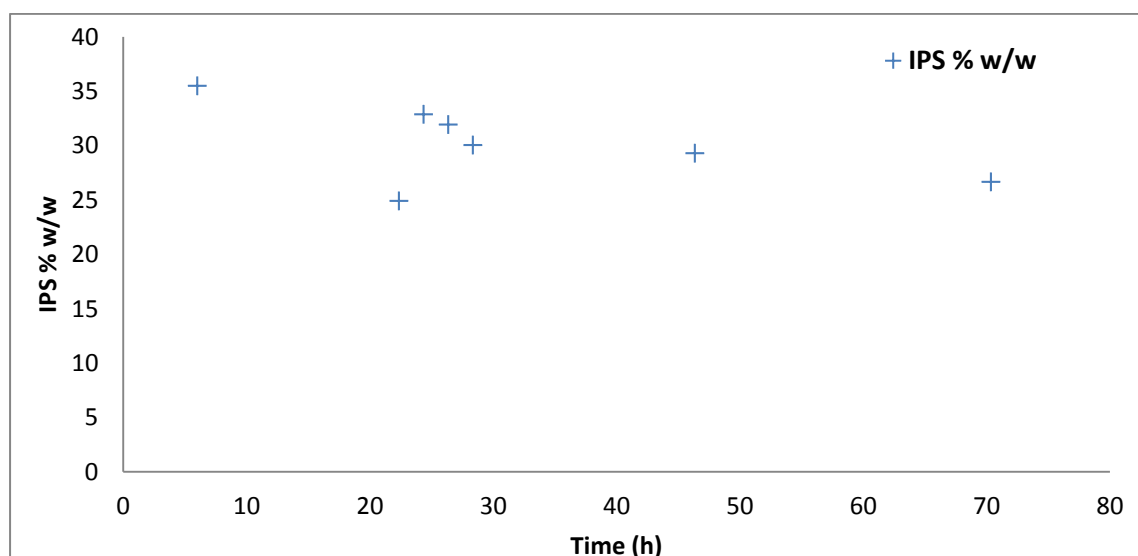
8.2.1.4 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.1.4.80: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Δ3

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Δ3. Παρατηρείται πως:

- Το σάκχαρο του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η βιομάζα δίδει μέγιστη τιμή στα 5,23 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.4.81: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών 35,5 % w/w στην αρχή της ζύμωσης ενώ η ποσότητα πέφτει και καταλήγει στο 26,67 % w/w.

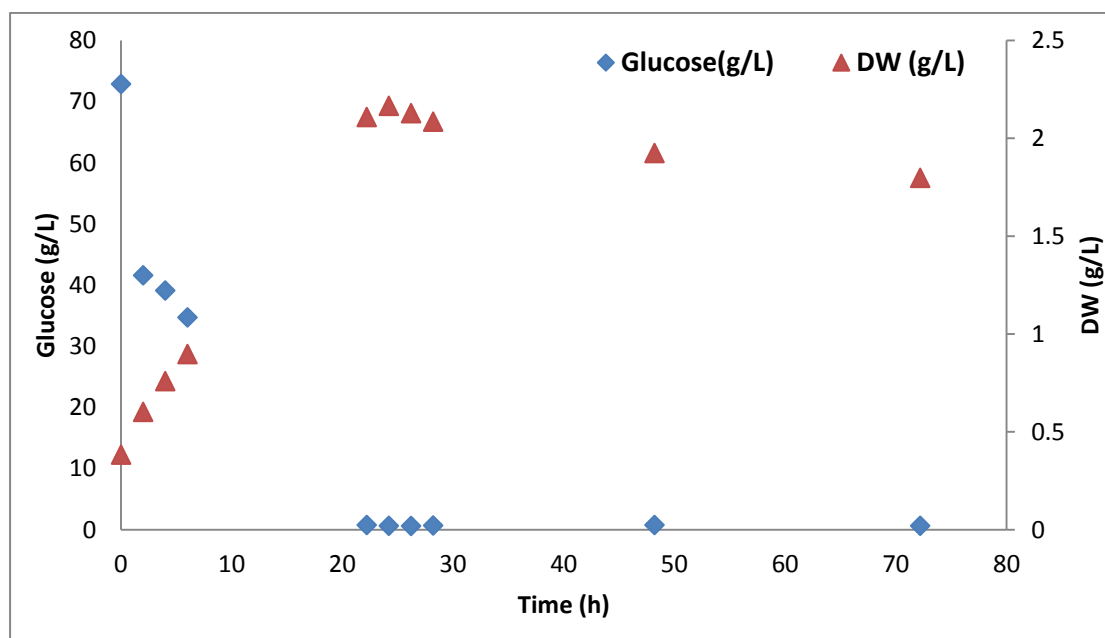
Πίνακας 8.2.1.4.45: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (HPLC) (g/L)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22,35	9,79	62,82	10,88	0,17	1,21
24,35	0,97	71,64	11,84	0,17	1,31
26,35	0,95	71,66	-	-	-
28,35	0,89	71,72	13,87	0,19	1,41
46,35	0,86	71,75	28,68	0,40	2,69
70,35	0,87	71,74	27,94	0,39	2,50

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 28,68 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,40$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,69 g/L (~46 ώρες).

8.2.1.5 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 70 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

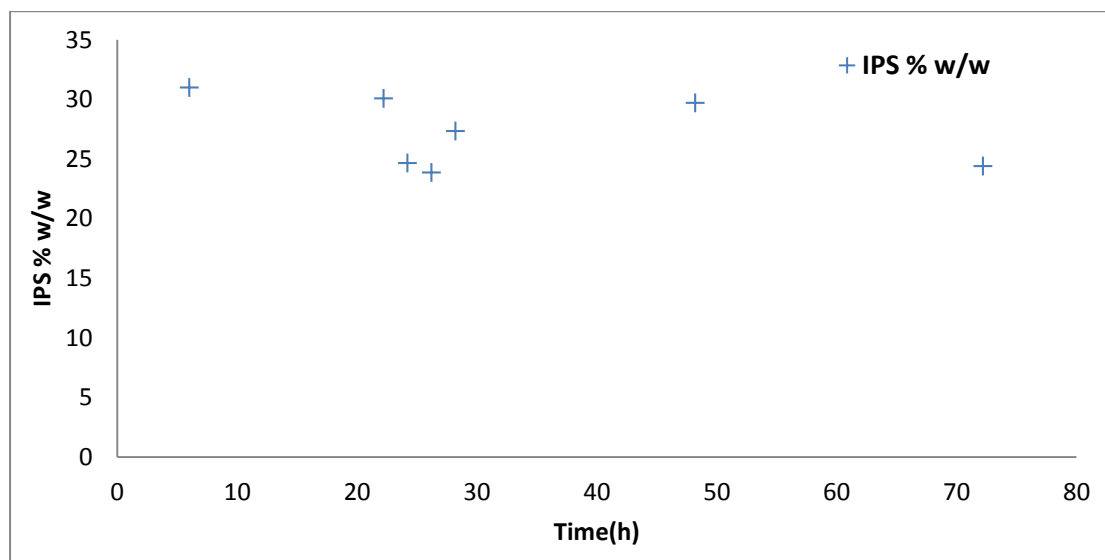


Διάγραμμα 8.2.1.5.82: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* B1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* B1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 2,17 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.5.83: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 70 g/L (Γλυκόζη)

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως: η μέγιστη ποσότητα **ενδοπολυσακχαριτών** στην αρχή της ζύμωσης ήταν το 58,09 % ενώ η ποσότητα πέφτει και στο τέλος έχουμε 24,41 % .

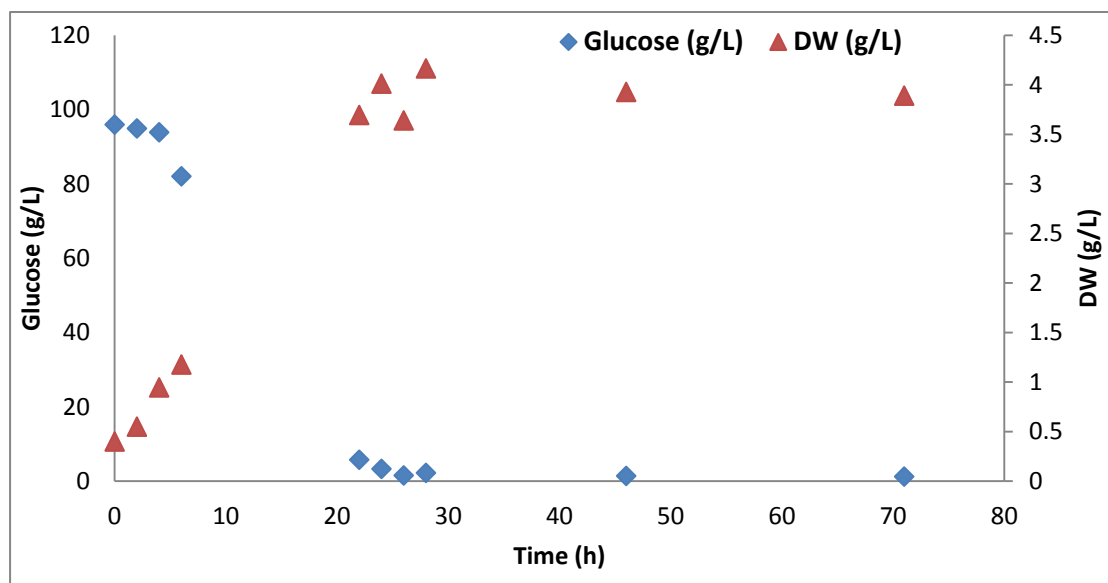
Πίνακας 8.2.1.5.46: Κινητικά αποτελέσματα αύξησης του μ/ου *S. cerevisiae* B1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22,20	0,76	72,12	10,45	0,15	1,19
24,20	0,62	72,26	13,56	0,19	1,38
26,20	0,60	72,28	-	-	-
28,20	0,69	72,19	12,27	0,17	1,3
48,20	0,75	72,13	22,52	0,31	2,07
72,20	0,62	72,26	-	-	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 22,52 g/L με Y_{EtOH/S}=0,31 g EtOH/g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,07 g/L (48 ώρες).

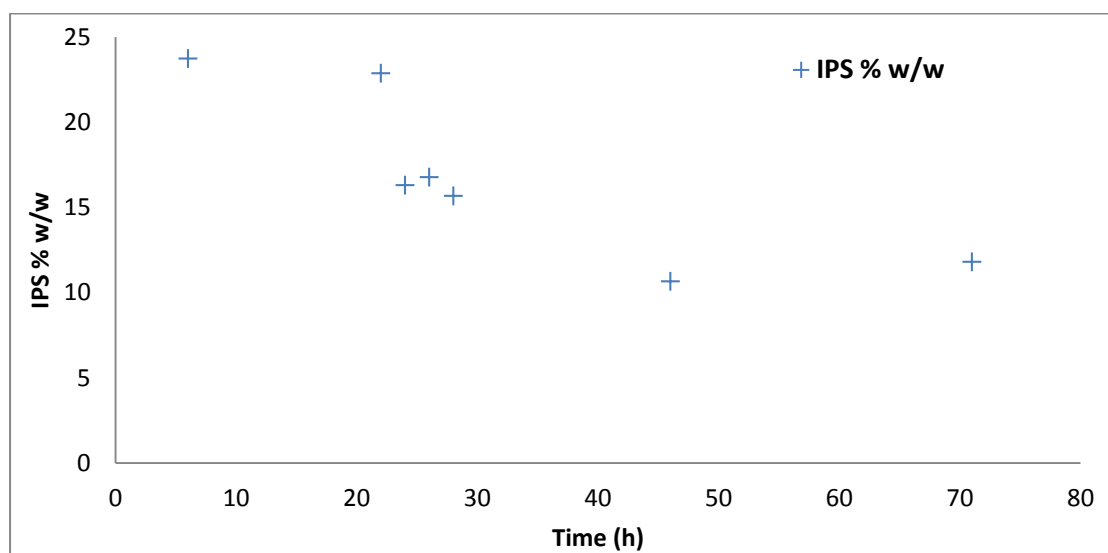
8.2.1.1.1.1. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.1.1.1.1.84: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* E1A

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* E1A. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 4,17 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.1.1.1.85: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* E1A σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε ότι: Η μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών παράγονται κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης (23,75 % w/w) ενώ η ποσότητα μειώνεται και στο τέλος έχουμε 11,81 % w/w.

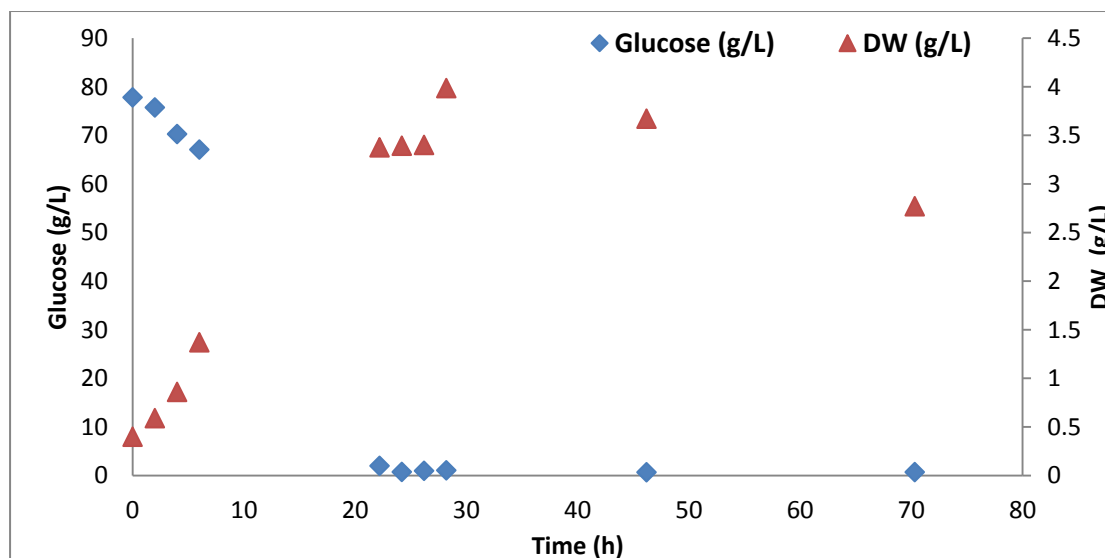
Πίνακας 8.2.1.1.1.47: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* E1A σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22	5,75	90,22	17,74	0,2	1,91
24	3,31	92,66	-	-	-
26	1,54	94,43	21,96	0,23	2,32
28	2,22	93,75	22,27	0,24	2,31
46	1,43	94,54	46	0,49	4,3
71	1,23	94,74	18,12	0,19	1,99

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 46 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,49$ g EtOH/g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 4,32 g/L (46 ώρες) .

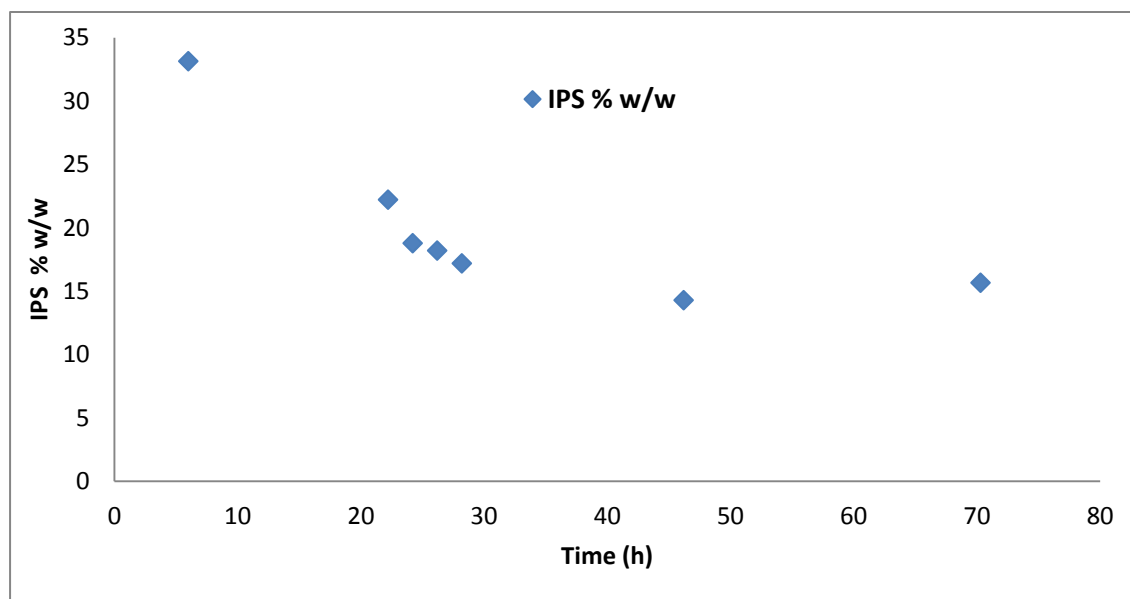
8.2.1.1.1.2 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.1.1.1.2.86: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Γ2

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Γ2. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 3,99 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.1.1.2.87: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Γ2 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε τη μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών στην αρχή της ζύμωσης στα 33,14 % w/w ενώ στην συνέχεια η ποσότητα πέφτει μέχρι τα 15,67 % w/w.

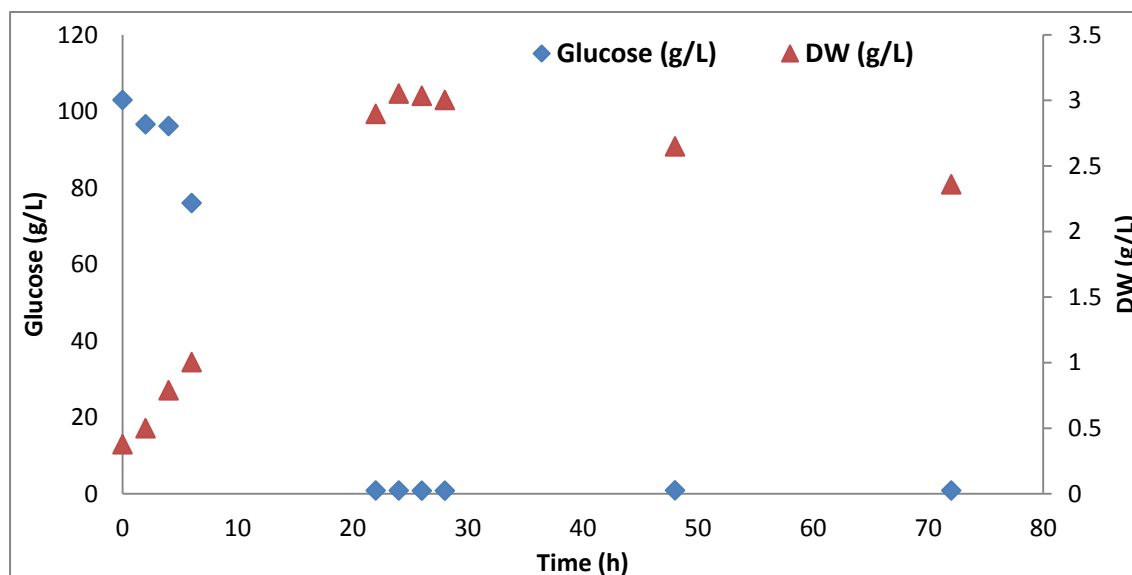
Πίνακας 8.2.1.1.1.2.48: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Γ2 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22,20	1,99	75,82	14,50	0,19	1,53
24,20	0,72	77,08	-	-	-
26,20	0,96	76,85	19,81	0,26	1,97
28,20	1,05	76,76	14,60	0,19	1,45
46,20	0,66	77,14	38	0,49	2,2
70,30	0,69	77,12	16,14	0,21	1,91

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** ήταν το 38 g/L με Y_{EtOH/S}=0,49 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 2,2 g/L (46,2 ώρες).

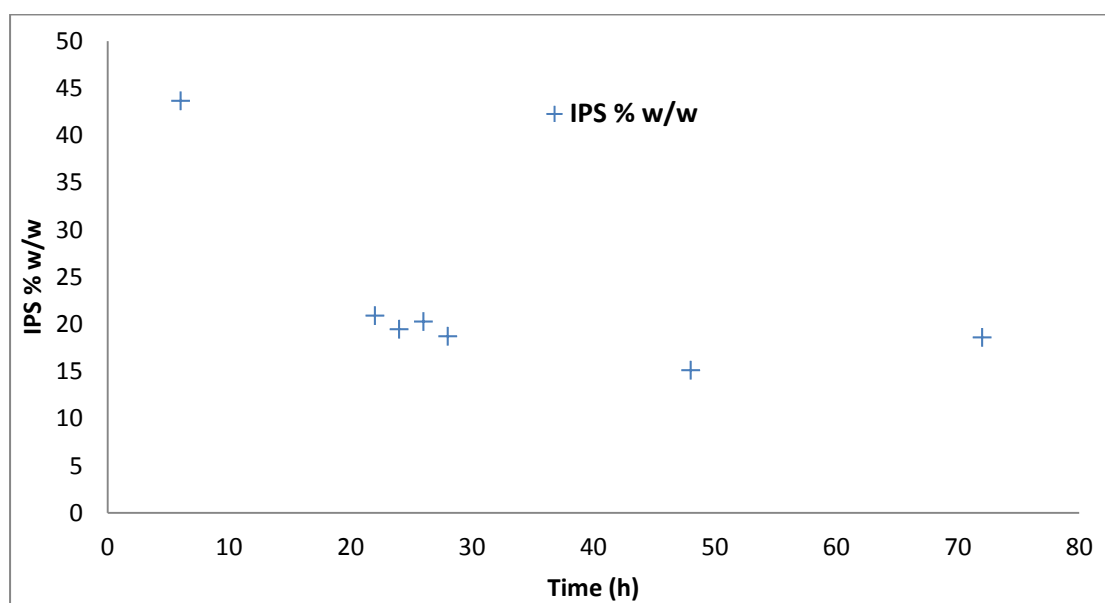
8.2.1.1.1.3 Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.1.1.1.3.88: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Θ1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Θ1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 3,05 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.1.1.3.89: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Θ1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα **ενδοπολυσακχαριτών** στην αρχή της ζύμωσης 43,69 % w/w ενώ η ποσότητα πέφτει και στο τέλος λαμβάνεται 18,61% w/w.

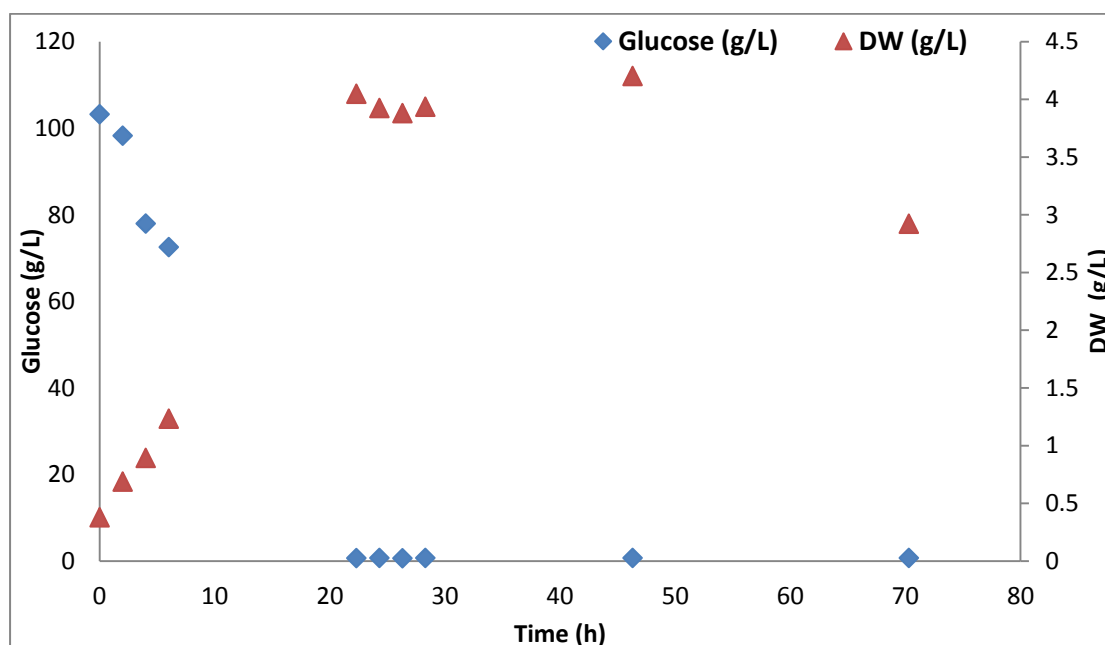
Πίνακας 8.2.1.1.1.3.49: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Θ1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
22	0,88	102,11	18,03	0,18	5,91
24	0,86	102,12	-	-	-
26	0,83	102,15	17,20	0,17	1,81
28	0,82	102,17	19,50	0,19	2,61
48	0,94	102,06	48	0,47	0,35
72	0,87	102,12	15,96	0,16	2,15

Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 48 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,47$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 5,91 g/L (22 ώρες).

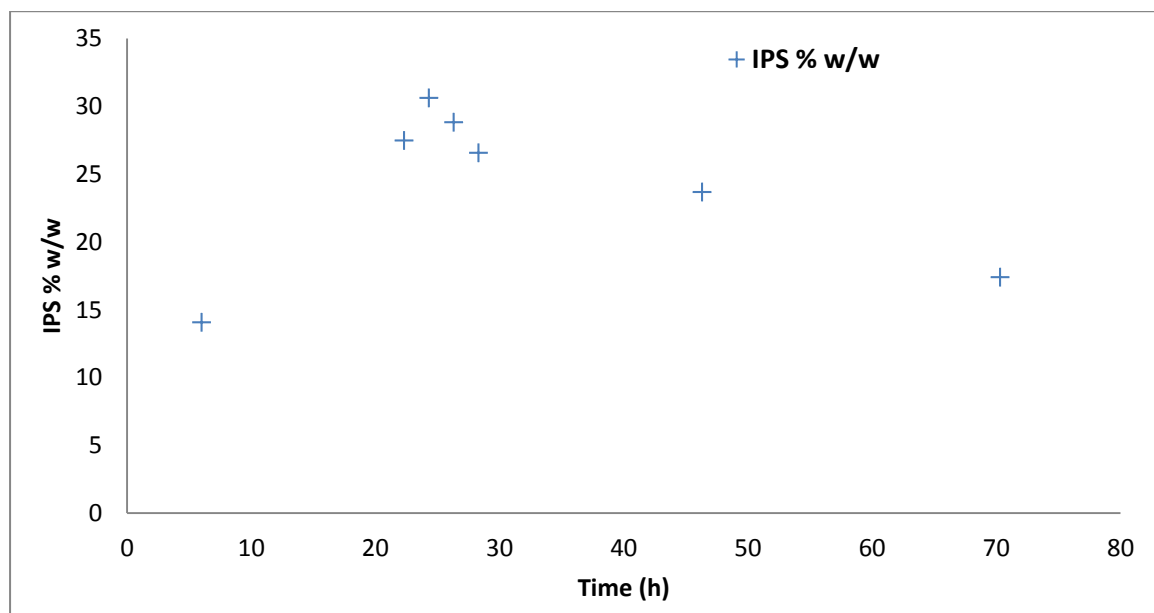
8.2.1.1.1.4. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες



Διάγραμμα 8.2.1.1.1.4.90: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* Δ3

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* Δ3. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος καταναλώνεται πλήρως μέχρι το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.
- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 4,2 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.1.4.91: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* Δ3 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών στις 24 ώρες της ζύμωσης 30,62% w/w ενώ η ποσότητα μειώνεται μέχρι τα 17,40 % w/w.

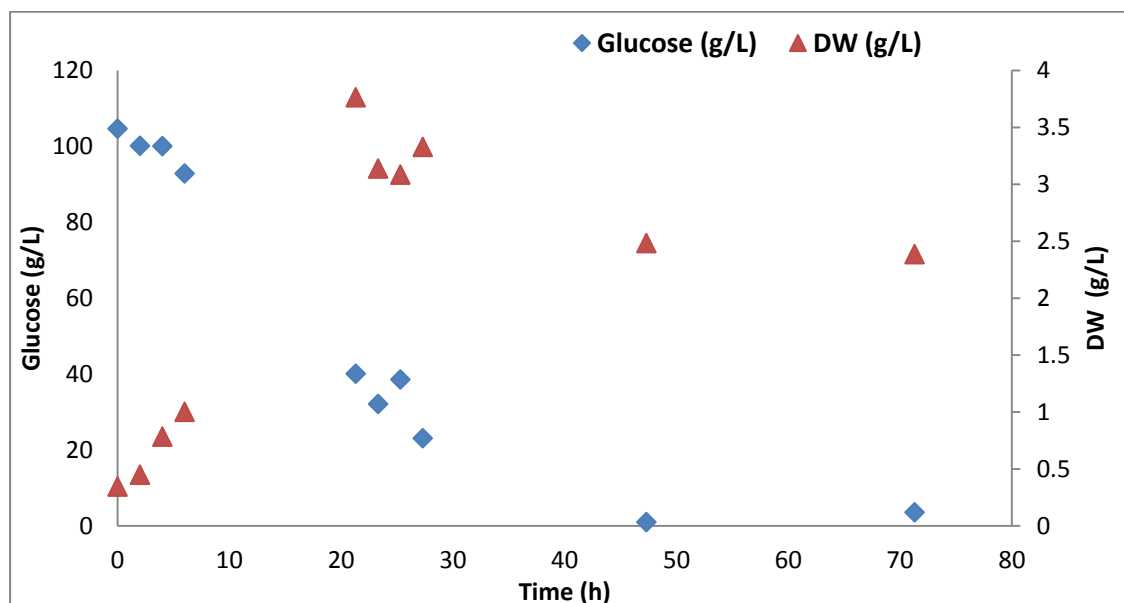
Πίνακας 8.2.1.1.4.50: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* Δ3 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)	EtOH (g/L) (KIT)	Y _{EtOH}
22,3	0,72	102,52	-	-	-	16,16	0,16
24,3	0,73	102,50	-	-	-	20,86	0,20
26,3	0,68	102,55	19,77	0,19	2,34	17,48	0,17
28,3	0,74	102,50	29,34	0,29	3,78	-	-
46,3	0,74	102,50	50	0,49	6,58	-	-
70,3	0,74	102,50	12,17	0,12	0,16	-	-

Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 50 g/L με Y_{EtOH/S}=0,49 g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 6,58 g/L (~46 ώρες) .

8.2.1.1.1.5. Αλκοολική ζύμωση του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 100 g/L γλυκόζη υπό ασηπτικές συνθήκες

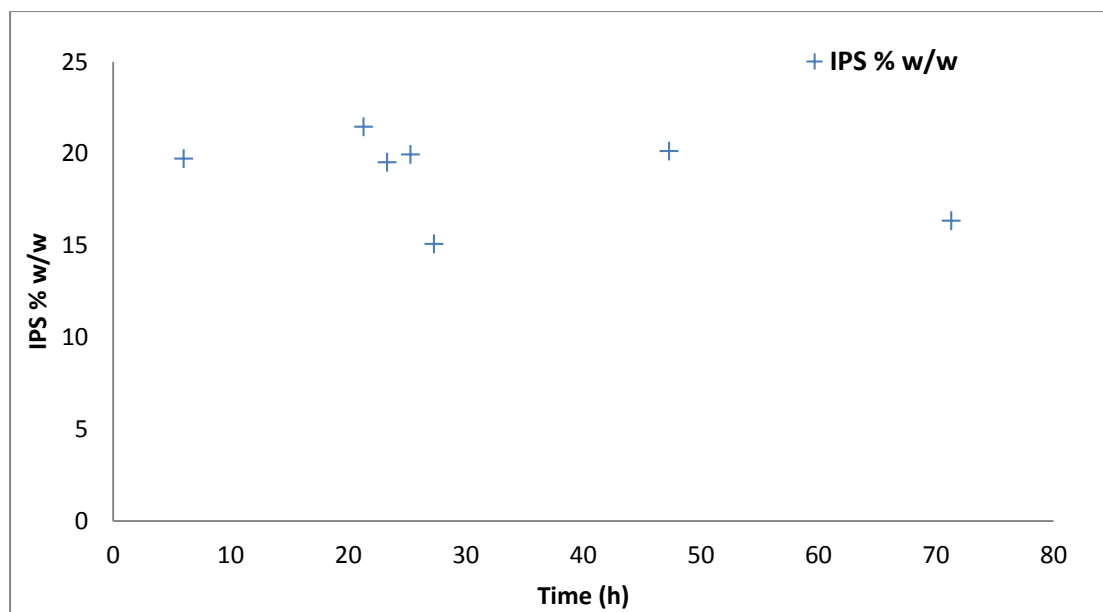


Διάγραμμα 8.2.1.1.1.5.92: Παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκόζης από τον μ/ο *S. cerevisiae* B1

Στο παραπάνω διάγραμμα δείχνεται η κατανάλωση της γλυκόζης σε σύγκριση με την πορεία της συγκέντρωσης της βιομάζας για τον μικροοργανισμό *S. cerevisiae* B1. Παρατηρείται πως:

- Το **σάκχαρο** του υποστρώματος δεν καταναλώνεται πλήρως αλλά παραμένουν αζύμωτα 7,53 g/L σακχάρων με το πέρας της αλκοολικής ζύμωσης.

- Η **βιομάζα** παρουσιάζει μέγιστη τιμή τα 3,77 g/L.



Διάγραμμα 8.2.1.1.5.93: Ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών στα διάφορα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης του μικροοργανισμού *S. cerevisiae* B1 σε θρεπτικό υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα τα 100 g/L (Γλυκόζη)

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα έχουμε: Μέγιστη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών στις 21 ώρες της ζύμωσης 21,48 % w/w ενώ η ποσότητα πέφτει και στο τέλος έχουμε 16,35 % w/w.

Πίνακας 8.2.1.1.5.51: Κινητικά αποτελέσματα ανάπτυξης του μ/ου *S. cerevisiae* B1 σε υπόστρωμα γλυκόζης υπό αναερόβιες συνθήκες. (Συνθήκες καλλιέργειας: αύξηση σε φιάλες των 250 mL, T= 30±1, ανάδευση 140±5)

Time (h)	Glucose (g/L)	Consumed Sugars (g/L)	EtOH (g/L) (HPLC)	Y _{EtOH}	Glycerol (g/L)
21,30	40,08	70,97	30,94	0,30	6,87
23,30	32,13	78,92	-	-	-
25,30	38,59	72,46	10,88	0,10	2,06
27,30	23,1	87,95	30,02	0,29	2,23
47,30	1,01	110,04	25,49	0,24	5,22
71,30	3,57	107,48	17,78	0,17	2,67

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα :

- Μέγιστη ποσότητα **αιθανόλης** 30,94 g/L με $Y_{EtOH/S}=0,30$ g EtOH/ g S (S=υποστρώματος).
- Μέγιστη ποσότητα **γλυκερόλης** 6,87 g/L (~21 ώρες) .