



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Ieva Dimšienė

**BIOETANOLIO GAVIMO IŠ MIELIŲ *SACCAROMYCES*
CEREVISIAE OPTIMIZAVIMO TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas

Vadovė
Doc. dr. Ilona Jonuškienė

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

**BIOETANOLIO GAVIMO IŠ MIELIŲ *SACCAROMYCES*
CEREVISIAE OPTIMIZAVIMO TYRIMAI**

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

Vadovė

(parašas) Doc. dr. Ilona Jonuškienė

(data)

Recenzentas

(parašas) Doc. dr. Kristina Kantminienė

(data)

Projektą atliko

(parašas) Ieva Dimšienė

(data)

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės technologijos fakultetas

(Fakultetas)

Ieva Dimšienė

(Studento vardas, pavardė)

Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Bioetanolio gavimo iš mielių *Saccharomyces cerevisiae* optimizavimo tyrimai“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 _____ m. _____ d.

_____ Kaunas _____

Patvirtinu, kad mano, **Ieva Dimšienė**, baigiamasis projektas tema „Bioetanolio gavimo iš mielių *Saccharomyces cerevisiae* optimizavimo tyrimai“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Turinys

IŽANGA	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	9
1.1. Mielės (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	9
1.2. Alkoholinė fermentacija	10
1.2.1. Mielių vystymasis alkoholinės fermentacijos metu	11
1.2.2. Bioetanolis ir jo panaudojimas.....	12
1.3. Žaliavos	13
1.3.1. Fermentai ir jų pritaikymas	15
1.4. Fermentacija pramonėje	15
1.4.1. Bioreaktoriai ir jų panaudojimas.....	17
1.5. Apžvalgos apibendrinimas	19
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI.....	20
2.1. Aparatūra	20
2.2. Tyrimams naudotos medžiagos	21
2.3. Dehidratuotų mielių <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ampulės atidarymas	22
2.4. Mielių suspensijos gavimas	23
2.5. Bioetanolio gavimas naudojant skirtingus anglies šaltinius	24
2.5.1. Tyrimų metu atlikti biomasės kiekio matavimai	25
2.6. Bioetanolio gavimas naudojant kviečius	25
2.6.1. Fermentų tirpalų paruošimas	26
2.7. Bioetanolio gavimo optimizavimas bioreaktoriuje.....	26
2.7.1. Tyrimo metu atlikti matavimai	27
2.8. Distiliavimas	28
2.9. Etanolio koncentracijos nustatymas.....	29

3.	TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	30
3.1.	Bioetanolio gavimas naudojant skirtingus anglies šaltinius	31
3.2.	Bioetanolio gavimas naudojant grūdus.....	32
3.3.	Bioetanolio gavimo optimizavimas bioreaktoriuje.....	35
4.	REKOMENDACIJŲ DALIS	44
	IŠVADOS	46
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	47

Dimšienė, Ieva. Bioetanolio gavimo iš mielių *Saccharomyces cerevisiae* optimizavimo tyrimai. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis: technologijų mokslai, biotechnologijos.

Reikšminiai žodžiai: *bioetanolis, mielės, monosacharidai, disacharidai, optimizavimas, bioreaktorius.*

Kaunas, 2018. 49 p.

SANTRAUKA

Pasaulyje sparčiai senka iškastinio kuro atsargos. Energijos vartojimas yra neatsiejamas nuo žmogaus gyvenimo. Bioetanolis – puiki alternatyva iš naftos gaminamam benzinui, jis taip pat plačiai naudojamas alkoholinių gėrimų, chemijos, farmacijos pramonėje. Bioetanolis gaminamas mielių vykdomos alkoholinės fermentacijos metu. Tai anaerobinis cukraus pavertimas į etanolį ir anglies dioksidą. Dažniausiai šiam procesui naudojamos mielės – *Saccharomyces cerevisiae*.

Vis dar ieškoma kuo pigesnių, lengviau pritaikomų žaliavų, tobulinamos fermentacijos sąlygos, kad bioetanolio gamyba būtų visapusiškai optimali. Svarbu, kuo ekonomiškiau pagaminti bioetanolį ir gauti nuolat atsikartojančius rezultatus, kad jis savo kaina galėtų konkuruoti su iš naftos pagamintu kuru ir taip būtų sumažintas iškastinio kuro vartojimas.

Šiame darbe buvo tiriami 4 anglies šaltiniai (mono- ir disacharidai) siekiant išsiaiškinti, kuris iš jų tinkamiausias bioetanolio gamybai. Ištirtas dviejų tipų kviečių „Famulis“ ir „Etana“ tinkamumas bioetanolio gamybai. Atrinkus tinkamesnį kviečių tipą, toliau vykdyti tyrimai parenkant tinkamą fermentą. Kviečių sucukrinimui naudojami gliukoamilazės ir celiulazės fermentai.

Atliekant tyrimus nustatyta, kad tinkamiausias monosacharidas bioetanolio gamybai yra gliukozė, todėl naudojant šį cukrų vykdyta fermentacija su pamaitinimu 5l bioreaktoriuje „EDF-5.4“. Tyrimai bioreaktoriuje vykdyti siekiant išsiaiškinti, kaip bioetanolio gamybos greitis kinta priklausomai nuo gliukozės koncentracijos terpėje.

Darbo metu nustatyta, kad bioetanolį galima gaminti iš įvairių mono- ir disacharidų, tinkamiausias iš jų gliukozė. Bioetanolį gaminant iš kviečių ir tikslingai parenkant tinkamus fermentus bei jų koncentracijas, galima padidinti produkto išeigą. Vykdytą fermentaciją su pamaitinimu bioreaktoriuje nustatytos gliukozės koncentracijos ribos, prie kurių santykinis bioetanolio gamybos greitis yra didžiausias.

Dimšienė, Ieva. *Optimization Studies Of Bioethanol Production By Yeast (Saccharomyces Cerevisiae)*: Master's thesis presented in industrial biotechnology / supervisor dr. Ilona Jonuškienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area: technology sciences, biotechnology.

Key words: *bioethanol, yeast, monosaccharides, disaccharides, optimization, bioreactor.*

Kaunas, 2018. 49 p.

SUMMARY

Worldwide fossil fuel resources are running out. Energy consumption is an essential part of modern human life. Bioethanol is a perfect alternative to petrol produced from oil. Furthermore, it is widely used in alcoholic drinks, chemical, and pharmaceutical industry. Bioethanol is produced by yeast in a process called alcoholic fermentation. During this anaerobic reaction a sugar molecule is transformed into ethanol and carbon dioxide. The most commonly used microorganism for this process is yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Recently, research is being performed in search of cheaper, more applicable raw materials and optimization of reaction conditions in order to make bioethanol production as efficient as possible. It is important to make bioethanol production economical and repeatable. This way its price could compete with and reduce production of oil-derived fuel.

In this thesis 4 different carbon sources, mono- and disaccharides, were used in order to find out which is the best for bioethanol production. Two types of wheat “Famulis” and “Etana” were investigated. After choosing the most suitable type of wheat, a search of an enzyme was performed. Glucoamylase and cellulase were analyzed. In this research it was determined that the most suitable sugar for bioethanol production is monosaccharide glucose. Fermentation in 5 L fed-batch bioreactor “EDF-5.4” was performed using glucose. This investigation showed how speed of bioethanol production is dependent on glucose concentration in medium.

In the current research it was shown that bioethanol could be produced from various monosaccharides and disaccharides and the most suitable is glucose. The amount of bioethanol produced from wheat could be increased by employing appropriate enzymes and its concentrations. According to the results gathered using fed-batch bioreactor, optimal glucose concentration interval which induced the highest relative speed of bioethanol production was determined.

IŽANGA

Pasaulyje sparčiai senka iškastinio kuro atsargos. Energijos vartojimas yra neatsiejamas nuo žmogaus gyvenimo. Viena geriausių alternatyvų iškastiniam naftos kurui yra biokuras [1]. Biokurui priskiriamas bioetanolis – etilo alkoholis pagamintas iš biomasės ar biologiškai skaidžios atliekų dalies. Bioetanolis plačiai naudojamas alkoholinių gėrimų, chemijos, farmacijos pramonėje, taip pat jį galima naudoti kaip atsinaujinantį transporto kurą.

Mielės naudojamos gauti biologiškai aktyvias organines medžiagas, tokias kaip etanolis, baltymai, aminorūgštys. Vienas geriausiai pritaikomų, mielių vykdomų procesų yra alkoholinė fermentacija. Tai anaerobinis cukraus pavertimas į etanolį ir anglies dioksidą. Dažniausiai šiam procesui naudojamos mielės – *Saccharomyces cerevisiae*.

Biotechnologijoje daug dėmesio skiriama fermentacijos procesų optimizavimui, tyrimai vykdomi tiek laboratorijoje, tiek pramonėje. Norint laboratorijoje gautus rezultatus perkelti į pramonę, visų pirma tikslinga naudoti modelinius bioreaktorius.

Bioetanolio gamyba pramonėje vykdoma jau daugelį metų, tačiau vis dar ieškoma kuo pigesnių, lengviau pritaikomų žaliavų, tobulinamos fermentacijos sąlygos, kad gamyba būtų visapusiškai optimali. Svarbu, kuo ekonomiškiau pagaminti bioetanolį, kad jis savo kaina galėtų konkuruoti su iš naftos pagamintu kuru ir taip būtų sumažintas iškastinio kuro naudojimas.

Darbo tikslas – atlikti bioetanolio gavimo iš mielių *Saccharomyces cerevisiae* optimizavimo tyrimus.

Darbo uždaviniai:

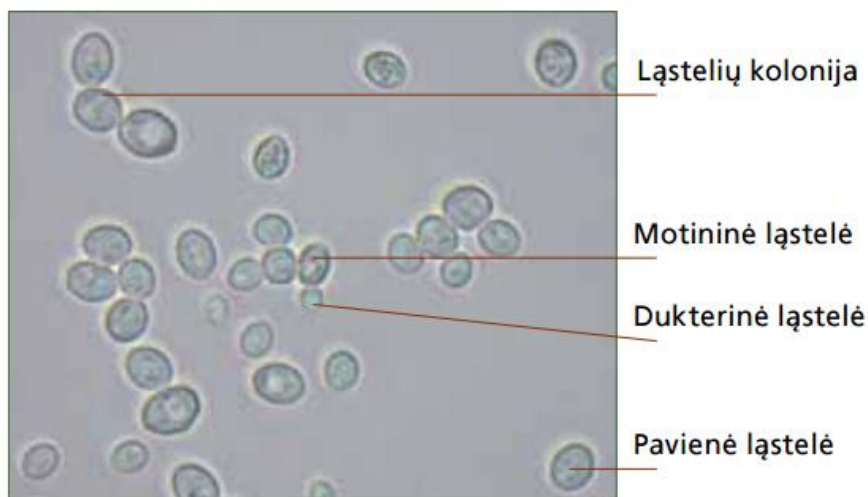
1. Nustatyti mono- ar disacharidą, kurį naudojant gaunama didžiausia bioetanolio išeiga.
2. Pagaminti bioetanolį iš kviečių ir nustatyti, su kuriais iš jų gaunama didžiausia produkto išeiga.
3. Atlikti alkoholinę fermentaciją bioreaktoriuje, naudojant sacharidą, su kuriuo gaunama didžiausia bioetanolio išeiga.
4. Optimizuoti bioetanolio gamybai naudojamą cukraus koncentraciją.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mielės (*Saccharomyces cerevisiae*)

Mielės tai vienaląsčiai eukariotiniai mikroorganizmai, priskiriami grybų karalystei. Pramonėje kultivuojamos tik *Saccharomyces*, *Candida* ir *Kluyveromyces* mielės. Jos skirstomos į aktyvias ir neaktyvias. Aktyviosios naudojamos fermentacijai, o neaktyviomis vadinamos džiovintos, kurios naudojamos kaip maisto papildai ar skonio ir aromato komponentai [2].

Saccharomyces cerevisiae (alinis mieliagybis) – vienaląstis mieliagybis, priklausantis aukšliagybūnų skyriui (žr. 1.1 pav.). Dauginasi nelytiškai, pumpuravimo būdu, iš motininės ląstelės išauga dukterinės 5–10 μm dydžio, bespalvės, rutulio ar kiaušinio formos mielių ląstelės. Ant motininės ląstelės susidaro vienas arba keli pumpurai, kurie palaipsniui didėja ir pasiekia motininės ląstelės dydį. Dėl pumpuravimo susidaro ląstelių grandinė (pseudomicelio), kurios lengvai sutrūkinėja. Gamtoje *S. cerevisiae* galima rasti ant augalų paviršiaus, ypač ant uogų ir vaisių.



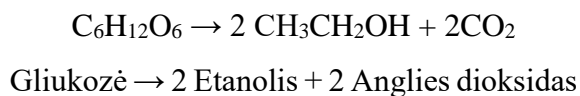
1.1 pav. Mieliagybis (*S. cerevisiae*): bendras ląstelių kolonijos vaizdas [3]

S. cerevisiae būdinga greita medžiagų apykaita, jos vykdo cukraus (gliukozės) – alkoholinį rūgimą (mielių fermentai skaido cukrų (gliukozę) į anglies dvideginį ir etilo alkoholį). Dėl šios savybės grybas plačiai naudojamas pramonėje: etilo alkoholio gamyboje, alaus, vyno, degtinės ir kitų alkoholinių gėrimų gamyboje kepat duonos ir kitus konditerijos gaminius. Šis mieliagybis taip pat naudojamas maisto ir pašarų papildų (baltymų, angliavandenių, vitaminų ir kitų medžiagų turtingos

biomasės), vitamino B₂ (riboflavino), citrinų rūgšties gamyboje. Kaip modelinis organizmas šis mieliagybis naudojamas moksliniuose tyrimuose [3]. *S. cerevisiae* dažniausiai pasirenkama mielių padermė alkoholinių gėrimų gamyboje, nes turi geriausią atsparumą aukštomis etanolio koncentracijoms [4]. Mielės svarbios ne tik pramonėje, bet ir moksle t. y. jos naudojamos kaip modelinė sistema procesams, vykstantiems eukariotinėje ląstelėje tyrinėti. Dažnai eukariotinėse ląstelėse, po sintezės, baltymai yra modifikuojami. Prie baltymų pridedami mažo molekulinio svorio komponentai, reikalingi tiksliam jų veikimui ląstelėje. *Escherichia .coli* ar kiti prokariotai nevykdo baltymų modifikacijų arba jos skiriasi nuo modifikacijų eukariotinėse ląstelėse. Mielės taip pat plačiai naudojamos įvairių rekombinantinių baltymų sintezei.

1.2. Alkoholinė fermentacija

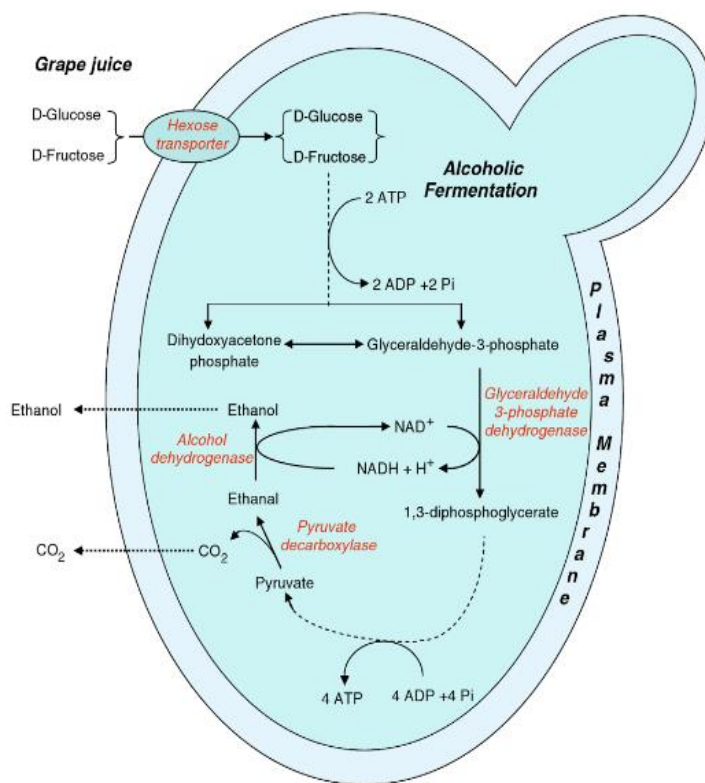
Alkoholinė fermentacija – anaerobinis cukraus, dažniausiai gliukozės arba fruktozės, pavertimas į etanolį ir anglies dioksidą. Ją dažniausiai atlieka mielės, tačiau gali vykdyti ir bakterijos *Zymomonas mobilis* [4]. Fermentacijos reakcijos mechanizmą galima užrašyti tokia lygtimi: [5]



Tai suminė alkoholinės fermentacijos lygtis, susidedanti iš daugybės vykstančių biocheminių, cheminių ir fiziko–cheminių procesų. Be etanolio, fermentacijos metu susidaro ir kitų junginių: aukštesnieji alkoholiai, eteriai, glicerolis, gintaro rūgštis, diacetilas, acetonas, 2,3-butandiolis. Procese dalyvauja dviejų tipų fermentai. Pirmasis zimazė (cukrazė), kuri hidrolizuoja sacharozę į gliukozę ir fruktozę. Antrasis fermentas alkoholio dehidrogenazė, kuri citoplazmoje verčia piruvatą į alkoholį. Kai alkoholio mielių ląstelėse susintetinama per daug, jis aldehiddehidrogenazės yra verčiamas acto rūgštimi [6]. Taip pat ir kai fermentacijos terpėje yra ištirpusios deguonies, etanolis gali būti toliau verčiamas acto rūgštimi arba anglies dioksidu ir vandeniu. Fermentacijos tirpale gaunamas ištirpęs etanolis ir nedidelė dalis kitų mielių metabolitų. Mielių ląstelės fermentacijos terpėje negali gyvuoti esant didelėms etanolio koncentracijoms. Jos gali augti tik terpėje turinčioje iki 16 – 20% etanolio [6].

Vynuogių sulčių fermentacijos *S. cerevisiae* ląstelėse schema pateikiama (žr. 1.2 pav.). Iš pradžių piruvatas dekarboksilinamas iki aldehido etanolio, veikiant fermentui piruvatdekarboksilazei. Vėliau alkoholio dehidrogenazė paverčia etanalį į etanolį, tuo metu NADH verčiamas į NAD⁺. Galutiniai

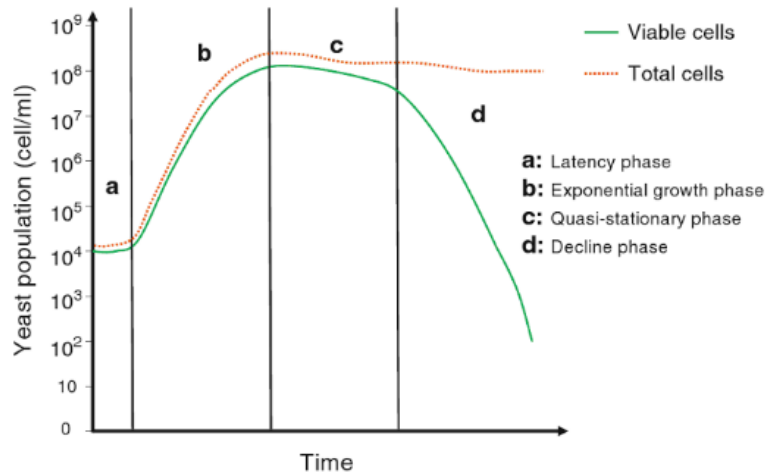
alkoholinės fermentacijos produktai etanolis ir anglies dioksidas yra išnešami į *S. cerevisiae* ląstelių išorę.



1.2 pav. Alkoholinė fermentacija [4]

1.2.1. Mielių vystymasis alkoholinės fermentacijos metu

Fermentacijos pradžioje mielės pradeda skaidyti cukrų ir kitas terpėje esančias medžiagas, taip gaudamos energiją. Paveiksle (žr. 1.3 pav.) pateikiamas mielių augimo ciklo modelis esant standartinėms sąlygoms.



1.3 pav. Mielių augimo ciklas (žalia spalva – gyvybingos ląstelės; raudona – bendras ląstelių skaičius). **a** raide išskirta prisitaikymo fazė; **b** – eksponentinio augimo fazė; **c** – stacionari fazė; **d** – mažėjimo fazė [4]

Iš pradžių mielių ląstelės auga, didėja, prisitaiko prie aplinkos sąlygų. Tai prisitaikymo fazė. Pradinė populiacija priklauso nuo užsėjamų mikroorganizmų skaičiaus. Kai mielių ląstelės prisitaiko prie aplinkos sąlygų, jų populiacija pradeda sparčiai augti. Tai eksponentinio augimo fazė, kuri labai priklauso nuo aplinkos temperatūros, amoniako, aminorūgščių ir kitų maisto medžiagų koncentracijos, taip pat nuo ištirpusio deguonies kiekio [4]. Kai ląstelių augimas sulėtėja ir nusistovi pastovus ląstelių skaičius, prasideda stacionarioji mielių ląstelių augimo fazė. Tai įvyksta dėl kai kurių maisto medžiagų trūkumo. Prasidėjus mažėjimo etapui, gyvybingų mielių ląstelių skaičius palaipsniui mažėja, kol visiškai išnyksta. Aptartu metodu mielės vystosi vyno pramonėje, kitais atvejais nėra naudingas visiškai mielių gyvybingumo sumažėjimas.

1.2.2. Bioetanolis ir jo panaudojimas

Etanolis, tai organinis junginys, kurį galima pagaminti cheminiu arba biocheminiu būdu. Etanolis gautas iš biomasės fermentacijos proceso metu dar vadinamas fermentuotu etilo alkoholiu arba bioetanoliu. Bioetanolis plačiai naudojamas alkoholinių gėrimų, chemijos, farmacijos pramonėje, taip pat žinoma, kad jį galima naudoti, kaip atsinaujinantį transporto kūrą. Bioetanolis yra alternatyva benzinui, pagamintam iš senkančių ir neatsinaujinančių naftos atsargų [7].

Atlikti tyrimai rodo, kad bioetanolio gamybai reikia mažiau energijos nei išsiskiria jam degant, todėl jis sėkmingai gali būti taikomas, kaip atsinaujinantis kuras, taip sumažindamas naftos kuro sunaudojimą [7]. Bioetanolis dažniausiai gaminamas iš daug cukraus ar krakmolo turinčių žaliavų.

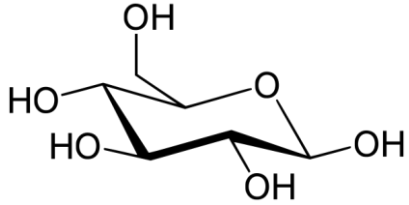
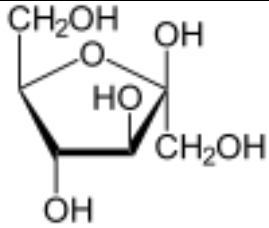
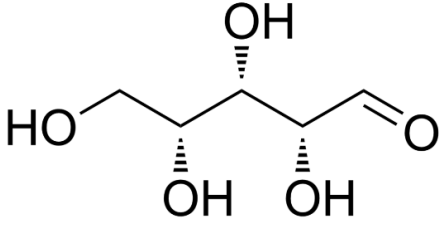
Geriausios perspektyvos matomos, naudojant celiuliozines, lignoceliuliozines žaliavas ir tokias atliekas, kaip popieriaus, ar bioskaidžios komunalinės atliekos [8]. Tokiu atsinaujinančių atliekų panaudojimas suteikia ekonominę, ekologinę naudą ir padeda spręsti aplinkosaugos ir energetines problemas.

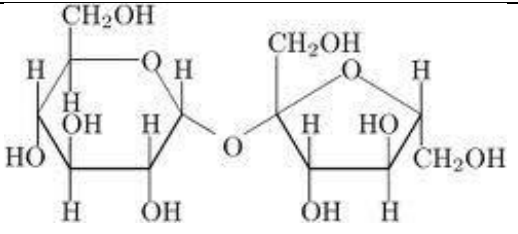
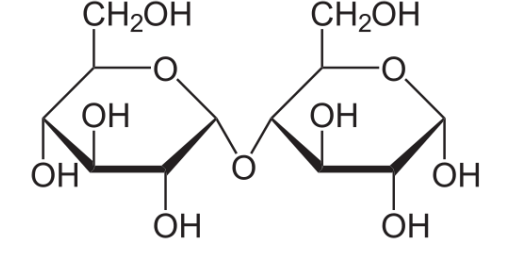
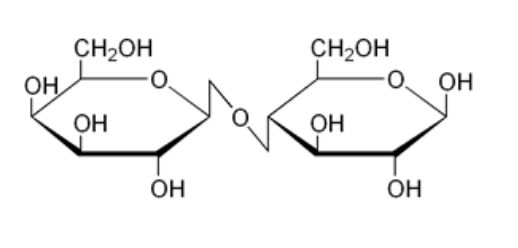
Pasaulyje gaminant bioetanolį dažniausiai naudojamos žaliavos yra cukranendrės ir kukurūzai. Lietuvoje bioetanoliiui gaminti naudojamos grūdinės kultūros, cukrinių runkelių atliekos ir bulvės. Didžiausios bioetanolio gamintojos 2017 metais yra Jungtinės Amerikos Valstijos, Brazilija ir Europos Sąjunga [9].

1.3. Žaliavos

Bioetanolio gamyboje gali būti naudojamos įvairios žaliavos. Paprasčiausios sudėties angliavandeniai – monosacharidai: gliukozė, fruktozė, D – ksilozė, manozė. Disacharidai: sacharozė, maltozė, laktozė. Žaliavų struktūra pateikiama (žr. 1.1 lentelė).

1.1 lentelė Mono- ir disacharidų šaltiniai ir struktūra

Pavadinimas	Šaltiniai	Struktūra
Gliukozė	Vaisių ir uogų sultys. Augaluose, polimeriniu pavidalu – krakmolos.	
Fruktozė	Vaisiai, daržovės, uogos.	
D - ksilozė	Mediena, pagrindinis hemiceliuliozės ksilano statybinis blokas.	

Sacharozė	Cukranendrės, cukriniai runkeliai.	
Maltozė	Lapuose, bulvių ir miežių daiguose, susidaro krakmolo skilimo metu	
Laktozė	Žinduolių pienas	

Monosacharidus mielės geba naudoti tiesiogiai kaip anglies šaltinį bioetanolio sintezei. Disacharidus visų pirma reikia suskaidyti iki tarpinių produktų – monosacharidų. Šios žaliavos puikiai tinka laboratoriniuose tyrimuose, analizuojant mielių vystymąsi ir bioetanolio gamybos mechanizmus, atrenkant gamybai optimalias sąlygas, kurias vėliau nesunku perkelti į pramoninius procesus. Sacharozės turinčios žaliavos: cukranendrės ir cukrinių runkelių atliekos plačiai taikomos pramoninėje bioetanolio gamyboje.

Žaliavos savo sudėtyje turinčios polisacharidą krakmolą: kukurūzai, grūdinės kultūros, bulvės naudojamos pramoninėje bioetanolio gamyboje, tačiau prieš tai turi būti tinkamai apdorojamos. Apdorojimo metu krakmolą turi būti hidrolizuojamas iki mažesnių, mono- ar disacharidų, tai atliekama naudojant fermentus, tokius kaip amilazė ar gliukoamilazė [10]. Kitas plačiai bioetanolio pramonėje taikomas polisacharidas yra celiuliozė.

Šiuo metu viena iš perspektyviausių žaliavų bioetanolio pramonėje – augalų (lignoceliuliozinė) biomasė [11]. Norint bioetanolio gamybai panaudoti celiuliozės polisacharidą turinčias žaliavas, jas reikia hidrolizuoti iki paprastųjų angliavandenių naudojant fermentus, tokius, kaip celiulazė [12].

Bioetanolio gamybai naudojamos etaloninės augalinės kilmės atliekos. Tai gali būti miško ir medienos pramonės atliekos, žemės ūkio atliekų biomasė. Norint atliekas panaudoti bioetanolio

gamybai, reikia atlikti pirminio apdorojimo etapus, tokius kaip lignino pašalinimas iš sausos biomasės ar drėgnos biomasės išspaudimas[8].

1.3.1. Fermentai ir jų pritaikymas

Fermentai – baltymai, vykdančys biocheminių reakcijų katalizatorių funkciją. Jie skirstomi į 6 pagrindines grupes, pagal vykdomų reakcijų tipą.

- Oksidoreduktazės – vykdo oksidacijos – redukcijos procesų katalizę.
- Transferazės – vykdo funkcinių grupių (metil-, acil-, amino- ar fosfatinės) pernašos katalizę.
- Hidrolazės – greitina (C-O, C-N, C-S) cheminių ryšių skaidymą, dalyvaujant vandens molekulėms.
- Liazės – greitina (C-O, C-N, C-S) cheminių ryšių skaidymą, nedalyvaujant vandens molekulėms. Gali suskaidyto ryšio vietoje sudaryti dvigubus ryšius.
- Izomerazės – greitina tos pačios molekulės vidumolekulinį persigrupavimą.
- Ligazės – greitina C-O, C-S, C-N ar C-C kovalentinių ryšių susidarymą, tam naudojamos ATP energiją.

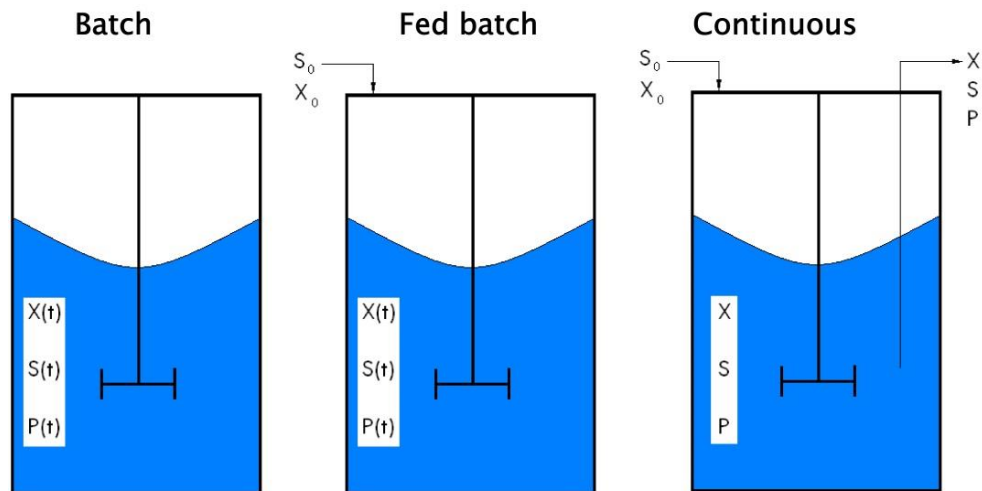
Bioetanolio gamyboje žaliavoms apdoroti naudojami hidrolazių klasės fermentai glikozidazės – jos hidrolizuoja cheminių ryšių angliavandeniuose skilimą. Glikozidazės dažniausiai naudojamos krakmolo hidrolizei: α -amilazė, β -amilazė, glukan 1,4- α -gliukozidazė (gliukoamilazė). Gliukoamilazė (EC 3.2.1.3) hidrolizuoja (1→4) ryšiais susietas α -D-gliukozės liekanas esančias prie neredukuojančio oligosacharido galo, taip atskeliama β -D-gliukozė. Celiuliozės hidrolizei dažniausiai naudojamas fermentas – celiulazė (EC 3.2.1.4). Celiulazė vykdo (1→4) - β -D-glikozidinių ryšių celiuliozėje endohidrolizę [13].

1.4. Fermentacija pramonėje

Šiuo metu sparčiai tobulėja biotechnologijos pramonės šakos, tokios kaip farmacija, fermentacija, žemės ūkis ar chemijos pramonė. Pastaraisiais dešimtmečiais biotechnologinių procesų optimizavimas yra vienas svarbiausių pramonės uždavinių. Siekiama išlaikyti optimalias darbo sąlygas, norint padidinti produktų išeigą ir pagerinti kokybę [14]. Biocheminių procesų kontrolė yra

sunki užduotis, todėl, kad reikia užtikrinti tikslių jautrių mikroorganizmų reguliavimą, taip pat negalima paveikti visos ląstelių vidinės aplinkos, kuri ir lemia biocheminių procesų eigą [15].

Pramoninėje fermentacijoje dažniausiai naudojami trijų tipų darbo režimai: pertraukiamas, pertraukiamas su pamaitinimu ir nepertraukiamas [16].



1.4 pav. Trys pagrindiniai fermentacijos tipai. pertraukiamas, pertraukiamas su pamaitinimu ir nepertraukiamas [17]

Pertraukiama fermentacija gali būti naudojama farmacijoje, kai nereikia didelių produkto kiekių. Tokiu atveju visas substratas į terpę sudedamas prieš fermentaciją, o po jos gautas produktas pašalinamas (surenkamas). Nepertraukiama fermentacija naudojama pramoninėse nuotekų valymo sistemose, ar pieno pramonėje, taip pat gaminant margariną. Šiuo atveju substratas tiekiamas ir produktas šalinamas nenutrūkstamai. Ekonomiškesnis yra pertraukiamas fermentacijos darbo režimas su pamaitinimu. Šio proceso metu substratas paduodamas į terpę tuomet, kai jo koncentracija sumažėja, o produktas šalinamas tik proceso pabaigoje [16].

Pertraukiama fermentacija su pamaitinimu gali būti vykdoma keliais būdais, reguliuojant maitinimo greitį iš anksto nustatytu metodu arba naudojant grįžtamojo ryšio kontrolę. Dažniausiai naudojamas pastovus pamaitinimas, eksponentinis pamaitinimas arba ilgesnis pamaitinimas [18]. Pramoninio masto fermentacijos procesus yra daug sunkiau ir sudėtingiau kontroliuoti, dėl limituojančių veiklos sąlygų. Todėl, dažniausiai, pramonėje procesus su pamaitinimu valdo žmonės rankiniu būdu, naudodami sukauptą patirtį. Toks proceso valdymas ne visada būna vienodas ir todėl retai gaunami atsikartojantys proceso rezultatai [19].

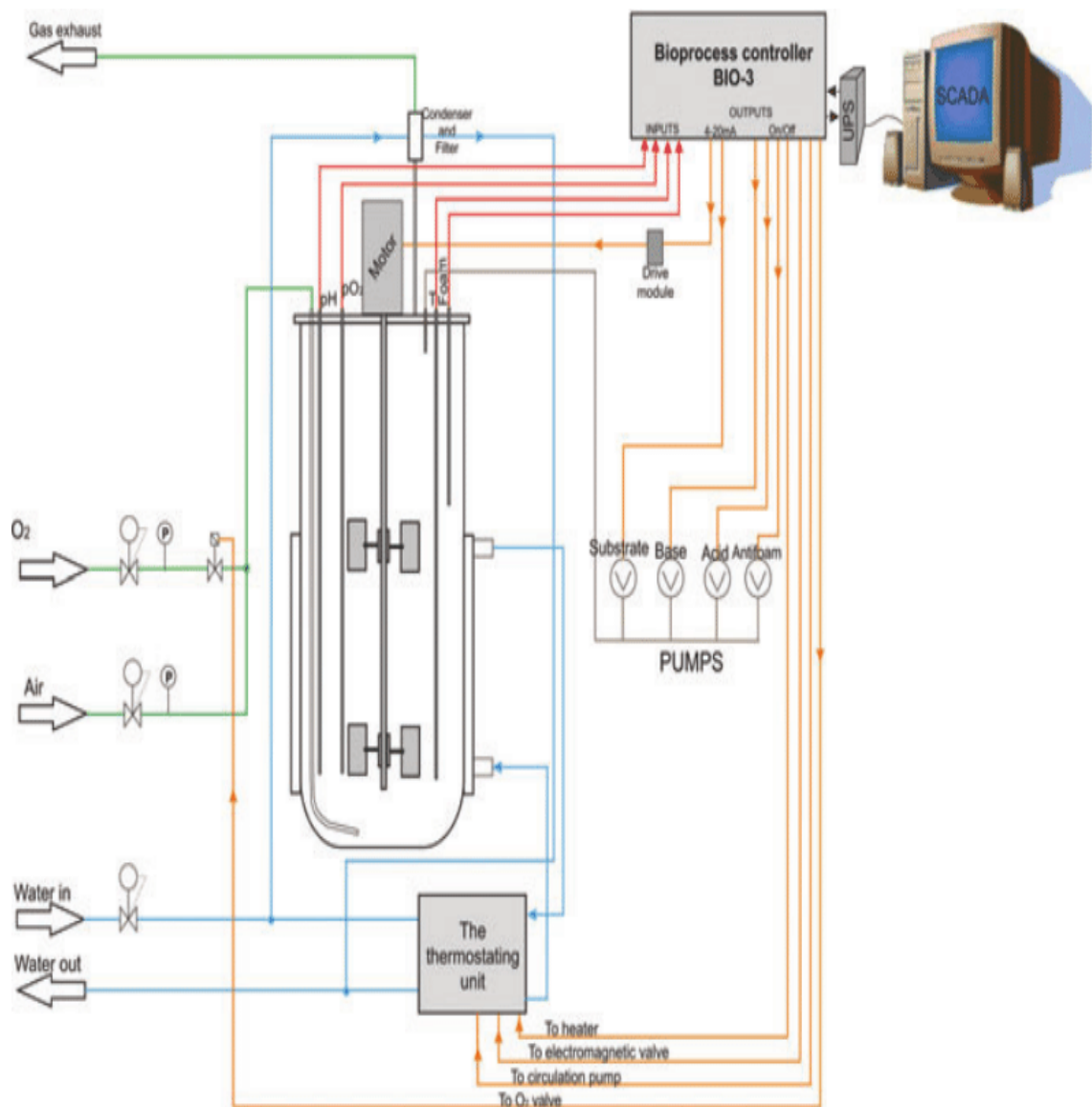
Norint gauti nuolat atsikartojančius fermentacijos su pamaitinimu rezultatus ir maksimalų efektyvumą su mažiausiomis įmanomomis sąnaudomis, stengiamasi, kad kuo mažiau operacijų reikėtų atlikti žmonėms. Bioprocesų optimizavimas atliekamas naudojantis matematiniais modeliais, aprašytais diferencinėmis masių balanso lygtimis [16].

1.4.1. Bioreaktoriai ir jų panaudojimas

Susiduriant su vis didesne konkurencija, bioprocesų optimizavimas yra geriausias pasirinkimas norint sumažinti gamybos išlaidas, atitikti saugos reikalavimus, padidinti proceso kokybę ir pagerinti atsikartojimą. Mikroorganizmų savybių tobulinimas ir terpės sudėties optimizavimas yra pirmieji žingsniai diegiant naujus biotechnologinius procesus. Žvelgiant iš inžinerinio valdymo srities pusės, manoma, kad matematiniais modeliais pagrįstas procesų optimizavimas ir tiesioginių veiklos sąlygų kontrolės gerinimas yra tolimesnis žingsnis optimizuojant pramoninės biotechnologijos procesus. Tai atlikti galima naudojant bioreaktorius.

Bioreaktorius – įrenginys ar sistema, skirtas biologiškai aktyvios aplinkos palaikymui. Bioreaktorių dažniausiai sudaro indas, kuriame vyksta biocheminiai procesai. Jame gali vykti aerobiniai ir anaerobiniai procesai.

Naudojant bioreaktorius su pakankamai tiksliais, klasikiniiais, uždaro ciklo valdymo metodais, galima nustatyti optimalius proceso vykdymo parametrus pvz.: augimo terpės temperatūrą ir pH [20]. Be to, naudojant bioreaktorius, galima atsižvelgti į skirtingą procesų dinamiką ir pritaikyti jiems kontrolės metodus [21]. Kai kuriuose bioreaktoriuose galima tiesiogiai stebėti ir valdyti tokius parametrus kaip slėgį, ištirpusio deguonies koncentraciją (aerobinėmis sąlygomis), maišymo greitį, vykdyti pamaitinimą, priklausantį nuo limitavimo substratu sąlygų. Kad būtų galima prižiūrėti ir kontroliuoti visus šiuos parametrus, reikalingos sudėtingos bioreaktoriaus sistemos (žr. 1.5 pav.) Tokiems bioreaktoriams reikalingas ne tik stiklinis indas, bet ir ventiliavimo, maišymo sistema, įvairūs elektrodai, pvz.: pH, ištirpusio deguonies koncentracijai, temperatūrai matuoti, padavimo ir valdymo sistemos, valdiklis ir kompiuteris reikalingiems duomenims apdoroti ir procesams valdyti.



1.5 pav. Stiklinio bioreaktoriaus (EDF-5.3 1, Riga, Latvia) schema [21]

Toks modelinis bioreaktorius gali būti pritaikytas ir pramonėje, ir mokslo laboratorijoje. Mokslinėse laboratorijose modeliuojami darbo režimai ir optimalios sąlygos, vykdomi eksperimentai, kurių metu stengiamasi sukontroliuoti ir kuo geriau atkartoti optimalias fermentacijos sąlygas, kad būtų gaunama didžiausia produktų išeiga. O pramonėje vykdomos specifinės mažo tūrio fermentacijos norint gauti nedidelius tikslinio produkto kiekius arba siekiant sumodeliuotus procesus pritaikyti didelio tūrio bioreaktoriuose.

1.5. Apžvalgos apibendrinimas

Projekte išanalizuoti literatūros šaltiniai, kuriuose aprašomi su bioetanolio gamyba susiję procesai ir metodai. Visų pirma plačiau apibūdinamos projekto metu naudojamos mielės – *S. cerevisiae*. Detaliai aptariamas vykdomo alkoholinės fermentacijos proceso reakcijos mechanizmas, be kurio sunku būtų suprasti bioetanolio gamybos eigą ir esmę.

Gaminant bioetanolį svarbu pasirinkti tinkamas žaliavas, literatūros apžvalgoje plačiau aptariami darbe naudojami mono- ir disacharidai. Supažindinama su žaliavomis, kuriose gausu krakmolingos ar lignoceliuliozinės žaliavos. Norint efektyviai panaudoti polisacharidais turtingas žaliavas naudojami fermentai, todėl rašto darbe apžvelgiama fermentų nomenklatūra ir apibūdinamos naudojamų fermentų katalizuojamos biocheminės reakcijos.

Svarbu bioetanolio gamybos procesą kuo geriau pritaikyti pramonėje, todėl literatūroje apžvelgiama, kokie pramoninės fermentacijos procesai jau yra taikomi. Optimizuojant terpės sudėtį ir perkeltant parametrus į pramoninius procesus naudojami modeliniai bioreaktoriai. Literatūros apžvalgoje pateikiami bioreaktorių veikimo principai ir jų panaudojimo galimybės.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Aparatūra

Naudotos aparatūros sąrašas:

- Autoklavas „CertoClav“;
- Autoklavas „HMC Europe“;
- Svarstyklės „Shimadzu“;
- Svarstyklės „KERN“;
- Svarstyklės „AXIS“
- pH-metras „WinLab“;
- Laminaras „Telstar BV-100“;
- Spektrofotometras „Shimadzu UV-1280“;
- Spektrofotometras „PG Instruments T80+“
- Magnetinė maišyklė „Heidoph MR Hei-Tec“;
- Magnetinė maišyklė „IKA RH basic 2“
- Sūkurinis maišytuvas „BiosanBioVortex V1“;
- Termostatas „Memmer IN 55“;
- Vandens vonelė „Biosan BWT-U“;
- Kavos malimo aparatas „Scarlet SL-1545“;
- Stalinė purtyklė – inkubatorius „Biosan ES-20“;
- Gliukomatis „Roche, Accu-ChekActive“
- Bioreaktorius „EDF-5.4“
- Bioreaktoriaus valdiklis „BIO 4“
- Padavimo siurblys „Masterflex L/S“

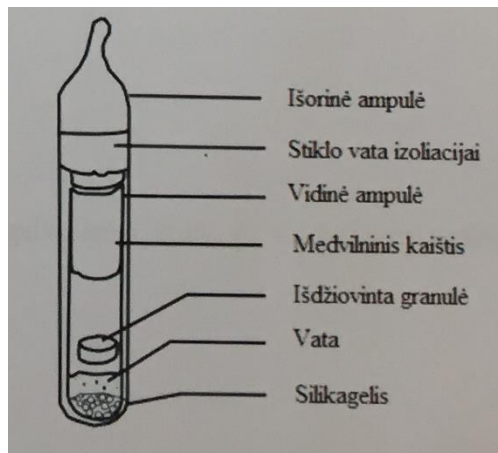
2.2. Tyrimams naudotos medžiagos

2.1 lentelė. Naudotos medžiagos

Pavadinimas	Cheminė formulė	Gamintojas
Etilo alkoholis	C_2H_5OH	Stumbras, Lietuva
Gliukozė	$C_6H_{12}O_6$	Biolife, Italija
Sacharozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Reachem s.r.o., Slovakia
D-Ksilozė	$C_5H_{10}O_5$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Fruktozė	$C_6H_{12}O_6$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Mielių ekstraktas	-	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Sojų peptonas	-	Liofilchem, Italija
Sieros rūgštis	H_2SO_4	Lach-Ner, Čekija
Natrio šarmas	NaOH	POCh, Lenkija
Druskos rūgštis	HCl	POCh, Lenkija
Kviečiai „Famulus“	-	UAB Dotnuva Baltic, Lietuva
Kviečiai „Etana“	-	UAB Dotnuva Baltic, Lietuva
Gliukoamilazė	-	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Celiulazė	-	SIGMA-ALDRICH, Vokietija

2.3. Dehidratuotų mielių *Saccharomyces cerevisiae* ampulės atidarymas

Tyrimams naudotos mielės *S. cerevisiae* 70424 Meyen ex E.C. Hansengautos iš biologinių resursų banko DSMZ. Ši mielių kultūra gauta, izoliuota nuo aplinkos, patalpinta į specialią ampulę, kurioje sudarytas vakuumas (žr. 2.1 pav.).

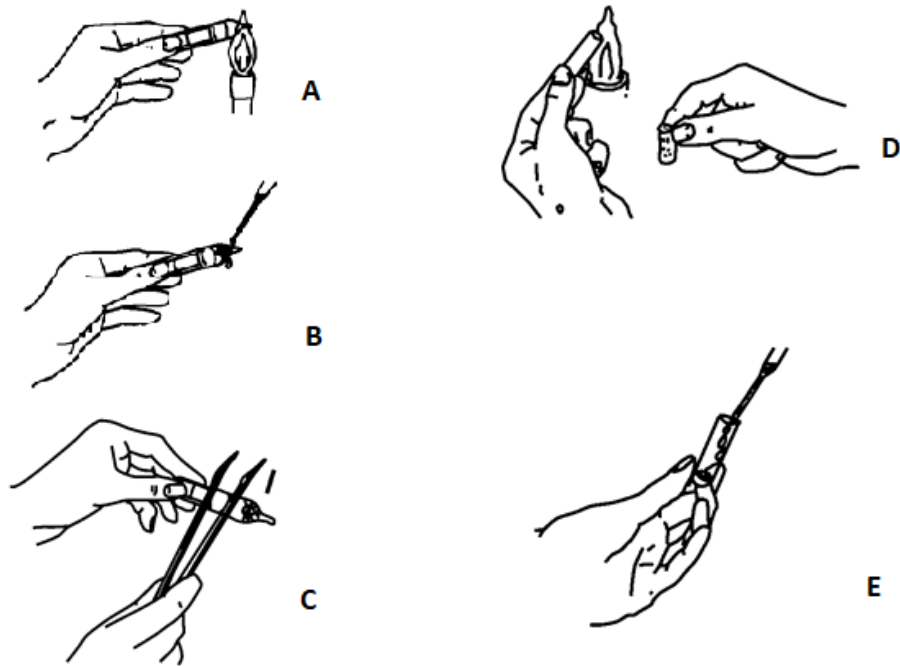


2.1 pav. Ampulė apsauganti išdžiovintą kultūrą

Norint atgaivinti gautą mielių kultūrą, reikia tinkamai atidaryti ampulę.

Atidarant atliekami veiksmai.

Išorinės ampulės antgalis pakaitintas liepsnoje (žr. 2.2 A pav.). Būtina dėvėti apsauginius akinius. Norint, kad stiklas suskiltų, ant ampulės užlašinta keli lašai vandens (žr. 2.2 B pav.). Naudojant pincetą, nuskelta stiklinė ampulės viršūnė (žr. 2.2 C pav.). Atsargiai pašalinta izoliuojanti medžiaga ir išimta vidinė ampulė.



2.2 pav. Ampulės atidarymo metodika

Trumpam išimtas apsauginis kamštis laikytas steriliomis sąlygomis, kol vidinės ampulės viršūnė buvo pakaitinta virš liepsnos (žr. 2.2 D pav.). Įlašinta 0,5 ml specialios kultūros atgaivinimo terpės (žr. 2.2 E pav.), apsauginis kamštis gražintas atgal ir laukta 30 min.

Praėjus nurodytam laikui, mėginys atsargiai išmaišytas ir perkeltas į mėgintuvėlį, kuriame yra 5 ml specialios terpės (žr. 2.2 lentelė). Iš šio mėgintuvėlio buvo galima sėti *S. cerevisiae* mieles į Petri lėkšteles ar mėgintuvėlius.

2.4. Mielių suspensijos gavimas

Mielės gautos dehidratuotoje formoje, jos atgaivinamos ir užsėjamos į Petri lėkšteles. Terpės sudėtis, reikalinga mielių atgaivinimui, pateikiama (žr.2.2 lentelėje). Terpės pH sureguliuojamas iki 6,2 naudojant 0,1 N natrio šarmo tirpalą ir 0,1 N sieros rūgšties tirpalą. Užsėtos mielės augintos 25°C temperatūroje 24 val.

2.2 lentelė

Terpės reikalingos *S. cerevisiae* atgaivinimui sudėtis

Komponentas	Kiekis
Mielių ekstraktas	3 g
Sojų peptonas	5 g
Salyklo ekstraktas	3 g
Gliukozė	10 g
Agaras	15 g
Distiliuotas vanduo	1000 ml

Po atgaivinimo, iš Petri lėkštelės paimta viena atskira ląstelių kolonija (užaugusi iš vienos ląstelės) ir užsėjama į 5 ml skystos terpės. Skystos terpės sudėtis pateikiama (žr. 2.3 lentelėje). Mielių suspensija auginama 28°C temperatūroje 24 val. Taip paruoštos mielių ląstelės laikomos šaldytuve 4°C temperatūroje ir naudojamos atliekant tyrimus.

2.3 lentelė.

Skystos terpės sudėtis

Terpės komponentas	Koncentracija g/l
Mielių ekstraktas	3
Sojų peptonas	5
Gliukozė (ar kitas anglies šaltinis)	10

2.5. Bioetanolio gavimas naudojant skirtingus anglies šaltinius

Atliekant tyrimus anglies šaltiniais buvo naudoti mono- ir disacharidai: gliukozė, sacharozė, fruktozė ir D-ksilozė. Terpės reikalingos *S. cerevisiae* auginimui sudėtis pateikta (žr. 2.3 lentelėje). Ruošiant terpes anglies šaltinis ruoštas atskirai, siekiant išvengti gliukozės karamelizacijos. Terpės pH nuo 4,7 iki 4,8 sureguliuotas 0,1 N natrio šarmo tirpalu ir 0,1 N sieros rūgšties tirpalu. Taip pat paruoštas pamaitinimo tirpalas 2,5g cukraus į 4 ml distiliuoto vandens. Tirpalai sterilizuoti autoklave 121°C temperatūroje 15 min.

Atlikus sterilizavimą tirpalai sumaišyti ir terpė su anglies šaltiniu išpilstyta į 500 ml kūginės kolbas po 245ml ir užsėta po 5 ml (2%) *S. cerevisiae* mielių ląstelių suspensijos. Taip paruoštas kolbos turinys laikytas 28 °C temperatūroje 24 val maišant 180 aps/min greičiu.

Praėjus 24 val kolba uždengta specialiu kamščiu su įstatytu fermentacijos vamzdeliu, kuris užpildytas distiliuotu vandeniu (žr. 2.3 pav.), kad iš kolbos galėtų išeiti CO₂, tačiau oras nebepatektų. Taip paruoštas bandinys paliktas 72 val fermentacijai 28°C temperatūroje, be maišymo.



2.3 pav. Fermentacija kolboje su kamščiu į kurį įstatytas fermentacijos vamzdelis

Po 72 val fermentacijos paimta 100 ml terpės distiliavimui. Vykdyta tiesioginė terpės distiliacija, išmatuotas gauto distiliato tūris ir tankis.

2.5.1. Tyrimų metu atlikti biomasės kiekio matavimai

Atliekant tyrimus, kurių metu naudoti skirtingi anglies šaltiniai mono- ar di-sacharidai, biomasės kiekio matavimai vykdyti du kartus. Pirmą kartą mielių biomasės kiekis vertintas po 24 val nuo užsėjimo, o antrą kartą po 72 val alkoholinės fermentacijos. Optinis mėginio tankis matuotas spektrofotometru ties 600nm bangos ilgiu. Palyginamasis tirpalas buvo skysta neužsėta terpė.

2.6. Bioetanolio gavimas naudojant kviečius

Tyrimams naudoti dviejų tipų kviečiai „Famulus“ ir „Etana“, kurie gauti iš įmonės UAB „Dotnuva Baltic“. Tyrimų pradžioje kiekvienam eksperimentui atsverta po 25 g grūdų. Jie susmulkinti kavos malimo aparatu ir patalpinti į 500 ml tūrio kūginę kolbą su šlifą. Kviečiai užpilti 250 ml distiliuoto vandens ir kaitinti 90°C 30 min nuolat maišant. Po kaitinamo mėginiai atvėsinti iki 50°C temperatūros ir sureguliuotas pH iki 5,2 – 5,3, naudojant 0,1 N natrio šarmą ir 0,1 N druskos rūgštį.

Nustačius tinkamą pH vertę į ruošiamą terpę įpilta 0,25 ml gliukoamilazės fermento tirpalo.

Kai „Famulus“ kviečių hidrolizė vykdyta naudojant dviejų tipų fermentus, įpilta 0,125 ml gliukoamilazės fermento tirpalo ir 0,125 celiulazės fermento tirpalo.

Vykdyta fermentinė kviečių hidrolizė patalpinant kolbą į 55°C temperatūros vandens vonią, joje laikyta 1 val. nuolat maišant. Po hidrolizės kolbos turinys sterilizuotas 121°C temperatūroje 15 min.

Sterilizuotas kolbos turinys atvėsintas po tekančio vandens srove iki 30°C temperatūros. Į taip paruoštą terpę įpilta 0,5 ml *S. cerevisiae* mielių suspensijos, kolba uždengta specialiu kamščiu į kurį įstatytas fermentacijos vamzdelis, užpildytas distiliuotu vandeniu (žr. 2.3 pav.). Fermentacija vykdyta 72 val 28°C temperatūroje, proceso metu stebėti nuolat iš kolbos besiskiriantys oro burbulai.

Praėjus 72 val kamštis išimtas, terpė nufiltruota per marlę ir paimta 100 ml filtrato tiesioginiai distiliacijai. Išmatuojamas distiliato tūris ir tankis.

2.6.1. Fermentų tirpalų paruošimas

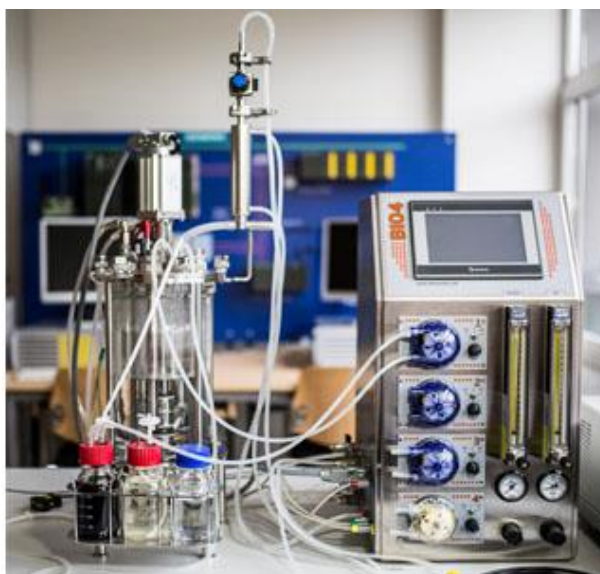
Fermentiniai grūdinės žaliavos hidrolizei naudoti dviejų tipų fermentai: gliukoamilazė ir celiulazė. Gliukoamilazės fermentas atpalaiduoja β-gliukozę nuo krakmolo neredukuotojo galo. Celiulazės fermentas hidrolizuoja β – 1,4 ryšius celiuliozės grandinėse, taip susidaro trumpesni sacharidai, oligosacharidai ar β-gliukozė.

Ruošiant celiulazės tirpalą atsverta 20mg fermento ir ištirpinta 1 ml distiliuoto vandens.

Gliukoamilazės fermento tirpalas ruoštas atsveriant 40 mg fermento ir ištirpinant 1 ml distiliuoto vandens

2.7. Bioetanolio gavimo optimizavimas bioreaktoriuje

Buvo atliktas bioetanolio gavimo eksperimentas naudojant 5 l bioreaktorių (žr. 2.4 pav.). Tyrimui atlikti buvo parinkta gliukozė, nes ją naudojant kolboje gauta didžiausia bioetanolio išeiga. Visų pirma buvo paruošta 0,5 l *S. cerevisiae* mielių suspensijos. Paruoštos dvi kolbos po 250 ml, taip pat, kaip aprašyta 2.4 skyriuje. Auginta 24 val, tada spektrofotometru išmatuota biomasės koncentracija.



2.4 pav. Bioreaktorius ir valdiklis naudoti mielių alkoholinei fermentacijai

Tuo pat metu paruošti terpės ir gliukozės tirpalai, kurie naudojami bioreaktoriuje. Ruošiama 3 l terpės, kurios sudėtis pateikta (žr. 2.3 lentelėje), tik gliukozės tirpalas ruoštas didesnės koncentracijos. Jos atsiversta 70 g, kad po inokuliacijos supylimo bendrame pradiniam fermentacijos tūryje (3,5 l) gliukozės koncentracija būtų 20 g/l. Taip pat paruoštas 1,7 l gliukozės pamaitinimo tirpalas, kurio koncentracija 0,55 kg/l. Tirpalai, terpė, bioreaktorius su elektrodais ir prijungtais vamzdeliais sterilizuoti autoklave 121°C temperatūroje 20 min.

Sterilus bioreaktorius statytas ant svarstyklių ir sujungtas su valdikliu. Prijungti 1 N sieros rūgštis ir 1 N natrio šarmo tirpalai reikalingi pH suregulavimui ir palaikymui. Alkoholinei fermentacijai reikalingos anaerobinės sąlygos, todėl oro padavimo vamzdelis turi būti užspaustas.

Suruošus aparatūrą į bioreaktorių supumpuota sterili terpė ir gliukozės tirpalas, sureguliuotas pH 4,7. Nustatomas maišymas 100 aps/min, temperatūra 28°C, palaikoma, kol daviklių (pH, temperatūros) parodymai nusistovi. Galiausiai į bioreaktorių supumpuota 0,5 l mielių *S. cerevisiae* suspensijos augintos 24 val. Taip pradėtas vykdyti bioetanolio gamybos optimizavimo tyrimas. Eksperimentas vykdytas apie 62 val.

2.7.1. Tyrimo metu atlikti matavimai

Atliekant bioetanolio gavimo optimizavimo tyrimą, bioreaktoriuje, elektrodais stebėti, tokie parametrai, kaip pH ir ištirpusio deguonies koncentracija. Dienos metu, kas 1 – 2 val imtas 6 ml terpės mėginys. Paėmus mėginį nustatyta ištirpusios gliukozės ir biomasės koncentracija.

Ištirpusios gliukozės koncentracijos nustatymas.

Iš bioreaktoriaus paimtas terpės mėginys 21 kartą skiestas distiliuotu vandeniu ir išmaišytas. Į gliukomatį (žr. 2.5 pav.) įstatyta vienkartinė matavimo juostelė, ant jos užlašintas 1 lašas paruošto mėginio.



2.5 pav. Gliukomatis „Accu-Chek“

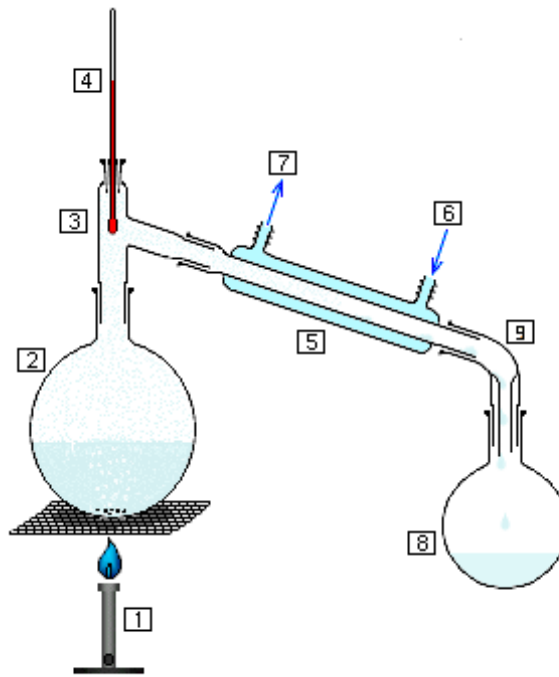
Gliukomatis rodo gliukozės koncentraciją mmol/l. Naudojama gliukozės koncentracija išreikšta g/l, todėl gautas rezultatas perskaičiuotas, padauginus iš skiedimų skaičiaus ir iš molinės masės 0,18 g/mmlo.

Biomasės kiekis nustatytas spektrofotometru ties 600 nm bangos ilgiu. Kaip palyginamasis tirpalas naudota terpė be mielių.

Fermentacijos metu, per 62 val iš bioreaktoriaus paimti 4 mėginiai po 120 ml etanolio koncentracijai nustatyti. Etanolio koncentracija nustatyta paimant 100 ml terpės tiesioginei distiliacijai. Išmatuotas gauto distiliato tūris ir tankis.

2.8. Distiliavimas

Paimtas 100 ml tiriamojo mėginio, jis supiltas į apvaliadugnę distiliavimo kolbą, kuri sujungta su kita distiliavimo aparatūra, kaip vaizduota paveiksle (žr. 2.6 pav.). Kolbos turinys kaitintas, prižiūrint, kad neužputotų ir neišbėgtų. Tolygiai besiskiriantys garai kondensuojasi vandeniu aušinaname kondensatoriuje, tada surinkti distiliato surinkimo kolboje.



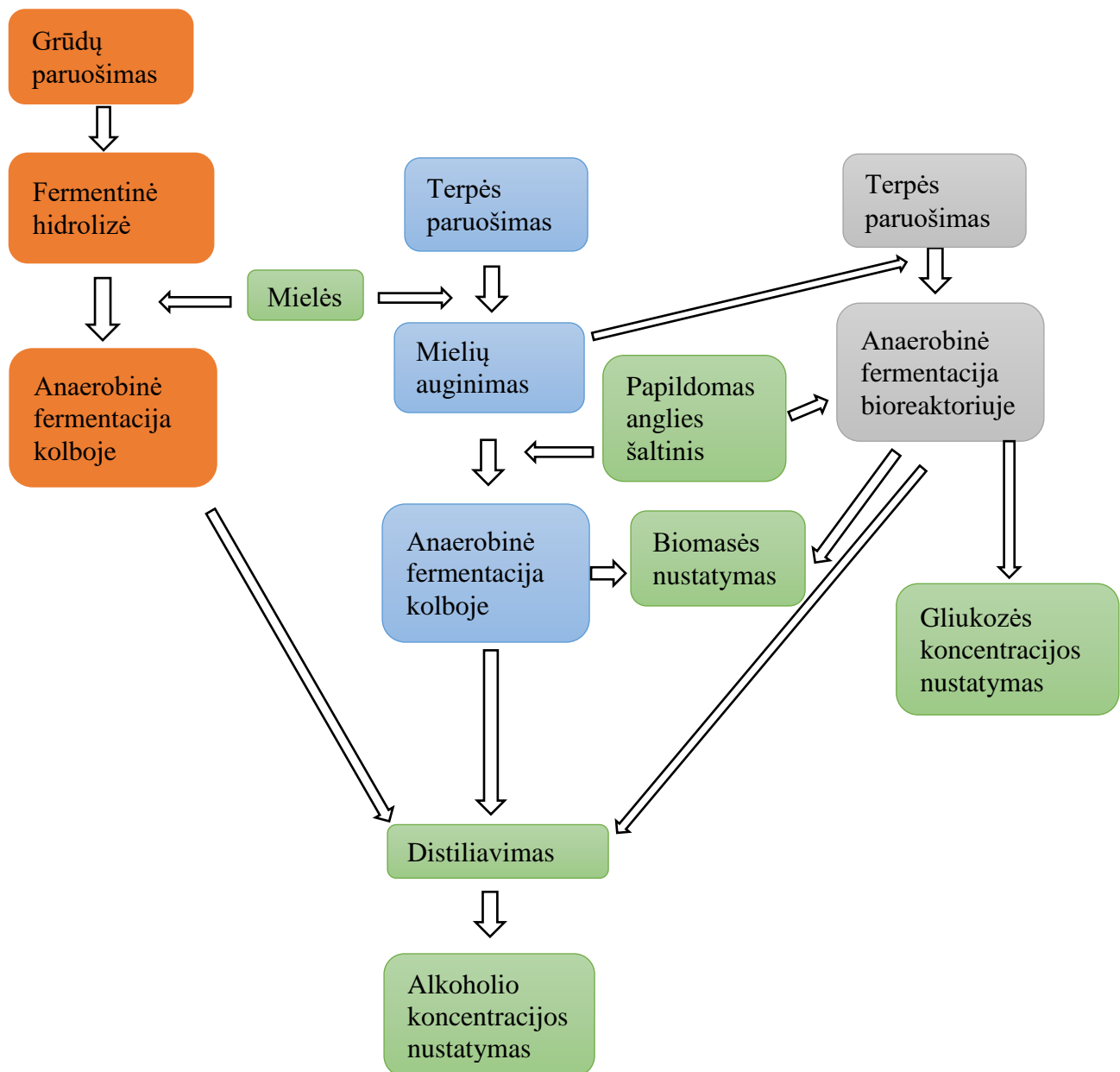
2.6 pav. Distiliavimo aparatūra. 1 – šilumos šaltinis (dujinis degiklis); 2 – apvaliadugnė kolba; 3 – distiliavimo galvutė; 4 – termometras; 5 – kondensatorius; 6 – aušinimo vandens įėjimas; 7 – aušinimo vandens išėjimas; 8 – distiliato surinkimo kolba; 9 – distiliavimo lenktis

2.9. Etanolio koncentracijos nustatymas

Surenkama 30-50 ml distiliato, jis supiltas į sausą matavimo cilindrą tiksliai tūriui išmatuoti. Išmatavus tūrį pamatuota tiriamojo mėginio temperatūrą, ji turi būti 20°C, jei tokia nėra, tai mėginys atitinkamai pašildytas, arba atvėsintas. Sureguliuavus temperatūrą į matavimo cilindrą įmerktas areometras. Areometras matavimo cilindre turi laisvai plaukti, neliesti nei dugno, nei sienelių. Areometru išmatuotas distiliato tankis, pagal kurį nustatyta etanolio koncentracija.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

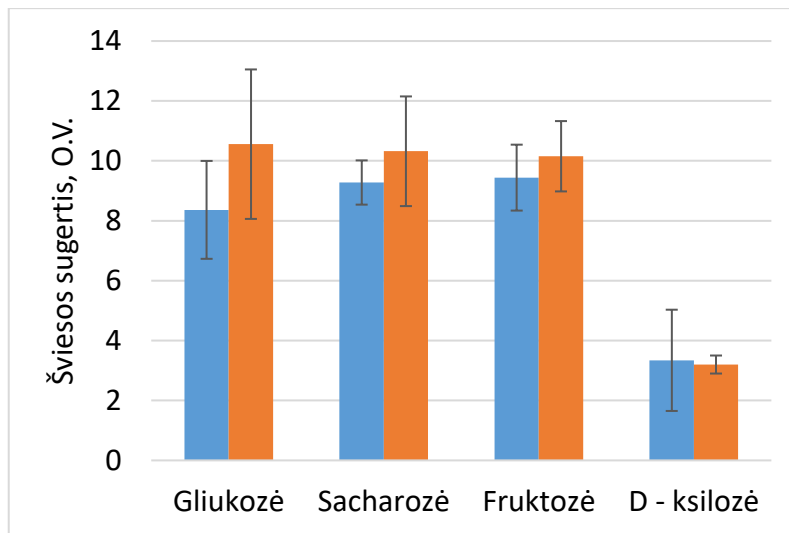
Paveiksle (žr. 3.1 pav.) pateikiama bendra tyrimų schema. Vykdyti trijų tipų eksperimentai. Oranžine spalva nurodyti tyrimai atliekami naudojant kviečius, mėlyna spalva žymi tyrimus atliekamus kolboje su skirtingais anglies šaltiniais, pilka spalva nurodyti tyrimai atliekami 5l bioreaktoriuje. Žalia spalva žymi bendrus veiksmus ar medžiagas, naudojamus skirtinguose eksperimentų etapuose.



3.1 pav. Bendra tyrimų schema

3.1. Bioetanolio gavimas naudojant skirtingus anglies šaltinius

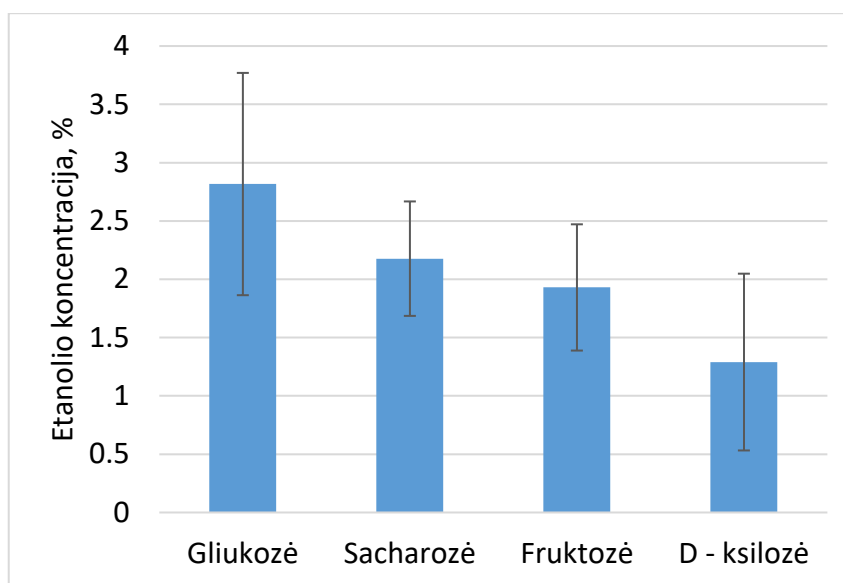
Bioetanolis buvo gautas naudojant skirtingus anglies šaltinius: gliukozę, sacharozę, fruktozę ir D-ksilozę. Eksperimentai vykdyti ~96 val 28°C temperatūroje, kai terpės pH 4,7 – 4,8. Tyrimų metu buvo stebimas terpės šviesos sugerties padidėjimas vykdant alkoholinę fermentaciją. Gauti šviesos sugerties rezultatai pateikti (žr. 3.2 pav.).



3.2 pav. Šviesos sugerties pokytis. Mėlyna spalva – matavimai po 24 val auginimo; oranžinė spalva – po 72 val alkoholinės fermentacijos

Pateikti duomenys rodo (žr. 3.2 pav.), kad dažniausiai nepavyko išvengti šviesos sugerties padidėjimo. Dalis anglies šaltinio, alkoholinės fermentacijos metu, buvo paversta į biomasę. Gauti duomenys naudojant gliukozę, sacharozę ir fruktozę gauti panašūs, fermentacijos pabaigoje šviesos sugertis apie 10 o.v. Anglies šaltiniu naudojant D – ksilozę stebimas šviesos sugerties sumažėjimas alkoholinės fermentacijos pabaigoje. Galima teigti, kad naudojant D – ksilozę, anaerobinėmis sąlygomis, mielių *S. cerevisiae* populiacija nedidėjo. Lyginant duomenis, gautus su D – ksiloze ir kitais anglies šaltiniais, matyti, kad šis cukrus mažiausiai tinkamas mielių auginimui.

Pagrindinis tyrimo tikslas, gauti kuo didesnę bioetanolio koncentraciją. Gauti bioetanolio išėigos duomenys pateikiami (žr. 3.3 pav.).



3.3 pav. Bioetanolio koncentracija gauta naudojant skirtingus anglies šaltinius

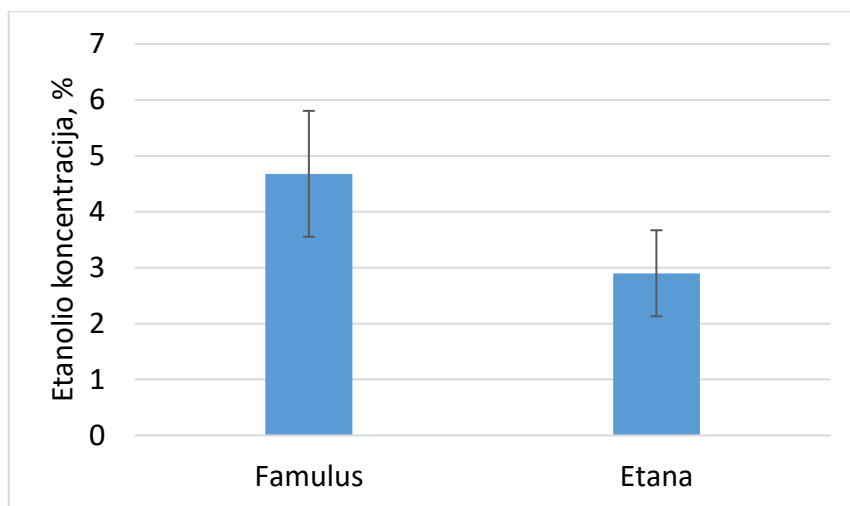
Iš pateiktų duomenų (žr. 3.3 pav.), matyti, kad didžiausios bioetanolio koncentracijos gaunamos naudojant gliukozę 2,82%. Mažiausiai bioetanolio, tomis pačiomis sąlygomis, gauta naudojant D – ksilozę 1,29%. Gauti rezultatai naudojant sacharozę ir fruktozę buvo panašūs, tačiau tinkamesnis anglies šaltinis buvo sacharozė.

Bendri rezultatai rodo, kad sudėtinga pasiekti didesnę nei 3% bioetanolio koncentraciją. Lyginant su kitais literatūros šaltiniais, naudojant *S.cerevisiae* mieles bioetanolio išeiga turėtų siekti iki 10 % Taip pat pastebima, kad gautos reikšmės nėra labai tikslios, nes eksperimentiniai duomenys išsibarstę, t. y. turi santykinai nemažas paklaidas. Paklaidos gali išaugti, dėl skirtingo mielių ląstelių kiekio pradinėje suspensijoje, arba distiliavimo klaidų.

Išanalizavus duomenis, galima teigti, kad tinkamiausias anglies šaltinis bioetanoliui gauti buvo gliukozė. Todėl, šis cukrus pasirinktas tolimesniems tyrimams bioreaktoriuje.

3.2. Bioetanolio gavimas naudojant grūdus

Bioetanolio gavimo tyrimams naudojami dviejų tipų kviečiai „Famulus“ ir „Etana“. Norint, kad mielės galėtų sintetinti bioetanolį, visų pirma kviečiuose esantys angliavandeniai turi būti hidrolizuojami. Pirmuosiuose eksperimentuose hidrolizei naudojamas fermentas – gliukoamilazė, kuri skaido krakmolingą žaliavą į smulkesnius cukrus. Tyrimai vykdomi, kai terpės pH 5,2 – 5,3. Bioetanolio gavimo rezultatai pateikiami (žr. 3.4 pav.).

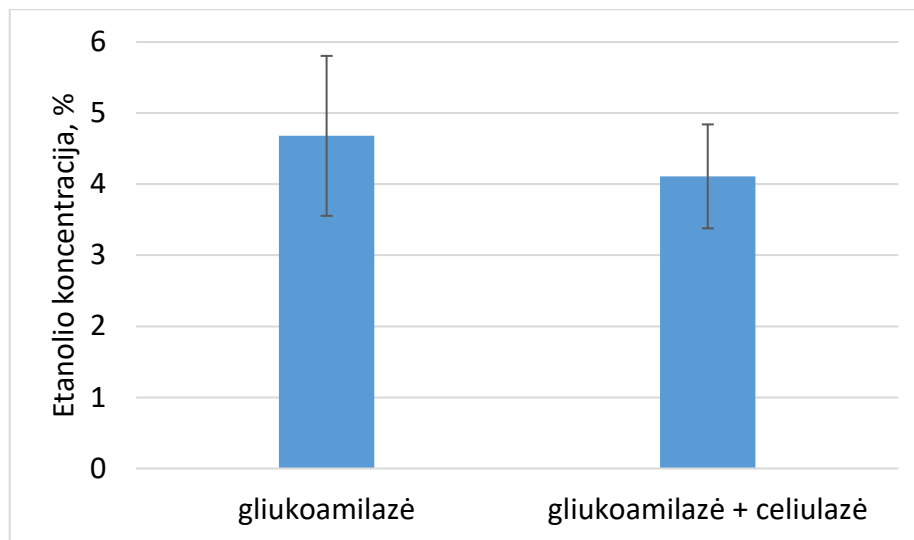


3.4 pav. Bioetanolio koncentracija gauta naudojant grūdus ir gliukoamilazės fermentą

Iš pateiktų duomenų, matyti (žr. 3.4 pav.), kad didesnė bioetanolio išeiga gauta naudojant „Famulus“ tipo kviečius 4,68%. Naudojant šiuos grūdus, gaunama bioetanolio koncentracija yra didesnė nei naudojant gryną anglies šaltinį. Tokie rezultatai, kelia hipotezę, kad kviečių hidrolizės metu terpėje susidaro didesnė mono- ir disacharidų koncentracija, nei kad naudojama pirmuose eksperimentuose.

Kai tyrimams naudojami „Etana“ tipo kviečiai, gauti rezultatai (4,11%) labai panašūs, į gautus naudojant gryną gliukozę. Reikia pabrėžti, kad grūdus naudojant, kaip žaliavą bioetanoliui gauti, nenaudojami jokie papildomi terpės komponentai. Taigi, ekonomiškai naudinga bioetanolio gamyboje naudoti grūdines žaliavas.

Grūdinės žaliavos savo sudėtyje turi ne tik polisacharidą krakmolą, bet ir celiuliozės, todėl, norint kuo efektyviau išnaudoti žaliavą, buvo vykdomi kiti eksperimentai. Jiems pasirinkti kviečiai „Famulus“, nes su jais gaunama didžiausia bioetanolio išeiga. Šių kviečių hidrolizei nuspręsta naudoti dviejų tipų fermentus: gliukoamilazę ir celiulazę vienu metu. Šiuo atveju, gliukoamilazės fermento pilita 0,125ml. Gauti rezultatai palyginti su pirmaisiais, kuriuose naudoti „Famulus“ tipo grūdai (žr. 3.5 pav.).



3.5 pav. Bioetanolio išeiga iš „Famulus“ kviečių, hidrolizei naudojant skirtingos sudėties fermentų tirpalus

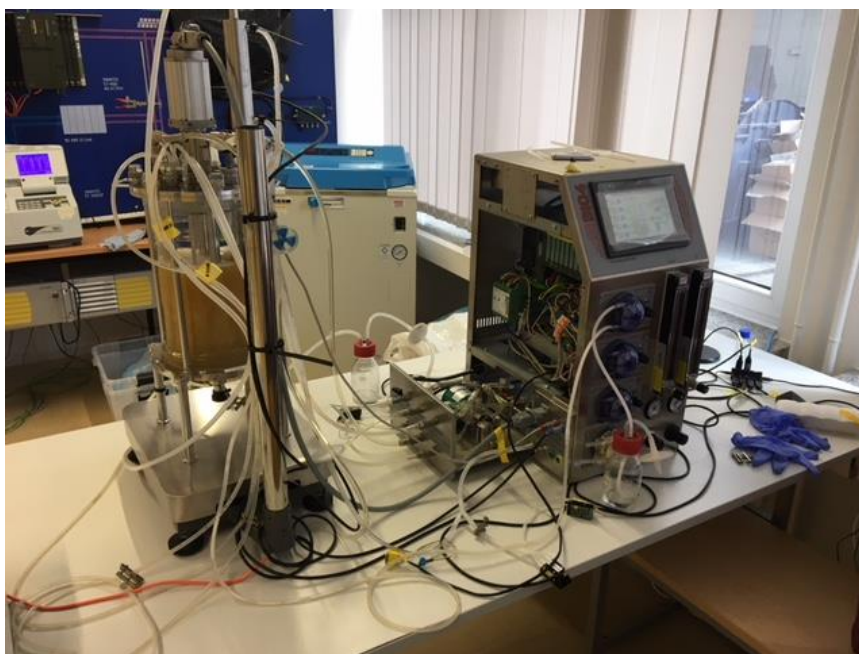
Abiejų eksperimentų metu gautos bioetanolio koncentracijos panašios, tačiau didesnę bioetanolio koncentraciją terpėje galima pasiekti naudojant vien gliukoamilazės fermentą. Naudojant abu fermentus, gliukoamilazės pilita per pus mažiau, todėl galime teigti, kad celiulazė taip pat tinkamas fermentas grūdų hidrolizei ir jį galima sėkmingai taikyti bioetanolio gamyboje, kai siekiama kuo geriau įsisavinti grūdinės kultūros žaliavas.

Išanalizavus visus tyrimus, buvo pastebėta, kad atliekant tyrimus su mono- ir disachridais rezultatai varijuoja, tačiau procentinė bioetanolio išeiga nebuvo didelė. Šiuose tyrimuose skirtingi sacharidai naudoti tais pačiais kiekiais – 10 g/l.

Vykdamas eksperimentus su kviečiais naudota žaliavos koncentracija – 100 g/l. Tiksliai nenustatyta, kiek mielėms tinkamų sacharidų susidarė kviečių hidrolizės metu, bet buvo daroma prielaida, kad jų koncentracija viršijo 10 g/l, todėl buvo gauta didesnė bioetanolio išeiga. Į šią prielaidą atsižvelgta ruošiantis bioetanolio gavimo optimizavimo tyrimams bioreaktoriuje. Vykdamas eksperimentą bioreaktoriuje, pasirinkta pradinė gliukozės koncentracija – 20 g/l, buvo didesnė, nei naudota kolbose.

3.3. Bioetanolio gavimo optimizavimas bioreaktoriuje

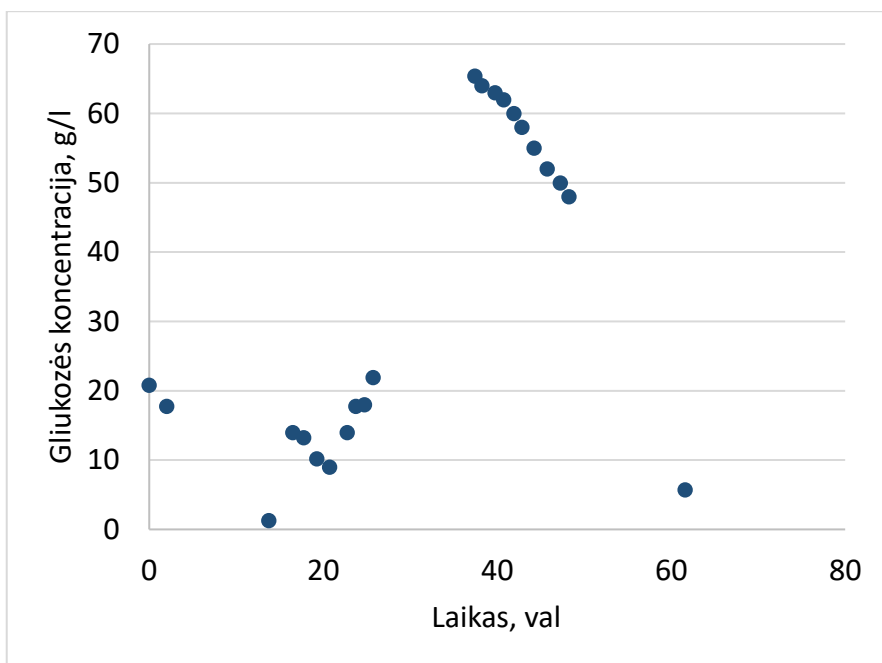
Bioetanolio gavimo optimizavimo tyrimas vykdytas 5 l talpos bioreaktoriuje „EDF-5.4“. Šiam tyrimui, kaip anglies šaltinis naudota gliukozė, jos pradinė koncentracija terpėje buvo 20,79 g/l. Eksperimentas vykdytas anaerobinėmis sąlygomis, lėtai maišant – 100 aps/min greičiu, 28°C temperatūroje. Sureguliuotas terpės pH palaikomas nuo 4,7 iki 5,1. Alkoholinė fermentacija bioreaktoriuje pavaizduota (žr. 3.6 pav.).



3.6 pav. Alkoholinė fermentacija bioreaktoriuje „EDF 5.4“

Bioreaktorių ir kai kuriuos jame vykstančius procesus galima stebėti, bei valdyti tiesiogiai arba nuotoliniu būdu. Stebint iš bioreaktoriaus išeinančio CO₂ kiekį, galima įvertinti, kiek gliukozės suvartojama. Naudojantis tokiomis bioreaktoriaus galimybėmis, nakties metu buvo galima vykdyti pamaitinimą gliukoze, ar sureguliuoti sumažėjusį pH.

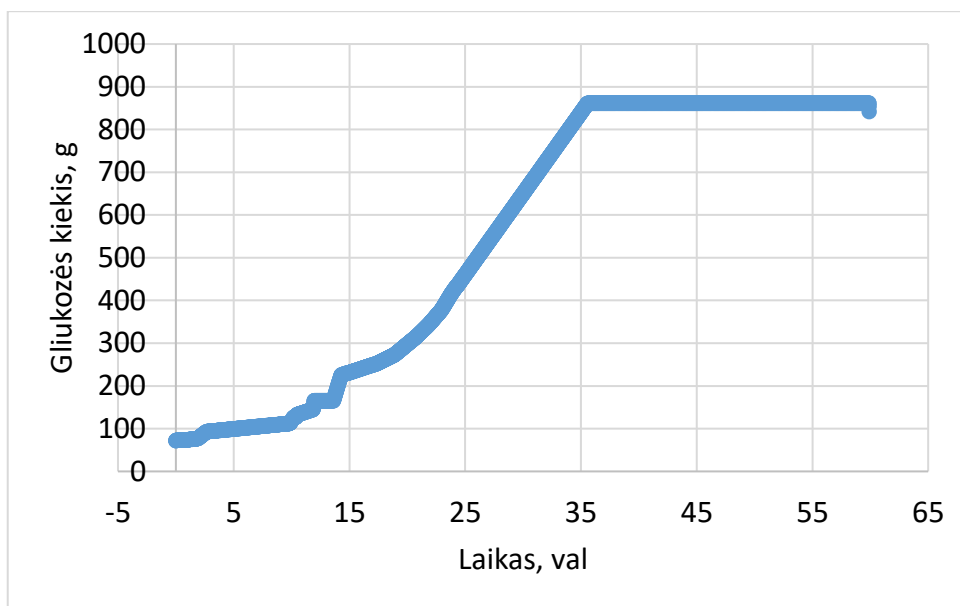
Vykdytos fermentacijos tipas – pertraukiama su pamaitinimu. Gliukozė buvo pumpuojama į bioreaktorių, palaikant tam tikrą anglies šaltinio koncentraciją. Palaikoma gliukozės koncentracija buvo keičiama, priklausomai nuo fermentacijos eigos. Gliukozės koncentracijos duomenys pateikti (žr. 3.7 pav.).



3.7 pav. Gliukozės koncentracijos kitimas alkoholinės fermentacijos metu

Iš pateiktų duomenų (žr. 3.7 pav.), matyti, kad gliukozės koncentracija fermentacijos pradžioje 20,78 g/l. Per pirmas 2 val ji sumažėjo tik keliais gramais. Matavimai buvo vykdomi tik dienos metu, mielių *S. cerevisiae* užsėjimas į bioreaktorių atliktas 19 val, todėl paveiksle matomas matavimų trūkumas.

Buvo planuota, kad 20 g/l gliukozės koncentracijos užteks ilgesniam laikui, tačiau per 14 val jos suvartota kur kas daugiau, nes nakties metu teko pradėti pamaitinimą. Bendras gliukozės, sudėtos į terpę, kiekis pateikiamas (žr. 3.8 pav.)



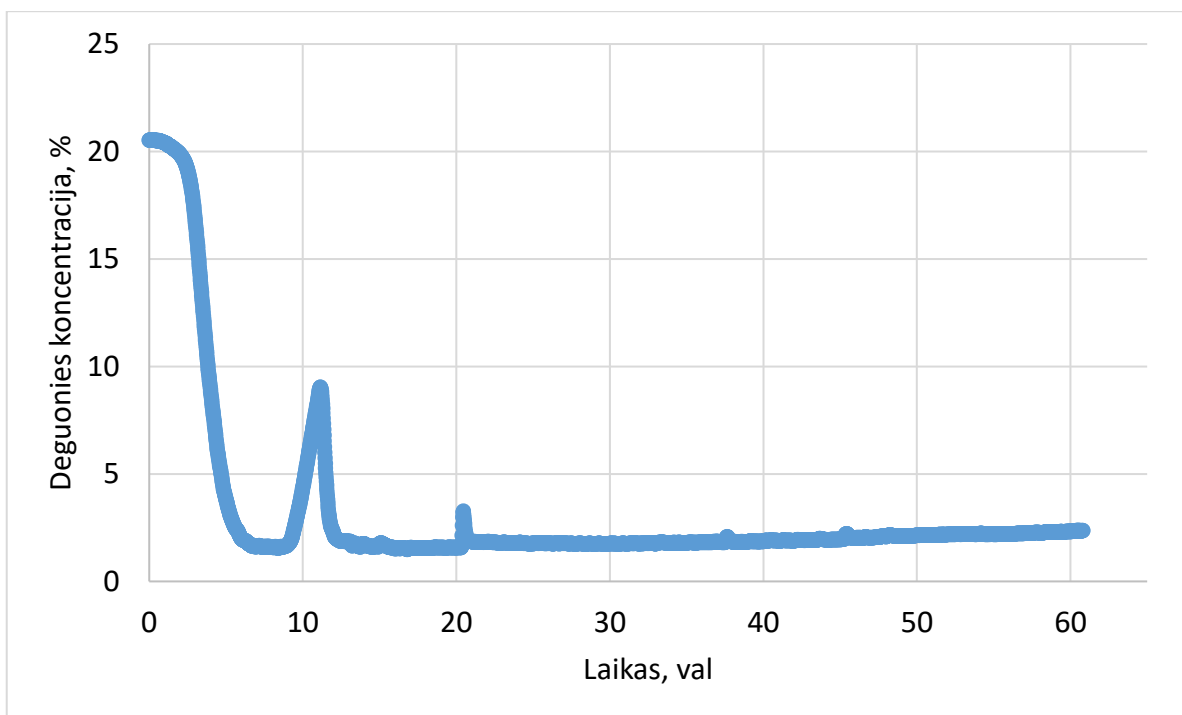
3.8 pav. Bendro, supumpuoto į bioreaktorių, gliukozės kiekio priklausomybė nuo laiko

Gliukozės supumpavimo duomenys buvo tikslinami kas 1 min, todėl galime stebėti bendrą gliukozės kiekio kitimo vaizdą visos fermentacijos metu.

Po 14 val fermentacijos gliukozės koncentracija tebuvo 1,28 g/l, nors tokiu metu į terpę jau buvo sudėta 135 g cukraus, tai dvigubai didesnis kiekis, nei pradinis. Sprendžiant iš gliukozės suvartojimo mielės *S. cerevisiae* gyvybingos ir sparčiai vykdo alkoholinę fermentaciją.

Nuo 14 iki 26 fermentacijos valandos gliukozės koncentracija kinta nuo 9 g/l iki 22 g/l. Antrosios fermentacijos nakties metu buvo supumpuota 414 g gliukozės. Toks didelis kiekis supumpuotas pasirinkus per didelį gliukozės pumpavimo greitį. Atlikus gliukozės koncentracijos matavimus 37-ąją fermentacijos valandą, nustatyta, kad terpėje buvo 65 g/l gliukozės. Nuo 37-tos fermentacijos valandos gliukozė į bioreaktorių nebepumpuota. Stebėtas gliukozės koncentracijos mažėjimas iki alkoholinės fermentacijos pabaigos 62-os valandos.

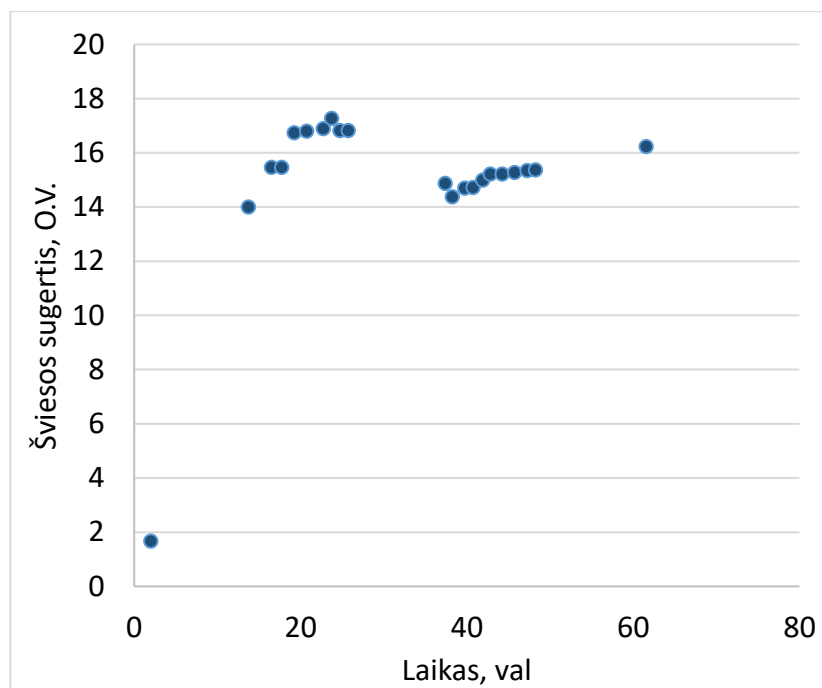
Vykdamas fermentaciją bioreaktoriuje, buvo stebėta iš bioreaktoriaus išeinančių dujų sudėtis. Naudojant šiuos duomenis, nakties metu buvo galima spręsti apie bioreaktoriuje vykstančius procesus. Iš bioreaktoriaus išeinančio CO₂ signalas nesuteikė daug informacijos. Verta apžvelgti O₂ sensoriaus signalą iš bioreaktoriaus išeinančiose dujose, jis patektas (žr. 3.9 pav.)



3.9 pav. Deguonies koncentracijos, iš bioreaktoriaus išeinančiose dujose, kitimas laike

Pateiktame paveiksle (žr. 3.9 pav.) matyti deguonies koncentracijos, iš bioreaktoriaus išeinančiose dujose, kitimas laike. Proceso pradžioje matoma 21% deguonies koncentracija, kuri atitinka jos koncentraciją ore. Fermentacijai įsibėgėjant, didėjant deguonies suvartojimui išsiskiriantis vis didesnis CO₂ dujų kiekis išstumia deguonį iš vamzdelio kuriuo teka išeinančios dujos. Per 9 val. O₂ koncentracija nukrito iki 1,7% ir staigiai vėl pradėjo kilti. Buvo žinoma, kad naudojami vamzdeliai „Masterflex Silicone (platinum-cured)“ yra pralaidūs deguonies molekulėms, todėl 0% deguonies koncentracija viso proceso metu nebuvo pasiekta. Deguonies molekulės nuolat difundavo per vamzdelio sienelės į jo vidų, todėl sensoriuje fiksuojama mažiausia deguonies koncentracija 1,5%. Fermentacijos proceso metu, jau po 9 val. gliukozės koncentracija buvo sumažėjus, CO₂ dujų skyrimasis sulėtėjo, todėl padidėjo O₂ difuzija per vamzdelį ir apie 10 fermentacijos valandą sensoriuje matomas deguonies koncentracijos padidėjimas iki 9-10%. Vadovaujantis šio sensoriaus teikiamais duomenimis, buvo galima nustatyti ar terpėje netrūksta anglies šaltinio.

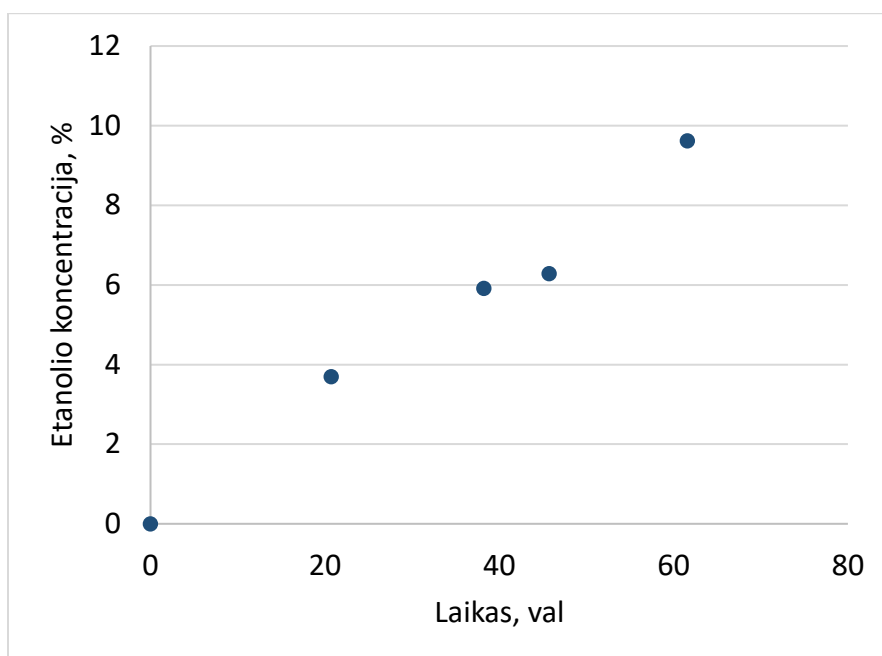
Vykdamas bioetanolio gavimo optimizavimo tyrimą bioreaktoriuje, buvo stebėti terpės šviesos sugerties pokyčiai (žr. 3.10 pav.).



3.10 pav. Šviesos sugerties priklausomybė nuo laiko

Analizuojant pateiktus duomenis (žr. 3.10 pav.), matyti, kad per pirmąsias 14 valandų šviesos sugertis padidėjo nuo 1 iki 14 optinių vienetų. Alkoholinės fermentacijos pradžioje stebėta logaritminio augimo fazė, kuri po 20 val perėjo į stacionarią fazę. Nuo 37 val matyti terpės optinio tankio sumažėjimas, jis atsirado dėl tuo metu pasiektos didelės 65 g/l gliukozės koncentracijos. Verta paminėti, kad šviesos sugerties sumažėjimas įvyko ne dėl ląstelių žūties, o dėl prasiskiedusios terpės, nes tuo metu nuo 26 iki 37 val buvo supumpuota apie 900 ml gliukozės tirpalo. Tuo metu, kai stebimas šviesos sugerties sumažėjimas mielių ląstelės toliau dalijosi, jų koncentracija augo, tiesiog ne taip sparčiai, kaip eksponentinio augimo fazėje. Papildomai buvo supumpuota Fermentacijos pabaigoje, kai gliukozės koncentracija sumažėjo iki 5,74 g/l šviesos sugertis pasiekė stacionarios fazės riba virš 16 optinių vienetų. Vykdam šį eksperimentą mielių *S. cerevisiae* žuvimo fazė nebuvo pasiekta.

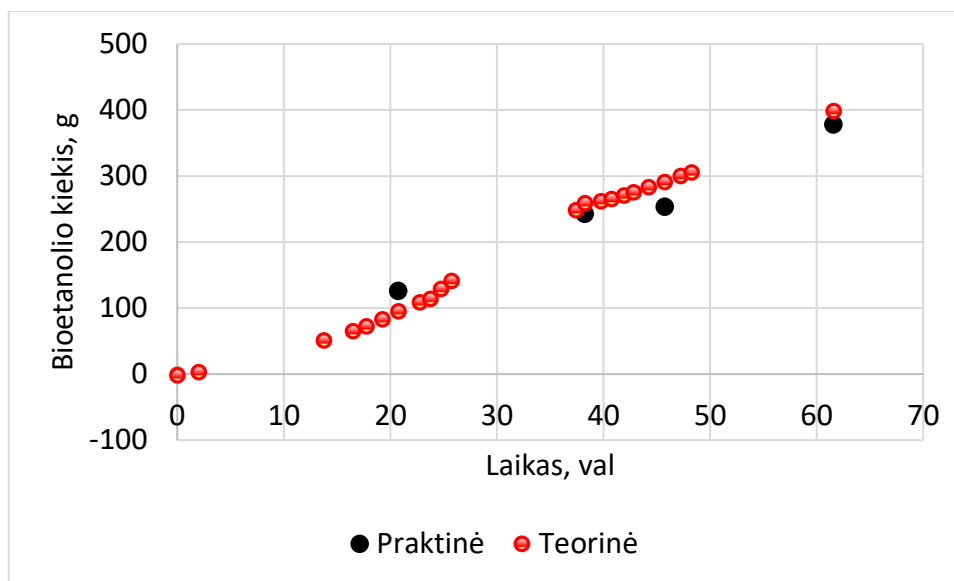
Pagrindinis darbo tikslas gauti kuo didesnę bioetanolio koncentraciją. Buvo imti 4 mėginiai etanolio koncentracijai nustatyti. Mėginiai distiliuoti, išmatuotas jų tankis areometru 20°C temperatūroje, kuris perskaičiuotas į procentinę etanolio koncentraciją. Laikytasi prielaidos, kad fermentacijos pradžioje etanolio koncentracija 0%. Tyrimo rezultatai pateikti (žr. 3.11 pav.).



3.11 pav. Etanolio koncentracijos kitimas laike

Iš pateiktų duomenų (žr. 3.11 pav.), matyti, kad jau po 21 val bioetanolio koncentracija pasiekė 3,7%. Eksperimentus vykdant kolboje tokia bioetanolio koncentracija pasiekama tik po 72 val alkoholinės fermentacijos. Bioetanolio koncentracija didėjo tiesiškai. Vienas matavimas po 46 val fermentacijos yra labiau nukrypęs nuo tiesės, nes ten mielių vystymasis buvo šiek tiek sulėtėjęs, dėl iki 65 g/l padidėjusios gliukozės koncentracijos. Nuo 35 val į terpę gliukozės nebepridedant pamažu jos koncentracija normalizavosi ir tyrimo pabaigoje pasiekta bioetanolio koncentracija gauta didesnė nei tikėtasi. Daugiausia produkto mielės *S. cerevisiae* pagamino augimo fazėje, nes ši fazė reikalauja didžiausių energijos kiekių. Alkoholinės fermentacijos pabaigoje (po 62 val) etanolio koncentracija pasiekė 9,62%. Tyrimo pradžioje tikslas buvo pasiekti 10 % etanolio koncentraciją, todėl po 62 val gavus 9,62% nuspręsta nutraukti fermentaciją nesulauktus 72 val.

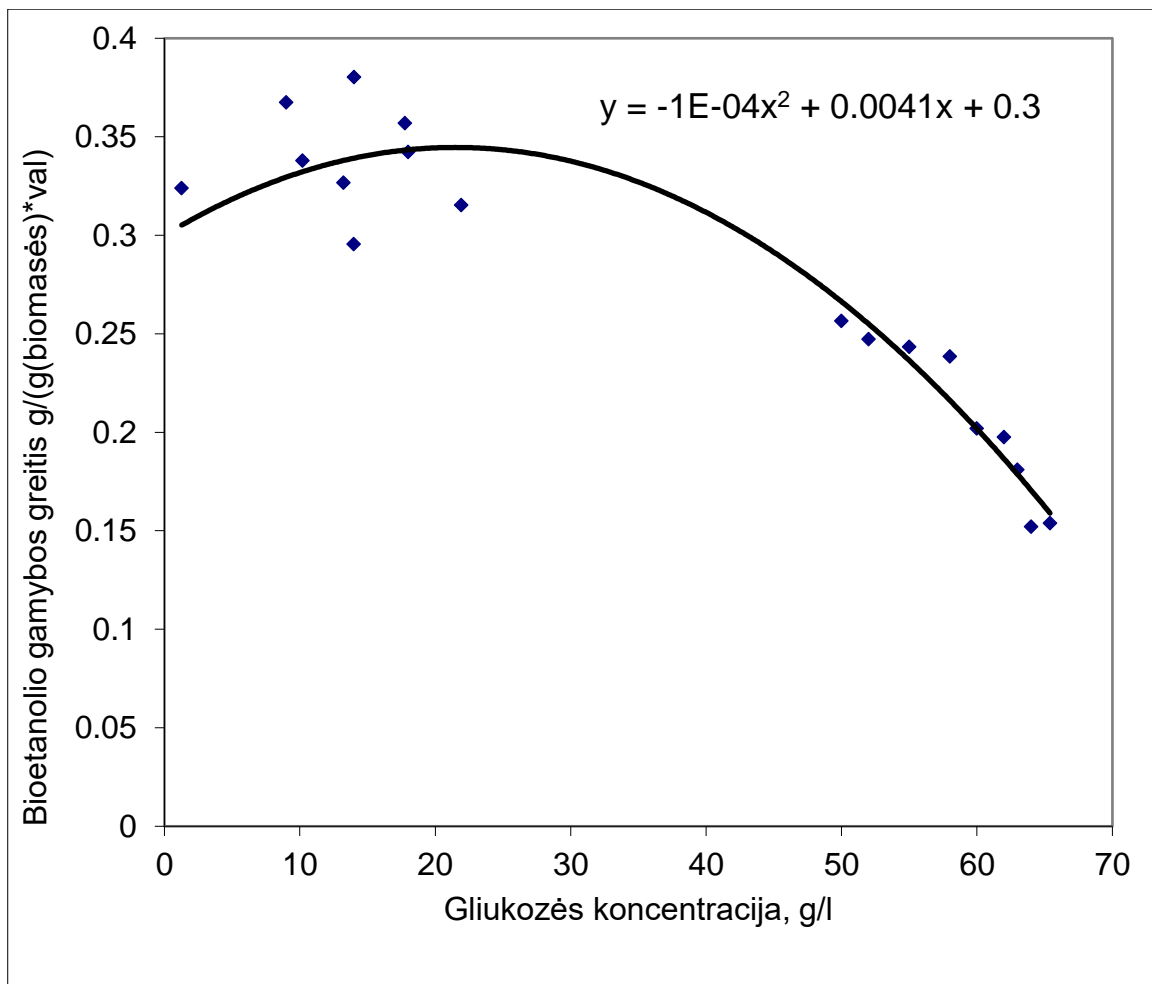
Analizuojant duomenis buvo palyginti teoriniai ir praktiniai etanolio išėigos rezultatai. Teoriniai duomenys gauti suskaičiavus, kiek maksimaliai etanolio galėjo susidaryti iš panaudotos grynos gliukozės, priimant išėigos koeficientą 0,51 apskaičiuotą pagal reakcijos alkoholinės fermentacijos cheminės reakcijos lygtį. Praktinė etanolio išėiga apskaičiuota gautus etanolio koncentracijos duomenis pritaikius bioreaktoriaus tūriui ir suvartotam gliukozės kiekiui. Palyginimo rezultatai pateikiami (žr. 3.12 pav.).



3.12 pav. Teorinės ir praktinės bioetanolio išėigos palyginimas

Palyginus duomenis (žr. 3.12 pav.), matyti, kad praktiniai ir teoriniai duomenys yra panašūs. Praktinė bioetanolio išėiga tik nežymiai mažesnė, nei teorinė. Duomenys patvirtina, kad mielės *S. cerevisiae* puikiai tinka alkoholinei fermentacijai vykdyti, jas naudojant galima gauti maksimalius bioetanolio išėigos kiekius. Fermentacija bioreaktoriuje vykdyta tik vieną kartą, todėl suprantama, kad duomenų rezultatai gali turėti nemažas paklaidas. Norint patvirtinti gautus rezultatus reikėtų fermentaciją kartoti bent 3 kartus, kad būtų galima apskaičiuoti standartines paklaidas.

Vienos fermentacijos bioreaktoriuje metu pasiekta didesnė bioetanolio išėiga, nei vykdant eksperimentus kolboje kelis mėnesius. Stengiantis apibendrinti rezultatus, pastebėta, kad vykdant alkoholinę fermentaciją kolboje, buvo naudojama per maža gliukozės koncentracija. Norint išsiaiškinti alkoholinei fermentacijai tinkamiausią gliukozės koncentraciją, buvo toliau analizuoti duomenys iš bioreaktoriaus. Šiam tikslui bioreaktoriuje gliukozės koncentracija buvo keičiama, vieną laiko tarpą buvo palaikoma žemesnė, kitą aukštesnė. Naudojantis sukauptais duomenimis apskaičiuotas produkto gamybos greitis, normalizuotas vienam gramui biomasės, kuris pateiktas priklausomybėje nuo gliukozės koncentracijos (žr. 3.13 pav.).



3.13 pav. Bioetanolio gavimo greičio, normalizuoto vienam gramui biomasės, priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos terpėje

Grafike (žr. 3.13 pav.) abscisių ašyje pateikiama gliukozės koncentracija g/l, o ordinačių ašyje matomas bioetanolio gamybos greitis. Iš pateiktų duomenų, matyti, kad bioetanolio santykinis arba normuotas vienam biomasės vienetui gamybos greitis g/(g(biomasės)*val) didžiausias, kai terpėje gliukozės koncentracija 10 – 30 g/l. Terpėje palaikant didesnę, nei 40 – 50 g/l gliukozės koncentraciją produkto gavimo greitis sparčiai mažėja.

Apibendrinant, galima teigti, kad tiriamiesiems eksperimentams naudojant modelinį bioreaktorių galima daug greičiau gauti patikimus duomenis apie vykstančius procesus. Svarbu ir tai, kad naudojant bioreaktorių galima nepertraukiamai stebėti ir valdyti vykstančius procesus, vienos fermentacijos metu galima ištirti ne vienas sąlygas, o keletą. Atlikus fermentaciją bioreaktoriuje buvo nustatytos tinkamiausios gliukozės koncentracijos terpėje ribos. Bioetanolio gamyba sutrumpinta 10 val lyginant su eksperimentais vykdytais kolboje ir per tą laiką pasiekta 3-4 kartus didesnė produkto

išeiga. Vykiant eksperimentus kolboje, tyrimai trunka ilgiau, gaunama mažiau duomenų, nes atliekami tik keli matavimai. Tyrimai kolboje turi ir savus pranašumus, reikalauja mažiau priežiūros, naudojami mažesni kiekiai reagentų, taip pat nesudėtinga palyginti duomenis, kai norima atrinkti tinkamiausią anglies šaltinį.

Vykiant tolesnius darbus verta ir toliau derinti šiuos abu tyrimo metodus. Tačiau svarbu gaunamus rezultatus stengtis susieti tarpusavyje, kad būtų kuo geriau išaiškinti gaunami rezultatai.

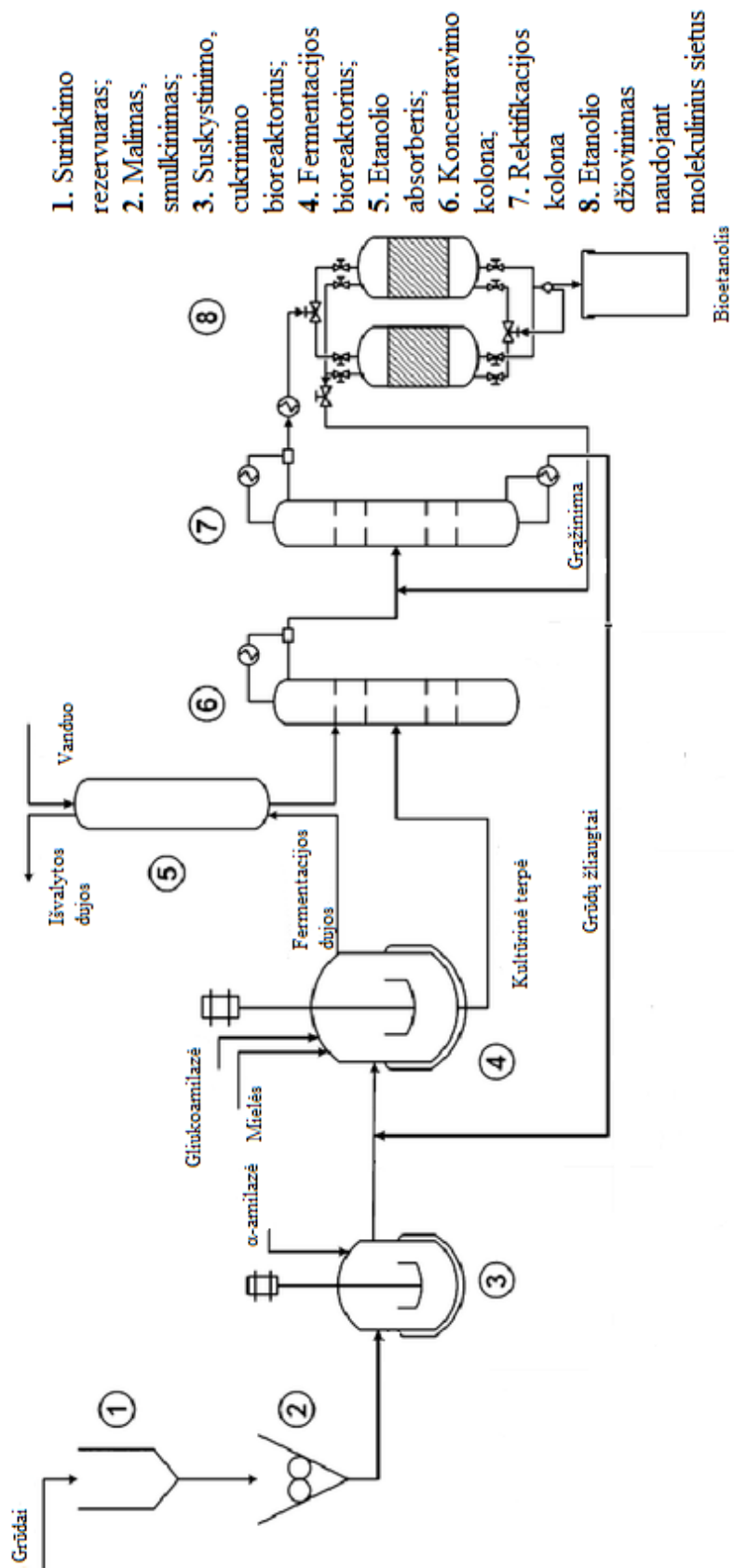
4. REKOMENDACIJŲ DALIS

Bioetanolio gamybos optimizavimas padėtų spręsti aplinkosaugines problemas, sumažintų iškastinio kuro naudojimą. Optimizuojant gamybą svarbiausia parinkti tinkamą žaliavą, ji turi būti pigi, lengvai transportuojama, taip pat svarbu, kad iš jos būtų gaunama kuo didesnė produkto išeiga. Etaloninė žaliava bioetanoliiui gauti: žemės ūkio, miško ar popieriaus, bei komunalinės atliekos. Parinkus žaliavas, svarbu pritaikyti gamybos sąlygas, kad būtų padidinta produkto išeiga. Šiam tikslui pasiekti, rekomenduojama laboratorinius tyrimus kolboje pratęsti naudojant modelinius bioreaktorius.

Bioetanolio gamyboje svarbu ne tik žaliavos, reikalingi tinkami mikroorganizmai, jie turi greitai ir efektyviai gaminti produktą. Svarbu, kad naudojami mikroorganizmai būtų kuo atsparesni didesnėms bioetanolio koncentracijoms terpėje, tai galima pasiekti naudojant genų inžinerijos metodus, kuriant ir tobulinant naujus mikroorganizmų kamienus.

Brangiausias ekonominiu požiūriu yra bioetanolio gryninimo etapas. Norint gauti kokybišką bioetanolį reikia pasiekti didelį jo grynumą, šiam tikslui rekomenduojama derinti kelis gryninimo etapus, tokius, kaip koncentravimą, rektifikacija ir etanolio džiovinimas naudojant molekulinį sietų sistemą.

Pateiktoje (žr. 4.1 pav.) bioetanolio gavimo aparatūrinėje schemoje nurodyti pagrindiniai įrenginiai, kuriuos rekomenduojama naudoti pramonėje, gaminant bioetanolį. Visų pirma (žr. 4.1. (1) pav.) reikalingos talpos, kuriose turi būti sandėliuojamos žaliavos, šiuo atveju – grūdai. Žaliavas rekomenduojama susmulkinti, sumalant (žr. 4.1. (2) pav.). Grūdai – krakmolinga žaliava, todėl suskystinimo bioreaktoriuje (žr. 4.1.(3) pav.) jie veikiami α -amilazės fermentu, kuris suskaido krakmolą į mažesnius sacharidus. Sucukrinus žaliavą pereinama prie mielių *S. cerevisiae* fermentacijos bioreaktoriuje (žr. 4.1.(4) pav.), šiame etape dar pridedama kito fermento gliukoamilazės, kuris suskaido likusius didesnius sacharidų fragmentus iki mono- ar disacharidų. Siekiant gauti kuo mažesnius produkto nuostolius dujos išeinančios iš bioreaktoriaus valomos etanolio absorberyje (žr. 4.1.(5) pav.) ir taip produktas grąžinamas į tolesnį gamybos ciklą. Kultūrinė terpė iš bioreaktoriaus toliau keliauja į koncentravimo koloną (žr. 4.1.(6) pav.), čia atiteka ir vandens – etanolio mišinys iš absorberio. Koncentravimo ir rektifikavimo (žr. 4.1.(7) pav.), kolonose vykdomas mišinio paskirstymas paremtas nevienoda komponentų virimo temperatūra. Iš rektifikavimo kolonos dalis grūdų žliaugų grąžinama į proceso pradžią, taip papildant terpę maisto medžiagomis. Galiausiai gautas distiliatas keliauja į molekuliniais sietais paremtą etanolio džiovinimo sistemą (žr. 4.1.(8) pav.). Produktas gautas rekomenduojamos gamybos metu turėtų būti ne mažesnio nei 95% grynumo.



4.1 pav. Bioetanolio gamybos aparatūrinė schema.

IŠVADOS

1. Bioetanolis gautas iš skirtingų monosacharidų ir disacharidų. Didžiausia etanolio koncentracija gauta naudojant gliukozę 2,82%.
2. Gaminant bioetanolį iš „Famulus“ tipo kviečių gauta didesnė produkto koncentracija 4,68%, nei naudojant „Etana“ tipo kviečius 4,11%.
3. Įvykdžius alkoholinę fermentaciją 5 l talpos bioreaktoriuje per 62 val pasiekta bioetanolio koncentracija 9,62%.
4. Nustatyta bioetanolio išėigos greičio, normalizuoto vienam gramui biomasės, priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos terpėje. Bioetanolis greičiausiai kaupiasi, kai terpėje gliukozės koncentracija 10-30 g/l.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. HAHN-HAGERDAL, B., M. GALBE, M.F. GORWA-GRAUSLUND, G. LIDEN ir G. ZACCHI. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* [interaktyvus]. 2006, **24**(12), 549-556 [žiūrėta 2017-04-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>
2. PUKALSKAS A. Naujausių mokslinių pasiekimų maisto produktų biotechnologijos srityje mokslinė studija “Maisto gamybos biotechnologija” [interaktyvus]. Kauno technologijos universitetas, 2007 [žiūrėta 2017 – 02 -05]. Prieiga per: http://molbio.vdu.lt/medziaga/Pukalskas/Maisto_biotechnologija_naujas.pdf
3. LUKOŠIENĖ I.P. ir E. KUTORGA. *Mikrobiologijos laboratoriniai darbai*. Vilnius, 2014. ISBN 978-609-459-339-0
4. ZAMORA F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. *Wine Chemistry and Biochemistry* [interaktyvus]. Springer, New York, 2009, 3-22 [žiūrėta 2018-01-10]. Prieiga per: https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_1
5. KOSHLAND JR. D. E. ir F. H. WESTHEIMER Mechanism of Alcoholic Fermentation. The Fermentation of Glucose-1-C¹⁴ [interaktyvus]. *J. Am. Chem. Soc.* 1950, **72**, 3383-3388 [žiūrėta 2018-02-10]. Prieiga per: DOI: 10.1021/ja01164a018
6. CHELLAPANDI P. *Laboratory Manual in Industrial Biotechnology*. Pointer Publishers, 2007. ISBN-13: 978-8171324880
7. SEUNGDO K. ir D. E. BRUCE. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues [interaktyvus]. *Biomass and Bioenergy* 2004, **26**(4) 361-375 [žiūrėta 2018-02-10]. Prieiga per: doi:10.1016/j.biombioe.2003.08.002
8. HOSSAIN, N., J. HAJI ZAINI, T. MAHILIA. A Review of Bioethanol Production from Plant-based Waste Biomass by Yeast Fermentation [interaktyvus]. *International Journal of Technology*, 2017, **8**(1) [žiūrėta 2018-03-15]. Prieiga per: DOI: <https://doi.org/10.14716/ijtech.v8i1.3948>
9. STATISTA *The Statistics Portal* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2018-05-05]. Prieiga per: <https://www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries/>

10. SANCHEZ, O. J. ir C. A. CARDONA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks [interaktyvus]. *Bioresource technology*, 2008,19, 5270-5295 [žiūrėta 2018-01-10]. Prieiga per: DOI: 10.1016/j.biortech.2007.11.013
11. HOSSAIN, N. ir R. JALIL. Sugar and Bioethanol Production from Oil Palm Trunk (OPT) [interaktyvus]. *Asia Pacific Journal of Energy and Environment*, 2015, 2(2),89-92 [žiūrėta 2018-05-05]. Prieiga per: DOI: <http://dx.doi.org/10.18034/apjee.v2i2.727>
12. XIANGYANG, L. ir K. CHANDRAKANT. Chapter 11 - Microbial Enzymes of Use in Industry [interaktyvus]. *Academic Press*, 2017, 267-298 [žiūrėta 2018-05-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
13. ExplorEnz – *The Enzyme Database* [interaktyvus] 2001 [žiūrėta 2018-05-15]. Prieiga per: <http://www.enzyme-database.org>
14. SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes [interaktyvus]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68, 425–435 [žiūrėta 2018-01-05]. Prieiga per: DOI: 10.1007/s00253-005-0003-0
15. RANI, K. Y. ir V. S. R. RAO. Control of fermenters—A review *Bioprocess Engineering* [interaktyvus]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1999, 21(1), 77-88 [žiūrėta 2017-05-05]. Prieiga per: DOI: 10.1007/PL00009066
16. YUZGEC U., M. TURKER ir A. HOCALAR. On-line evolutionary optimization of an industrial fed-batch yeast fermentation process [interaktyvus]. *ISA Trans*, 2009, 48(1), 79-92 [žiūrėta 2018-01-10]. Prieiga per: doi: 10.1016/j.isatra.2008.09.001
17. DIAZ-MONTANO, D. M. Continuous Agave Juice Fermentation for Producing Bioethanol [interaktyvus]. *Open access peer-reviewed chapter*, 2013, 8(4), 1-22 [žiūrėta 2018-01-10]. Prieiga per: <http://dx.doi.org/10.5772/55923>
18. NEELEMAN, R. *Biomass performance: Monitoring and control in bio-pharmaceutical production*. The Netherlands: University of Wageningen; 2002. ISBN 90-5808-733-6
19. KRISTENSEN, N.R Fed-batch process modeling for state estimation and optimal control. Copenhagen, 2002. ISBN 87-90142-83-7
20. ALFORD, J. S. Bioprocess control: advances and challenges [interaktyvus]. *Computers & Chemical Engineering*. 2006, 30(10), 1464–1475 [žiūrėta 2018-05-01]. Prieiga per: DOI: 10.1016/j.compchemeng.2006.05.039
21. GALVANAUSKAS, V., O. GRIGS, J. VANAGS, K. DUBENCOVS, V. STEPANOVA. Model-based optimization and pO₂ control of fed-batch *Escherichia coli* and

Saccharomyces cerevisiae cultivation processes [interaktyvus]. *Eng. Life Sci.* 2013, **13**(2), 172–184 [žiūrėta 2017-04-05]. Prieiga per: <https://doi.org/10.1002/elsc.201200012>