

11 39. 659

UNIVERSITATEA DUNAREA DE JOS DIN GALATI
FACULTATEA DE STIINTA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR



Teza de doctorat

Cercetări privind îmbunătățirea randamentului în alcool și a
calității alcoolului etilic rafinat obținut din melasă

Conducător științific: Prof. dr. ing. Traian Hopulele

Doctorand: ing. Elena Pătrașcu

Galați

2011

3.5
14

11 39. 059

ROMANIA
MINISTERUL EDUCATIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI SPORTULUI
UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS DIN GALAȚI

Strada Domnească nr. 47, cod poștal 800008
Galați, România
E-mail: rectorat@ugal.ro



Tel.: (+4) 0336-130.108; (0336-130.108; 336-130.108)
Fax: (+4) 0236-461.353
www.ugal.ro

02106/11.03.2014

C ă t r e

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați vă face cunoscut că în data de _____, ora _____, în _____, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: "Cercetări privind îmbunătățirea randamentului în alcool și a calității alcoolului etilic rafinat obținut din melasă", elaborată de domnul/doamna ing. BLEOCA ELENA(PĂTRASCU), în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

- Președinte:** Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE
Decan - Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați
- Conducător de doctorat:** Prof.univ.dr.ing. Traian HOPULELE
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați
- Referent 1:** Prof.univ.dr.ing. Yoleta NOUR
Universitatea din Craiova
- Referent 2:** Prof.univ.dr.ing. Ovidiu TITA
Universitatea "Lucian Blaga" din Sibiu
- Referent 3:** Conf.univ.dr.ing. Gabriela RĂPEANU
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

267827



Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică. În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa Universității, str. Domnească nr. 47, 800008 - Galați, Fax - 0236 / 461353.

RECTOR,
Prof.dr.ing. Viorel MÎNZU

SECRETAR DOCTORAT,
Ing. Luiza AXINTE

(Handwritten signature)

Mulțumiri

Studiul privind îmbunătățirea randamentului în alcool și a calității alcoolului etilic rafinat obținut din melasă a demarat sub conducerea de înaltă competență și probitate profesională a regretatului profesor dr. ing. Mircea Bulancea. Recunoștința mea se îndreaptă spre memoria distinsului profesor care ne-a părăsit atât de repede.

În ultima perioada, conducerea științifică a studiului inițiat în anul 2006 a fost preluată de către domnul profesor dr. ing. Traian Hopulele. Experiența și competența de mare valoare științifică și didactică a d-nului profesor dr. ing. Hopulele m-au ajutat să continui studiul și să-l finalizez. Adresez pe această cale, sincere mulțumiri pentru sprijinul primit și pentru coordonarea în elaborarea lucrării.

De asemenea, mulțumesc d-nei conf. dr. ing. Gabriela Rapeanu pentru recomandările pertinente și strădania manifestată în îndrumarea mea pe perioada efectuării studiului și ulterior a definitivării lucrării. Competența profesională a domniei sale fiindu-mi de mare ajutor.

Totodată adresez pe aceasta cale mulțumiri tuturor cadrelor didactice care își desfășoară activitatea la Catedra de Biotehnologii în Industria Alimentară de la Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor care m-au sprijinit în elaborarea prezentei lucrări.

Multe mulțumiri colectivului de cercetători de la Laboratorul de enologie din cadrul Institutului de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație de la Valea Calugărească care m-a ajutat să înțeleg ce înseamnă rigurozitatea științifică necesară în abordarea studiilor științifice.

Nu pot încheia, fără a adresa cele mai sincere mulțumiri colectivului de specialiști și conducerii societății în care îmi desfășor activitatea, locul unde am efectuat studiul, beneficiind de cea mai modernă și performantă instalație de obținere a alcoolului etilic alimentar existentă în Europa.

Tot pe această cale adresez mulțumiri familiei mele și tuturor celor care direct, sau indirect m-au sprijinit în efectuarea și finalizarea studiului.

Elena Pătrașcu

CUPRINS

I. Obiectivele științifice ale tezei de doctorat	5
II. Studiu documentar	6
1. Considerații privind obținerea alcoolului etilic din melasă	6
1.1. Generalități	6
1.2. Materii prime utilizate la fabricarea alcoolului etilic	8
1.3. Procesul tehnologic de obținere a etanolului din melasă	13
1.3.1. Recepția melasei	14
1.3.2. Depozitarea melasei	14
1.3.3. Pregătirea melasei în vederea fermentației	15
1.3.4. Pregătirea drojdiilor pentru fermentarea plămezelor	17
1.3.5. Fermentația alcoolică a plămezelor	19
1.3.5.1. Factorii care influențează cinetica de fermentație alcoolică	20
1.3.5.2. Procedee și instalații de fermentare	23
1.3.6. Distilarea și rafinarea	23
1.3.6.1. Distilarea plămezelor fermentate	23
1.3.6.2. Rafinarea alcoolului brut	25
1.3.7. Randamentul în alcool și calitatea alcoolului etilic rafinat	28
1.3.7.1. Randamentul în alcool etilic	28
1.3.6.2. Calitatea alcoolului etilic rafinat	30
2. Drojdiile de fermentare și caracterizarea lor	32
2.1. Caracterizarea morfofiziologică a drojdiilor de fermentare	32
2.2. Structura celulei de drojdie	35
2.3. Caracteristicile drojdiilor utilizate la obținerea etanolului	37
2.4. Necesitățile nutriționale ale drojdiilor	38
2.5. Metabolismul anaerob al drojdiilor	39
2.5.1. Metabolismul glucidelor	39
2.5.2. Metabolismul azotului din plămadă și formarea uleiului de fuzei	42
2.6. Cinetica de multiplicare a drojdiilor și de formare a etanolului	46
2.6.1. Cinetica multiplicării drojdiilor	46
2.6.2. Cinetica de formare a alcoolului etilic	49
III. Rezultate experimentale	50
3. Materiale și metode de analiză	50
3.1. Materiale	50
3.2. Metode de analiză	51
3.2.1. Metode de analiză a calității alcoolului etilic	51
3.2.2. Metode de analiză a melasei	56
3.2.3. Metode de analiză a plămezei	60
3.2.4. Condiții de cultivare a drojdiilor pentru evaluarea parametrilor cinetici de multiplicare în condiții de laborator	65
3.2.5. Parametrii cinetici de multiplicare a drojdiilor	65
3.2.6. Condițiile de cultivare a drojdiilor pentru optimizarea fermentării în condiții de laborator	66
3.2.7. Calculul parametrilor cinetici de fermentare	68
3.2.8. Prelucrarea statistică a datelor	69
3.3. Instalațiile utilizate	74
3.3.1. Instalații de pregătire a melasei	74
3.3.2. Instalații de fermentație	75
3.3.3. Instalații de distilare rafinare	77
4. Rezultate și discuții	107
4.1. Studiul influenței drojdiei asupra randamentului de obținere a alcoolului etilic	107
4.1.1. În cazul utilizării melasei din sfeclă de zahăr	107
4.1.2. În cazul utilizării melasei din restia de zahăr	109
4.2. Studiul influenței drojdiei utilizate la fermentare asupra compoziției plămezelor fermentate	112
4.3. Comportamentul drojdiilor în condiții aerobe de cultivare	119
4.4. Studiul factorilor care influențează cinetica de fermentație alcoolică	126
4.4.1. Efectul mărimii inoculului asupra cineticii de fermentație alcoolică	126

<i>Rezumatul tezei de doctorat</i>	
4.4.2. Efectul concentrației în glucide asupra cineticii de fermentație alcoolică	127
4.4.3. Efectul etanolului asupra cineticii de fermentație alcoolică	128
4.4.4. Efectul agitării mediului de cultura asupra cineticii de fermentație alcoolică	129
4.4.5. Efectul pH-ului asupra cineticii de fermentație alcoolică	130
4.4.6. Efectul temperaturii asupra cineticii de fermentație alcoolică	133
4.4.7. Efectul adaosului de nutrienți asupra cineticii de fermentație alcoolică	135
4.4.8. Efectul adaosului de subprodusi de fermentație asupra cineticii de fermentație alcoolică	137
4.4.9. Analiza statistică a datelor	139
4.5. Determinarea parametrilor cinetici de fermentare	146
4.6. Studiul și optimizarea fermentației alcoolice la nivel industrial la S.C. Euroavipo S.A., Ploiești, România	155
4.7. Influența utilităților asupra randamentului în alcool și calității acestuia	159
4.7.1. Studiul calității alcoolului etilic rafinat	159
4.7.2. Studiul calității alcoolului etilic obținut prin rerafinarea alcoolului tehnic	160
4.7.3. Performanțele instalațiilor de distilare rafinare analizate	161
4.7.4. Evaluarea consumului de energie termică	164
4.7.5. Productivitatea instalațiilor	165
4.7.6. Efecte economice	167
4.7.7. Ponderele cheltuielilor pe categorii de elemente din costul de producție	168
5. Concluzii finale	171
6. Contribuții și perspective de continuare a cercetărilor	175
7. Concretizarea cercetărilor efectuate	177
8. Bibliografie	179
9. Anexe	191

Structura tezei de doctorat

Teza de doctorat cuprinde 202 pagini, din care partea de documentare 49 pagini și partea experimentală 153 pagini, 87 de figuri și 31 de tabele. Bibliografia conține 188 titluri din care 104 după anul 2000. Rezumatul tezei de doctorat tratează sintetic: obiectivele științifice ale tezei, materiale și metode de analiză, rezultate experimentale, concluzii finale, contribuții și perspective de continuare a cercetărilor și bibliografia selectivă.

I. OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI

Industria obținerii alcoolului se bazează în principal pe activitatea fermentativă a drojdiilor, care transformă glucidele fermentescibile din substrat în alcool etilic ca produs principal de fermentație și respectiv în biomasă.

Calitatea alcoolului etilic alimentar este deosebit de importantă datorită faptului că acesta reprezintă materia primă de bază pentru realizarea majorității bauturilor spirtoase, bauturi unde alcoolul etilic este utilizat în proporții cuprinse între 15-40%.

Competitivitatea activității de producție a alcoolului, reprezintă un alt aspect care determină monitorizarea activității de producție până la cele mai mici amănunte.

De asemenea, trebuie avut în vedere faptul că obținerea unui alcool etilic alimentar conform cu standardul în vigoare, permite utilizarea acestuia atât în industria farmaceutică cât și în cea a reactivilor pentru analiză.

În cazul de față, utilizarea melasei la producerea etanolului alimentar cu ajutorul unor instalații performante, asigură obținerea bioetanolului la costuri economice deosebite, ceea ce favorizează extinderea domeniului de utilizare și pentru alte industrii (cosmetică, medicamente etc.).

Aceste câteva considerații prezentate evidențiază oportunitatea și importanța studiului legat de producerea bioetanolului la parametri calitativi superiori.

Studiul a fost întreprins în perioada 2006-2010, și a avut ca obiectiv principal îmbunătățirea calității și reducerea costurilor de producție pentru obținerea alcoolului etilic alimentar.

În contextul cercetărilor actuale, teza de doctorat își propune următoarele obiective științifice specifice:

1. Studiul influenței drojdiei asupra randamentului de obținere a alcoolului etilic din melasă;
2. Studiul influenței drojdiei utilizate la fermentare asupra compoziției plămezilor fermentate;
3. Evaluare comportamentul drojdiilor în condiții aerobe de cultivare;
4. Studiul factorilor care influențează cinetica de fermentație alcoolică în condiții de laborator;
5. Studiul factorilor care influențează cinetica de fermentație alcoolică la nivel industrial la S.C. Euroavipo S.A., Ploiești, România;
6. Determinarea parametrilor cinetici de fermentare;
7. Studiul influenței utilităților asupra randamentului în alcool și a calității acestuia.

III. Rezultate experimentale

CAPITOLUL 3. MATERIALE ȘI METODE DE ANALIZĂ

3.1. Materiale. Melasa folosită în determinări provine de la fabricile de zahăr după proveniență fiind atât melasă din sfeclă de zahăr cât și melasă din trestie de zahăr. Pe parcursul experimentelor s-a folosit melasă din aceeași sursă. Caracteristicile melasei utilizate sunt reprezentate în tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Compoziția fizico-chimică a melaselor utilizate ca materie primă

Melasa sfecla de zahar	21,6	78,4	51,2	2,2	6,5	7,8
Melasa trestie de zahar	18,2	81,8	54,6	0,5	6,2	7,6

Drojdiile utilizate în experimente sunt drojzii uscate active de *Saccharomyces cerevisiae*, sub denumiri prezentate în tabelul 3.2, comercializate de diferite firme.

Tabelul 3.2. Caracteristicile drojdiilor utilizate pentru fermentare

1	Safdistil C-70	substanță uscată: 94-96,5%; celulele vii: $14 \cdot 10^9/g$; microorganisme patogene: lipsă/g; NTG < $10^4/g$; bacterii acetice < $10^3/g$; bacterii lactice < $10^3/g$.

Rezumatul tezei de doctorat

2	Ethanol Red™	substanță uscată: 94-96,5%; celulele vii: $20 \cdot 10^9/g$; microorganisme patogene: lipsă/g; NTG < $10^4/g$; bacterii acetice < $10^3/g$; bacterii lactice < $10^3/g$.
3	Trockenhefe	substanță uscată: 95-96%; celulele vii: $1 \cdot 10^9/g$; microorganisme patogene: lipsă/g; bacterii lactice < $10^3/g$.
4	Fali ^R	substanță uscată: 94%; celulele vii: $2 \cdot 10^{10}/g$; microorganisme patogene: lipsă/g; drojii sălbătice < $10^3/g$; bacterii lactice < $10^4/g$.
5	Pakmaya	substanță uscată: 95-96%; celulele vii: $1 \cdot 10^6/g$; microorganisme patogene: lipsă/g; bacterii lactice < $10^3/g$.

Dintre cele cinci tulpini de drojii primele patru sunt drojii pentru obținerea bioetanolului iar ultima este drojdie utilizată în panificație. Înainte de utilizare drojdiile uscate active au fost păstrate la o temperatură de 4°C.

3.2. Metode de analiză

3.2.1. Metode de analiză a calității alcoolului etilic

3.2.1.1. Examenul organoleptic (SR 184-1:2001)

Examinarea caracteristicilor unei probe se face într-o ordine stabilită care se referă la: aspectul conținutului (transparență, limpiditate), culoarea, mirosul și gustul. Pentru examinarea aspectului proba se toarnă într-un cilindru gradat din sticlă în coloră de 100 cm³ și se observă, în lumina difuză, dacă este transparentă, dacă prezintă impurități, precipitate, etc.

Aprecierea aspectului în cazul alcoolului etilic și a băuturilor alcoolice incolore se face în comparație cu apa distilată, introdusă într-un cilindru identic cu cel în care se afla proba de analizat, apreciindu-se transparența și limpiditatea. Pentru culoare, cilindrul cu probă se privește de sus, pe axa longitudinală a probei, pe un fond alb sau negru, și se apreciază dacă prezintă culoarea caracteristică sortimentului analizat. Pentru aprecierea mirosului, se toarnă proba de analizat într-un pahar de degustare, se expiră aerul din plămâni și se miroase proba. După un repaus de 2-3 minute proba se mai miroase încă o dată. În cazul probelor cu concentrație alcoolică ridicată proba se aduce la concentrația alcoolică de 25-30% vol cu apă distilată înainte de analiza senzorială. Se precizează dacă proba prezintă miros specific produsului. După ce s-a apreciat mirosul, se degustă o cantitate mică de probă și se apreciază dacă gustul este specific sortimentului sau prezintă gust străin.

Prelucrarea și exprimarea rezultatelor. În urma executării examenului organoleptic se apreciază dacă fiecare caracteristică corespunde prevederilor din documentul tehnic normativ de produs.

3.2.1.2. Determinarea concentrației alcoolice (SR 184-2:2010)

Se alege un cilindru gradat, cu o înălțime care să permită termooalcolmetrului să plutească liber în probă, iar între partea sa inferioară și fundul cilindrului să fie o distanță de minim 25 mm. Diametrul interior al cilindrului trebuie să fie cu cel puțin 10 mm mai mare decât diametrul exterior al termooalcolmetrului utilizat. Se toarnă în cilindru, așezat pe o suprafață orizontală, o cantitate de probă, astfel încât după introducerea termooalcolmetrului suprafața lichidului să se găsească la circa 5 cm de marginea superioară a cilindrului sau chiar până la deversare. Proba se toarnă astfel încât să se evite formarea bulelor de aer.

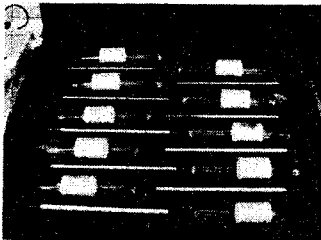


Figura 3.1. Termooalcolmetre Salleron

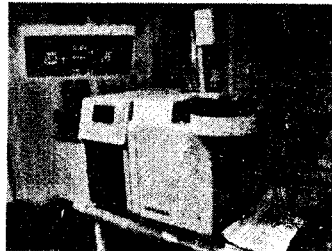


Figura 3.2. Cromagraf cu fază gazoasă TRACE

Rezumatul tezei de doctorat

Pentru introducerea, termocoolmetrul se ține de capătul superior al țigii și se introduce cu atenție în probă și se lasă să oscileze liber, fără să atingă pereții cilindrului și fără să se afunde mai mult decât este necesar. După 3-5 minute de la introducerea în probă se citește temperatura. După ce alcoolmetrul a luat temperatura probei și după dispariția completă a bulelor de aer din probă se citește concentrația alcoolică aparentă indicată de alcoolmetru și se corelează cu temperatura în tabelele de corecție determinându-se astfel concentrația alcoolică reală a probei. Este indicat să se facă cel puțin două citiri.

Prelucrarea și exprimarea rezultatelor. Cu cele două valori obținute prin citirea indicației termocoolmetrului se determină concentrația reală exprimată în procente de volum, folosind, în funcție de termocoolmetrul utilizat, tabele din norma tehnică de metrologie privind folosirea termocoolmetrelor și a tabelelor termocoolmetrice.

3.2.1.3. Determinarea acidității totale (SR 184-5:1997)

Se analizează 100 cm³ de produs, pregătit conform determinării concentrației alcoolice după care se introduce într-un pahar Erlenmayer de 250 cm³. Se adaugă o picătură din fiecare dintre soluțiile indicatoare A și B apoi se titrează cu hidroxid de sodiu 0,01N până la apariția culorii roz-portocaliu, care trebuie să persiste un minut (V). În cazul produselor intens colorate, produsul de analizat se diluează corespunzător ținând seama de aceasta la calcul.

Prelucrarea și exprimarea rezultatelor. Aciditatea totală, exprimată în miligrame de acid acetic la 100 mL alcool etilic 100% vol., este dată de formula:

$$\text{Aciditate totală, mg acid acetic/100 mL} = V \cdot \frac{60}{T}$$

în care: V - numărul de mL de soluție de NaOH de 0,01 M necesari pentru neutralizare; T - concentrația alcoolică volumetrică a probei.

3.2.1.4. Separarea și dozarea gaz cromatografică a compușilor volatili

Pentru dozarea compușilor volatili se utilizează următoarele componente:

- Cromatograf de analiză în fază gazoasă, TRACE GC echipat cu injector tip SPLIT (SPLITLESS) și detector de ionizare în flacără. De asemenea ansamblul este prevăzut cu un sistem computerizat de achiziție și prelucrare a datelor CHROM CARD;
- Coloană cromatografică capilară din fused silică cu lungimea L=30 m, cu o fază staționară lichidă tip polietilen glicol (CARBOWAX 20 M), cu diametrul intern de 0,25 mm și grosimea filmului de fază staționară de 0,5 micrometri (DB-WAX);
- Butelie de hidrogen, butelie de azot, butelie de aer, microsiringă de 10 microlitrii, balanță analitică cu precizia de 0,0001 g, baloane cotate și sticlărie volumetrică clasa A (Schott);
- Soluții etalon de puritate cromatografică: alcool etilic, metanol, furfural, acid acetic, aldehydă acetică, acetat de etil, alcool izomilic, alcool n-propilic, alcool izopropilic, alcool n-butilic, alcool izobutilic, alcool n-amilic, hexanol, aldehydă propionică, aldehydă butirică, formiat de etil, acetat de izobutil, acetat de izomil, lactat de etil, acid propionic, acid butiric, acid pentanoic, acid hexanoic, acetonă.

Pregătirea probelor. Prepararea soluției de analizat se realizează într-un balon cotate umplut la jumătate din capacitate cu proba de analizat se adaugă cu precizie de 0,0001 g, aproximativ 0,5 g, de acetonă și se aduce la semn. Dozarea acetonei se va realiza prin adăugare în picătură a acesteia evitându-se astfel prelingerea pe pereții interiori ai balonului și evaporarea, fapt ce ar duce la exprimări eronate a cantităților de compuși volatili existenți în probă. Raportul dintre concentrația produșilor necunoscuți și aria picului produșilor este direct proporțional cu raportul dintre concentrația acetonei și aria picului ei.

Din soluția astfel obținută și omogenizată se prelevează un (1) mL cu ajutorul unei pipete clasa A și prin metoda diferenței se introduce într-un balon cotate clasa A de 100 mL în care se află o cantitate de cel puțin 50 mL din același solvent (proba respectivă) - pentru a evita evaporarea acetonei - apoi se aduce la semn cu probă.

Aceasta va reprezenta soluția pregătită de a fi supusa analizei cromatografice

** Acetona este folosită în acest caz drept standard intern și se introduce de fiecare dată în proba de analizat deoarece îndeplinește condițiile: nu se regăsește ca și compus secundar în produsul de analizat și are proprietăți fizico-chimice foarte apropiate de cele ale componentelor de determinat.

Pregătirea sticlăriei și a microsiringii. Se folosește numai sticlărie clasa A (Schott) care se curăță înainte de fiecare utilizare cu amestec sulfocromic, se clătește cu apă de la robinet și apoi cu apă distilată și bidistilată. Înainte de utilizare se clătește de două ori cu produsul ce urmează a fi analizat, iar după folosire se spală cu apă

Rezumatul tezei de doctorat

de la robinet și se clătește cu apă distilată. Microseringa se spală de 2-3 ori cu alcool etilic rafinat (fără impurități), apoi se clătește cu soluție de analizat.

Mod de lucru. Separarea gaz cromatografică a compuşilor volatili. Alimentarea cu gaze, pornirea și verificarea stării de funcționare a aparatului se realizează conform instrucțiunilor de utilizare.

Cu ajutorul microseringii se absoarbe un volum de probă de analizat fără adaos de standard intern (acetona) – proba blanc - de 1 microlitru evitându-se formarea bulelor de aer în volumul de lichid absorbit. Prin garnitura de etanșare (sept) ce separă orificiul pentru injecție de spațiul destinat evaporării probei (liner) se introduce acul seringii în întregime. După 10 sec., timp destinat echilibrării temperaturii acului și cea a probei de analizat cu atmosfera liner-ului se elimină prin apăsarea bruscă a pistonului seringii întregul volum de probă.

Se poate vizualiza apariția semnalelor corespunzătoare fiecărui compus existent în probă din meniul "View" alegând opțiunea "View chromatograms". Dacă se constată prezența acetonei în probă, valoarea ariei picului corespunzător va fi scăzută din valoarea ariei corespunzătoare acetonei din proba cu adaos de standard intern. În caz contrar, se procedează la analizarea probei pregătită în același mod.

Prelucrarea și exprimarea rezultatelor. Aria suprafeței picurilor fiecărui component este proporțională cu concentrația acestuia în probă și se raportează la aria suprafeței picului corespunzător acetonei din probă și din soluția de referință. Soft-ul va genera automat la sfârșitul secvenței un raport cu valorile concentrațiilor pentru fiecare component identificat în probă. În cazul în care se detectează prezența acetonei la verificarea cu proba blanc făcută inițial se calculează concentrația compuşilor volatili prezenți în probă:

$$C_x = \frac{\overline{A}_x(S.I.) \cdot \overline{A}_{\text{acetona(etalon)}} \cdot C_{x(\text{etalon})}}{\overline{A}_{x(\text{etalon})} \cdot D_{(\text{acetona})}}$$

unde: $\overline{A}_x(S.I.)$ – aria compusului x conform raportului corespunzător injecției probei în care s-a dozat standard intern; $\overline{A}_{\text{acetona(etalon)}}$ – aria medie a acetonei conform rapoartelor generate în urma etalonării; $C_{x(\text{etalon})}$ – concentrația compusului x dozat în soluția etalon; $C_{x(\text{etalon})}$ – aria medie a compusului x conform rapoartelor generate în urma etalonării; $D_{(\text{acetona})}$ – diferența dintre aria acetonei obținută în cazul probei cu standard intern dozat și aria acetonei obținută în cazul probei blanc.

Conținutul total de compuși volatili se obține prin însumarea valorilor calculate pentru fiecare component în parte. Rezultatele se exprimă în mg/100 mL probă.

Pentru a exprima rezultatul în mg/100 mL alcool etilic anhidru se înmulțește valoarea cu 100/c unde c reprezintă concentrația probei determinată.

3.2.1.5. Determinarea impurităților (SR 184-12:2009)

Se introduc 50 cm³ alcool etilic de analizat într-un balon cotat (clătit în prealabil cu produsul de analizat). Balonul se introduce într-o baie de apă cu temperatura de 15°C astfel încât apa din baie să fie la nivelul alcoolului din balon. După 10 minute se adaugă în balon 1 cm³ soluție de permanganat de potasiu și se notează timpul. Se agită și imediat se cufundă din nou în baia de apă.

Culoarea soluției de analizat se compară cu aceea a soluției etalon. În acest scop, într-un balon similar se introduc 51 cm³ soluție etalon. Balonul se cufundă în aceeași baie de apă o dată cu balonul care conține produsul de analizat.

Ambale baloane cotate se țin în baia de apă până când culoarea la început roșie a soluției de analizat, se schimbă treptat, ajungând identică cu culoarea galben-roz a soluției etalon, în acest moment determinarea considerându-se finalizată.

Prelucrarea și exprimarea rezultatelor. Se notează timpul (în minute) în care culoarea produsului devine identică cu aceea a soluției etalon. Compararea culorii se face privind baloanele prin transparență pe un fond alb.

3.2.2. Metode de analiză a melasei

3.2.2.1. Aspectul exterior. Melasa se prezintă ca un lichid vâscos, de culoare brun-închisă, cu miros de cafea și un gust dulce amarui.

3.2.2.2. Determinarea densității. Pentru determinarea densității, aceasta se stabilește în funcție de concentrația în substanță uscată a melasei determinată cu zaharometru.

3.2.2.3.

3.2.2.4. *Determinarea substanței uscate.*

a. Cu zaharometru. Zaharometru este un areometru etalonat la 20°C, și prevăzut în interior cu o scară pentru temperatură și una pentru concentrație. Proba de analizat se introduce într-un cilindru de 500 mL. Se introduce zaharometru în lichid și se lasă două minute pentru stabilizarea temperaturii și atingerea stării de echilibru, apoi se citește valoarea concentrației și se aplică coeficientul de corecție:

Concentrația reală = concentrația citită + (Citita - 20) · 0,005

b. Cu refractometru electronic, unde se poate citi direct concentrația în substanță uscată la 20°C. Se calibrează aparatul cu apă distilată, la punctul 0.

Se șterge apa cu hârtie de filtru, după care se pune o picătură din proba de analizat. Se citește valoarea concentrației pe afișajul electronic.

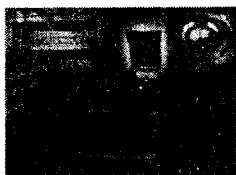


Figura 3.3. Refractometru electronic Mettler Toledo

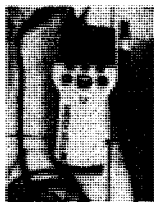


Figura 3.4. pH metru Mettler Toledo

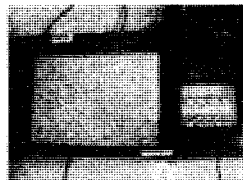


Figura 3.5. Polarimetru ADP 220 Bellingham Stanley Ltd

3.2.2.5. *Determinarea pH-ului*

Pentru determinarea pH-ului se folosește pH-metru electronic. Proba de analizat se introduce într-un pahar Berzelius, în care se introduce electrodul pH-metrului. Se lasă 5-10 sec, după care se face citirea.

3.2.2.6. *Determinarea zaharozei (metoda polarimetrică).*

Metoda polarimetrică de dozare a conținutului în zahăr a melasei este una din metodele fizice rapide, și se bazează pe proprietatea zaharurilor de a fi optic active. Metoda se folosește în situația în care conținutul în zahăr invertit este mic.

Principiul metodei: Substanțele optic active rotesc planul luminii polarizate care trece prin soluția probei de analizat, proporțional cu concentrația în zaharoza a acesteia.

Echipamente de măsurare și/sau analiza materiale, reactivi. Acetat bazic de plumb, eter etilic, balanța analitică cu precizia de 0,0001g, baloane cotate de 100 și 200 mL, polarimetru.

Mod de lucru. Se cântăresc 26 g melasă și se trec cantitativ într-un balon de 100 mL cu apă. Se omogenizează bine soluția prin miscări circulare ușoare și se aduce aproape de semn. Se aduce la temperatura de 20 °C, apoi se distruge spuma eventual formată, cu o picătură de eter etilic.

Se aduce la semn cu apă distilată și se omogenizează puternic conținutul balonului. Din proba astfel pregătită se iau cu pipeta 50 mL și se trec într-un balon cotate de 100 mL, se adaugă 10-20 mL acetat bazic de plumb, se completează cu apă distilată până la semn și se omogenizează. Se filtrează conținutul balonului într-un pahar curat și uscat. Filtratul se toarnă în tubul polarimetric și se citește polarizația.

Conținutul de zaharoza se calculează cu formula: $Z = \alpha \cdot 2$

unde: Z, este conținutul în zaharoză, g/100 g melasă; α , reprezintă unghiul de polarizație citit la polarimetru.

3.2.2.6. *Determinarea zaharozei pe cale chimică*

Pentru aceasta se determină mai întâi cantitatea de zahăr invertit din melasă.

a. 26 g melasă se aduc cantitativ într-un balon cotate de 200 mL și se face defecarea cu acetat bazic de plumb. Se aduce la semn și se filtrează, după care 100 mL de filtrat se introduc într-un balon cotate de 150 mL, se îndepărtează plumbul cu o soluție de carbonat de sodiu (30 g carbonat cristalizat la 100 mL) și se aduce la semn (= 13 g melasă). Se filtrează și din filtrat se iau 25 mL (=2,1667g melasă) care se folosesc pentru determinarea zahărului invertit prin metoda obișnuită Bertrand. Cantitatea de zahăr invertit se raportează la 100 g melasă (Zi). În altă probă se determină zahărul invertit total în urma inversei zaharozei:

Rezumatul tezei de doctorat

b. 13 g melasă se aduc cantitativ într-un balon cotat de 100 mL cu 75 mL apă, se neutralizează cu HCl 0,1 N și se adaugă 5 mL HCl ($d = 1188$) pentru inversie. Se încălzește timp de 2 minute și jumătate pe o baie de apă la 67°C și apoi se ține exact 5 minute la temperatura de 67°C, după care se răcește la 20°C, se aduce la semn cu apă distilată și, dacă e necesar, se filtrează.

Se iau din filtrat 50 mL (= 6,5 g melasă), se neutralizează, se lămpesc cu acetat bazic de Pb, se aduc la 100 mL, se amestecă și se filtrează. Se iau 25 mL filtrat (= 1,625 g melasă), se introduc într-un balon cotat de 100 mL și se îndepărtează plumbul cu o soluție de carbonat de sodiu, se aduce la semn și se filtrează, iar din filtrat se iau 25 mL (= 0,40625 g melasă) pentru determinarea zahărului invertit prin metoda Bertrand. Cantitatea de zahăr invertit se raportează apoi la 100 g melasă (Z_2). Cantitatea de zaharoză se determină după formula: $Z = (Z_2 - Z_1) \cdot 0,95$, în care 0,95 este un factor pentru a transforma zahărul invertit în zaharoză.

Metoda Bertrand. Într-un balon Erlenmeyer de 300 mL se aduc 25 mL soluție Fehling I, 25 mL soluție Fehling II, se încălzește până la fierbere. Se ia paharul de pe foc, se adaugă 25 mL soluție de analizat și se fierbe 3 minute, apoi se filtrează soluția prin filtru cutat și se spală precipitatul de 2-3 ori cu 10-15 mL apă distilată fierbinte. Precipitatul din balonul Erlenmeyer se dizolvă cu 20 mL soluție ferică. Soluția verde se trece cantitativ pe filtru, după care se spală cu apă fiartă balonul Erlenmeyer și filtrul și se titrează imediat filtratul cu $KMnO_4$ 0,1 N până la culoare roz.

Calcul: la fiecare mL de $KMnO_4$ 0,1 N folosit la titrare corespund 6,357 mg cupru. $mgCu = 6,357 \cdot V_{KMnO_4}$

Din tabel se regăsește cantitatea de zahăr din probă în funcție de cantitatea de Cu obținută, care se raportează apoi la 100 g melasă.

3.2.3. Metode de analiză a plămezelor

3.2.3.1. Determinarea concentrației plămezii

Prin concentrația plămezii, mai exact spus prin extractul unei soluții se înțelege totalitatea substanțelor fermentescibile și nefementescibile dizolvate. În cazul plămezelor de melasă fermentate, substanțele dizolvate sunt sărurile minerale, substanțele proteice solubile, zahărul rezidual, alcoolul etc.

Concentrația plămezelor se determină cu ajutorul areometrelor (zaharometre), etalonate la temperatura de 20°C. În timpul fermentației alcoolice, gradul zaharometric aparent al plămezelor scade de la valoarea inițială de ~22-23 grade, la ~6-7 grade, la sfârșitul fermentației alcoolice. Gradul zaharometric final al plămezii fermentate poate să ajungă și la valori mai mici -3-4, în cazul unor melase cu puritate ridicată.

3.2.3.2. Determinarea acidității

Aciditatea plămezelor de melasă fermentate se determină prin titrarea unei cantități determinate de plămădă cu soluție de hidroxid de sodiu, în prezența fenoftaleinei ca indicator.

Aciditatea se măsoară în grade Delbruck, și reprezintă aciditatea din 20 mL soluție care se neutralizează cu 1 mL soluție de NaOH de concentrație 0,1N.

Un volum de 20 mL plămădă fermentată se introduce într-un balon Erlenmeyer, peste circa 30 mL apă distilată. Se adaugă 2-3 picături de fenoftaleină, apoi conținutul balonului se agită pentru omogenizare și se adaugă cu soluție de NaOH de concentrație 0,1N, până la apariția culorii roz care persistă 30 secunde. Numărul de miliilitri de soluție NaOH de concentrație 0,1N folosiți reprezintă tot atâtea zecimi de grad Dib.

3.2.3.3. Dozarea zahărului total reducător

Pentru dozarea zahărului total reducător se folosește metoda cu acidul 3,5 dinitrosalicilic (Müller, 1959).

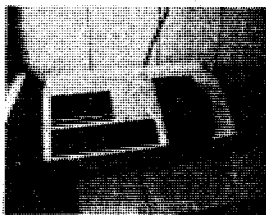


Figura 3.6. Spectrofotometru UV-VIS Jenway



Figura 3.7. Instalație de distilare Trade Raypa

Rezumatul tezei de doctorat

Un volum de 5 mL din proba de analizat extrasă din proba în fermentație a fost hidrolizată timp de 7 min la o temperatură de 60 °C în mediu acid în prezența HCl de concentrație 2N. După hidroliză, proba a fost neutralizată cu soluție NaOH de concentrație 1N după care zahărul reducător a fost măsurat prin reacția cu acidul 3,5 dinitrosalicic cu care formează un complex de culoare galben portocaliu a cărui extincție se citește la lungimea de undă de $\lambda = 540$ nm la spectrofotometru. În paralel s-a realizat o curbă etalon în care s-a reprezentat cantitatea de glucoză (mg/mL) în funcție de extincția citită la lungimea de undă de $\lambda = 540$ nm.

Pentru fiecare experiment în parte s-au realizat 3 trei determinări independente iar valorile raportate sunt valori medii.

3.2.3.4. Determinarea conținutului în alcool al plămezelor de melasa fermentată

Concentrația alcoolică se poate determina cu alcoolmetru numai în cazul soluțiilor pure de alcool și apă. Prezența în unele soluții alcoolice a unor substanțe străine ca zahărul, acizii organici, săruri minerale, celule de drojdie etc. modifică masa specifică a soluției și, în consecință, gradul alcoolic determinat cu alcoolmetru este fals. Ca să se poată afla gradul alcoolic real al plămezelor de melasa fermentată trebuie să se izoleze mai întâi alcoolul din acestea. Separarea alcoolului de substanțele străine se realizează prin distilare. După comportarea lor la distilare, substanțele străine se împart în substanțe fixe, care nu distilă odată cu alcoolul, și substanțe volatile, care distilă odată cu acesta. Substanțele fixe sunt ușor de separat, deoarece ele rămân în vasul de distilare. Cele volatile însă, cum sunt acizii volatili, acetaldehida și alcoolii superiori, trec odată cu alcoolul și apa.

Din aceasta cauză, pentru a se izola alcoolul etilic pur, în laborator se fac două distilări. Prima distilare se face în mediu slab acid. În această distilare se separă alcoolul etilic, o parte din apă, acizii volatili, precum și unele substanțe neutre care sunt acetaldehida și alcoolii superiori. Distilatul obținut se supune unei a doua distilări, după ce mai întâi este alcalinizat cu câteva picături de hidroxid de sodiu concentrat, pentru neutralizarea acizilor volatili. Prin această operație nu se fixează și acetaldehida și alcoolii superiori. Cantitatea acestora fiind foarte mică, nu influențează greutatea specifică a distilatului.

Echipamente de măsurare, materiale, reactivi: instalație de distilare Trade Raypa, termoalcoolmetru gradat în procente de volum la 20°C, cu valoarea diviziunii minime de 0,2%, cilindru gradat de 250 mL, 500 mL, 1000 mL, baion cotelat de 250 mL.

Mod de lucru. Într-un balon cotelat de 250 mL se introduce proba de analizat, se aduce la temperatura de 20 °C, după care se trece conținutul balonului cotelat cantitativ în balonul de distilare de 500 mL.

Se începe distilarea, captând distilatul în același balon cotelat cu care s-a măsurat proba și în care s-au introdus în prealabil 5 mL apă distilată. Se captează cca. 150 mL de distilat, se pun câteva picături de hidroxid de sodiu, după care balonul se aduce la semn cu apă distilată. Se repetă operația de distilare. Se captează 150 mL distilat, iar conținutul balonului se aduce la semn cu apă distilată.

Conținutul balonului este trecut într-un cilindru gradat, se introduce alcoolmetru, se lasă câteva secunde, după care se citește concentrația alcoolică aparentă iar din tabele se citește concentrația alcoolică reală.

3.2.3.4. Controlul microbiologic

Controlul microbiologic se face în diferite etape, începând de la materia primă și terminând cu procesul de fermentație, și este necesar atât pentru monitorizarea procesului de fermentație cât și pentru depistarea eventualelor contaminări cu bacterii.

În mod normal dacă sunt aplicate toate măsurile de combatere a contaminărilor, plămezele de melasă în fermentație nu trebuie să conțină mai mult de 5% microorganisme de contaminare. Cu ajutorul microscopului se fac următoarele determinări: determinarea numărului de celule de drojdie, aprecierea stării fiziologice a acestora, identificarea microorganismelor de contaminare.

Pe baza acestor determinări tehnologii poate verifica, interveni și dirija diferitele faze ale procesului tehnologic, cum sunt: stabilirea momentului optim de inoculare a linului de prefermentare cu plămada din vasul de drojdie; stabilirea momentului optim de înjumătățire a linului de prefermentare; stabilirea cauzelor microbiologice ale întârzierii fermentației; evitarea anomaliilor din procesul de fermentație ca urmare a dezvoltării microorganismelor patogene și a modificării activității drojdiilor.

Viabilitatea celulelor. Testul de viabilitate a fost realizat prin numărarea directă a celulelor de drojdie viabile la microscop în prezența indicatorului albastru de metilen cu ajutorul camerei Thoma. Metoda se bazează pe capacitatea drojdiilor viabile de a reduce indicatorul redox din forma de oxidată (albastru) în forma redusă (leuco-derivat incolor).

Celulele de drojdie se pot număra prin examen microscopic direct, cu ajutorul citometrelor. Un citometru este o lamă de sticlă groasă, prevăzută cu trei platforme separate între ele prin rigole în sticlă.

Platforma centrală este denivelată față de celelalte două cu o înălțime de 0,1-0,2 mm (înscrisă pe fiecare cameră).

Rezumatul tezei de doctorat

Pe platforma centrală este gravată o rețea de linii perpendiculare, care delimitază o anumită suprafață divizată de către linii perpendiculare în microcelele de formă pătratică (pătrățele elementare).

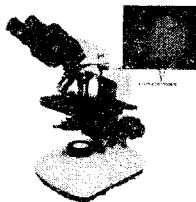


Figura 3.8. Microscop Kruss

Diferențierea dintre tipurile de citometre constă în mărimea suprafeței unui pătrățel elementar.

În cazul citometrului Thoma, suprafața de 1 mm^2 este divizată în 400 de pătrățele elementare cu latura de $1/20 \text{ mm}$. Numărul de celule prezente într-un cm de suspensie de analizat se determină cu formula: $N = n \cdot 4 \cdot 10^3 \cdot d$ în care: n este numărul mediu de celule pe un pătrățel elementar; d - coeficient de diluție.

3.2.4. Condiții de cultivare a drojdiilor pentru evaluarea parametrilor cinetici de multiplicare în condiții de laborator

Inițial, drojdiile au fost reactivitate pe melasa diluată în prealabil la o concentrație în zaharuri de aproximativ 150 g/L și acidificată cu H_2SO_4 la un $\text{pH} = 4,5$, în culturi pe agitator la 200 rpm , la o temperatură de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, timp de 24 de ore. Volumele transferate în medile de fermentare au fost calculate în așa fel încât concentrația inițială de biomasă să fie de 1×10^7 celule viabile/mL.

Pentru evaluarea parametrilor cinetici de multiplicare în baloane Erlenmayer de 500 mL se aduce un volum de 250 mL melasă diluată cu apă distilată la un conținut în glucide de aproximativ 150 g/L , acidificată cu H_2SO_4 la un pH de aproximativ $4,5$ și îmbogățită cu sulfat de amoniu în proporție de $0,5\%$ și inoculul având o concentrație de 1×10^7 celule viabile/mL. Baloanele au fost menținute pe agitator la 200 rpm o temperatură de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ timp de 48 de ore. Numărul de celule viabile și viteza de multiplicare au fost evaluate după anumite intervale de timp și anume după 12, 24, 36 și 48 h.

3.2.5. Determinarea parametrilor cinetici de multiplicare a drojdiilor

În funcție de particularitățile multiplicării și reproducerii celulelor microbiene se poate stabili dinamica de creștere. Aceasta se stabilește prin cuantificarea numărului de celule de drojdie sau prin studiul vitezei de acumulare a biomasei în raport cu unitatea de volum a mediului de cultură utilizat.

În tabelul 3.3, sunt prezentați parametrii cinetici de evaluare a multiplicării drojdiilor în faza exponențială de creștere.

Tabelul 3.3. Parametrii cinetici de evaluare a multiplicării drojdiilor

Numărul de generații, număr de celule pe unitate de volum	n	UFC/mL	$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$
Viteza de multiplicare, viteza specifică de creștere	μ	h^{-1}	$\mu_m = \frac{\ln N - \ln N_0}{t - t_0}$
Timpul în care se realizează dublarea populației, timpul de dublare	t_d	h	$t_d = \frac{0,693}{\mu}$

3.2.6. Condițiile de cultivare a drojdiilor pentru optimizarea condițiilor de fermentare în condiții de laborator

→ Efectul cantității de inocul asupra cineticii de fermentație alcoolică

Pentru evaluarea influenței parametrilor cu efecte directe asupra fermentației alcoolice și în special asupra formării alcoolului etilic, pentru experiment s-a utilizat un volum de 250 mL melasă diluată cu apă distilată la un conținut în glucide de aproximativ 200 g/L .

Rezumatul tezei de doctorat

Această melasă a fost acidifiată cu H_2SO_4 la un pH de aproximativ 4,5 și îmbogățită cu sulfat de amoniu în proporție de 0,5%. Pentru a studia efectului cantității de inocul asupra cineticii de fermentație alcoolică, s-au utilizat diferite concentrații de celule viabile din inoculul adăugat, și anume trei concentrații diferite de 1×10^6 UFC/mL, 1×10^7 UFC/mL și 1×10^8 UFC/mL. Experimentul s-a realizat pe o durată de 60 de ore la o temperatură de 30°C, fără agitarea mediului de cultură.

→ Efectul concentrației în glucide asupra cineticii de fermentație alcoolică

Pentru a studia efectul concentrației în glucide asupra cineticii de fermentație alcoolică s-a evaluat cantitatea de etanol obținută prin fermentarea melasei diluate la concentrații diferite de zahăr 50 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L și 250 g/L. Această melasă diluată în prealabil la diferite concentrații de glucide este acidifiată cu H_2SO_4 la un pH de aproximativ 4,5 și îmbogățită cu sulfat de amoniu în proporție de 0,5%.

Concentrația de celule viabile din inocul a fost de 1×10^8 UFC/mL. Studiul s-a realizat timp de 60 de ore la o temperatură de 30°C, fără agitarea mediului de cultură.

→ Efectul etanolului asupra cineticii de fermentație alcoolică

Cunoscându-se faptul că etanolul este un factor de stres pentru drojdi, o caracteristică dorită foarte importantă în cazul selecției tulpinilor industriale este aceea ca drojdia selectată să prezinte toleranță mare la etanol. Pentru acest experiment în mediul de fermentație s-a adăugat alcool etilic de concentrație 96% (v/v) astfel încât concentrația în alcool a mediului de fermentație să fie 0%, 3%, 6%, 9%, 12% și 16% (v/v).

În rest concentrația în glucide a mediului de fermentație a fost de 200 g/L, pH-ul = 4,5, numărul inițial de celule viabile 1×10^8 UFC/mL, temperatura 30°C, fără agitarea mediului de cultură.

→ Efectul pH-ului asupra cineticii de fermentație alcoolică

Se cunoaște faptul că viteza de fermentație este sensibilă în funcție de pH-ul mediului de fermentație, iar majoritatea drojdiilor de distilerie prezintă un pH optim între 4 și 6.

Acest domeniu este mai mic decât pentru bacteriile tipice. În plus, majoritatea drojdiilor pot tolera expunerea la soluții acide la pH = 2, fără distrugerea lor.

Pentru evaluarea efectului pH-ului asupra cineticii de fermentație, în condiții de laborator melasa a fost adusă la un pH diferit având valori de 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 și 6,5 cu ajutorul adaosului de acid sulfuric H_2SO_4 . Concentrația în glucide a mediului de fermentație a fost de 200 g/L, numărul inițial de celule viabile 1×10^8 UFC/mL, temperatura 30°C.

→ Efectul temperaturii asupra cineticii de fermentație alcoolică

Toleranța temperaturilor înalte este o caracteristică mult dorită pentru selecția drojdiilor de distilerie, majoritatea având o temperatură optimă de creștere de 30...35 °C.

În condiții de laborator s-a studiat cinetica de fermentare a etanolului la diferite temperaturi precum 20°C, 25°C, 30°C, 35°C și 40 °C. Concentrația în glucide a mediului de fermentație a fost de 200 g/L, pH-ul = 4,5, numărul inițial de celule viabile 1×10^8 UFC/mL, studiul realizându-se timp de 60 de ore, fără agitarea mediului de cultură.

→ Efectul agitării mediului de cultură asupra cineticii de fermentație alcoolică

Pentru a studia efectul agitării mediului fermentescibil asupra cineticii de fermentație alcoolică s-a evaluat cantitatea de etanol obținută prin fermentarea melasei diluate la diferite valori ale vitezei de rotație de 0 rpm, 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm și 200 rpm. Această melasă diluată în prealabil la un conținut de glucide de 200 g/L este acidifiată cu H_2SO_4 la un pH de aproximativ 4,5 și îmbogățită cu sulfat de amoniu în proporție de 0,5%.

Concentrația de celule viabile din inocul a fost de 1×10^8 UFC/mL. Studiul s-a realizat timp de 60 de ore la o temperatură de 30°C, cu și fără agitarea mediului de cultură.

→ Efectul adaosului de nutrienți asupra cineticii de fermentație alcoolică

Cinetica de multiplicare a drojdiilor și randamentul de fermentare este direct corelat cu adaosul de nutrienți precum sulfatul de amoniu, îngrășământ complex N.P.K. cumulat cu suplimentele complexe ProtectVit BM1 și ProtectVit BMG, care sunt produse ce conțin vitamine din grupul B și oligoelemente. Concentrația în glucide a mediului de fermentație a fost de 200 g/L, pH-ul = 4,5, numărul inițial de celule viabile 1×10^8 UFC/mL, temperatura de fermentare de 30 °C, studiul realizându-se timp de 60 de ore, fără agitarea mediului de cultură.

→ Inhibiția cineticii de fermentație alcoolică prin compuși secundari

Multiplicarea drojdiei și producerea etanolului pot fi inhibitate de către subprodusul de fermentație.

Acetații și lactatii sunt cei mai importanți subprodusi de fermentație care au efect inhibitor asupra multiplicării drojdiei cât și asupra fermentației alcoolice. Acidul lactic și într-o măsură mică acidul acetic sunt parțial

Rezumatul tezei de doctorat

îndepărtați la distilare, astfel încât subprodusul de fermentație nu înapun în mod normal o înrntă asupra recirculării.

În melasa diluată s-a adăugat acid lactic (85%) și acid acetic (glacial) înainte de ajustarea pH-ului pentru a atinge concentrații de 3 g/L, 6 g/L, 9 g/L acid lactic și respectiv 0,3 g/L, 0,6 g/L, 0,9 g/L acid acetic. Au fost realizate și probe mător în care s-au adăugat volume similare de apă bidistilată pentru a ține cont de diluțiile cauzate de adaosul acizilor.

În rest celelalte condiții precum concentrația în glucide a mediului de fermentație a fost de 200 g/L, pH-ul = 4,5, numărul inițial de celule viabile 1×10^8 UFC/mL, temperatura de 30°C, studiul realizându-se timp de 60 de ore, fără agitarea mediului de cultură.

3.2.7. Calculul parametrilor cinetici de fermentare

Randamentul teoretic maxim de obținere a etanolului din glucidele reducătoare a fost calculat în funcție de relația stoichiometrică reprezentată de ecuația următoare. $C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$

Din 100 g de hexoze se produc 51,1 g de etanol și 48,9 g de CO_2 .

În condiții anaerobe de cultivare timp de 60 de ore, în laborator, pentru evaluarea comportamentului drojdiilor, s-au estimat următorii parametri:

- Concentrația de glucide (S), g/L, s-a determinat prin folosirea metodei cu DNS;
- Concentrația în etanol (P), g/L, s-a determinat prin distilare;
- Viteza de consum a substratului (r_s), g/L h, s-a calculat cu relația: $r_s = \frac{dS}{dt}$;
- Viteza de formare a etanolului (r_p), g/L h, s-a calculat cu relația: $r_p = \frac{dP}{dt}$;
- Randamentul practic de obținere a etanolului ($Y_{P/S}$), %, s-a calculat cu relația: $Y_{P/S} = \frac{r_p}{r_s}$;
- Raportul dintre cantitatea de etanol obținută și zahărul inițial (Y_1 , %) și randamentul teoretic, %, s-a calculat cu relația: $Y_1 = \frac{P - P_0}{S_0 \cdot 0,511}$;
- Raportul dintre cantitatea de etanol obținută și zahărul consumat (Y_2 , %) și randamentul teoretic, %, s-a calculat cu relația: $Y_2 = \frac{P - P_0}{(S_0 - S) \cdot 0,511}$;

3.2.8. Prelucrarea statistică a datelor

Metodele experimentale sunt folosite pe scară largă în cercetare precum și în sectoarele industriale în diferite scopuri (Box, 1958). Obiectivul principal în domeniul cercetării științifice este de a arăta semnificația statistică a efectului exercitat de anumii factori asupra unei variabile dependente de interes. *Variabilele* sunt elemente care se pot măsura, controla sau manipula în cercetare. Acestea diferă în multe privințe în special prin rolul care-l au în proiectul de cercetare și de tipul de măsurători care pot fi aplicate asupra lor. În cadrul cercetării experimentale se pot manipula unele variabile și apoi măsura efectele acestei manipulări. Analiza datelor în cercetarea experimentală se reduce la calculul "corelației" dintre variabile în special cele modificate și cele afectate de modificare. Numai datele experimentale pot demonstra în mod concludent relația de cauzalitate dintre variabile. Variabilele *independente* sunt acelea care sunt modificate în timp ce variabilele *dependente* sunt cele care sunt numai măsurate sau înregistrate. În sectorul industrial obiectivul principal este de a extrage nivelul maxim de informații înregistrând factorii care afectează procesul de producție utilizând cât mai multe observații (Box, 1978). În timp ce în știință sunt utilizate tehnicile de analiză a varianței (ANOVA) pentru a descoperi natura interactivă a realității care, se manifestă prin interacțiuni de ordin înalt între factori, în sectorul industrial efectul unor asemenea interacțiuni sunt adesea considerate ca o mare problemă. În știință, testul ANOVA se poate aplica la modele care operază cu cel mult cinci factori (www.statsoft.com).

Cercetarea bazată pe un număr mare de experimente este considerată în mod normal un standard bun. Metodele de studiu și de analiză fizico-chimice precum și a fenomenelor biologice au fost recent îmbunătățite datorită unor tehnici și echipamente din ce în ce mai performante care presupun conexiunea la un calculator care să realizeze analiza datelor. Acest progres și dezvoltarea de noi metode matematice și statistice pentru analiza și prelucrarea datelor numerice (analiza factorială, recunoașterea formelor, tehnici noi

Rezumatul tezei de doctorat

de clasificare etc.). Prin creșterea numărului de senzori, înregistratoare, analizoare, a devenit posibilă acumularea unei cantități aproape nelimitată de informații cu privire la studiul unui fenomen. În ultimul timp însă, tendința a fost de a reduce numărul de experimente în principal datorită volumului mare de muncă și a costului lor. Constatarea a fost că informațiile de calitate nu depind doar de numărul de experimente, un rol foarte important avându-l planificarea experimentelor. Această planificare nu este necesară numai în timpul studiilor inițiale ci pe întreg procesul de cercetare.

La începutul unui demers științific, cercetătorul trebuie să aleagă factorii potențiali influenți în domeniul experimental ales. Deoarece un număr tot mai mare de factori implică un număr tot mai mare de experimente, este necesar ca numărul acestora să se reducă doar la trei sau patru. Factorul reprezintă orice parametru experimental (de ex. temperatură, concentrație, densitate etc.) care influențează variabila dependentă a unui proces. Factorul reprezintă elemental primordial al cercetării experimentale planificate. Alegerea modelelor poate fi scris $S_1^k, S_2^k, \dots, S_k^k // N$ unde și este numărul de niveluri (de ex. valorile unui factor reprezintă nivelurile aceluia factor), k, este numărul de factori și N este numărul minim de experimente necesare. O dată ce factorii influenți sunt cunoscuți ei pot fi studiați mai precis. Pentru a-i studia, informațiile sunt definite și modelate prin *experimental factorial*. În multe aplicații, interesul nu este de a studia numai efectele acestor factori, ci mai ales interacțiunile dintre aceștia pentru a ști cum una sau mai multe caracteristici măsurate (răspunsuri) se comportă într-un domeniu bine definit experimental. Apoi este posibil să se caute optimul a unui sau mai multe răspunsuri experimentale fără a trebui să se efectueze un număr mare de experimente. Indiferent de domeniul de aplicare, obiectivul este de a găsi o regiune din domeniul experimental în care toate proprietățile studiate să îndeplinească toate constrângerile dorite. Această regiune este numită "zonă de compromis acceptabil". Pentru a găsi relația dintre factori și răspunsuri, fenomenul studiat este simplificat prin modelare matematică. În funcție de problema studiată, modelul ar putea fi liniar sau neliniar, o ecuație diferențială ș.a.m.d. Acest instrument metodologic este numit "metoda suprafeței de răspuns". Experimentarea va determina valorile coeficienților modelului matematic. Precizia modelului depinde de precizia coeficienților săi. Prin urmare, calitatea unui model experimental poate fi dată de precizia de predicție în domeniul experimental când coeficienții sunt cunoscuți. Aceste modele trebuie să fie o bună reprezentare a răspunsurilor experimentale în cadrul domeniului de interes și dacă aceste condiții sunt îndeplinite, ele trebuie să dea o estimare acceptabilă și de calitate a răspunsului. Orice tip de model poate fi ales cu condiția ca el să îndeplinească cele două proprietăți menționate mai sus. Modelele polinomiale sunt foarte des folosite datorită simplității lor și a abordării lor secvențiale. Odată ce modelul optimal corespunzător a fost ales, ulterior i se testează valabilitatea. Dacă acesta reprezintă o bună reprezentare a fenomenului, răspunsul poate fi calculat pentru fiecare punct al domeniului experimental.

Modelele cele mai frecvent utilizate sunt cele polinomiale de ordinul unu și doi și pot fi clasificate astfel:

Modele de ordinul I: modelele experimentale Hadamard sau Plackett-Burman; modelele experimentale factoriale întregi 2^k sau fracționare 2^{k-1} ; modelele experimentale echiradiale; modelele experimentale simplex

Modelele de ordinul II: modelele experimentale Centrale Composite; modelul Doehliert; modele experimentale echiradiale.

Metoda Suprafeței de Răspuns (MSR) este deci o colecție de tehnici matematice și statistice utilizate pentru modelarea și analiza problemelor în care răspunsul este influențat de anumite variabile și care au ca obiectiv optimizarea acestuia (AB). Pentru faptul că în experimentele noastre am utilizat modelul experimental Central Composite ne vom axa teoretic mai mult pe acesta.

Cele trei etape ale acestui model experimental constau în proiectarea experimentului statistic, estimarea coeficienților modelului matematic și a răspunsului predicționat și la final, verificarea aplicabilității modelului. Centrale Composite Design (CCD) conține o matrice factorială fracționată cu puncte centrale care permit estimarea curbii modelului.

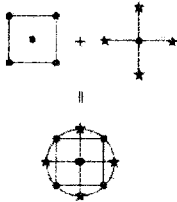


Figura 3.9. Diagrama generală a CCD cu doi factori. Modelul conține o matrice factorială cu punct central și „puncte stea” $\pm\alpha$, unde $|\alpha|$

> 1

Rezumatul tezei de doctorat

Dacă distanța de la centru la spațiul modelului cu puncte factoriale este de ± 1 unități pentru fiecare factor, distanța de la centrul spațiului de proiectare până la un „punct stea” este de $\pm \alpha$, în cazul în care $|\alpha| > 1$ valoarea exactă pentru α depinde de anumite proprietăți necesare pentru modelare și numărul de factori care sunt utilizați.

Tabelul 3.4. Matrice CCD pentru un model redus cu 15 experimente, 3 factori și 3 niveluri

Run	Factor A	Factor B	Factor C	
1	0	0	0	punct central
2	1	1	-1	punct factorial
3	1.41	0	0	punct stea
4	-1.41	0	0	punct stea
5	0	-1.41	0	punct stea
6	0	0	0	punct central
7	1	-1	1	punct factorial
8	0	0	0	punct central
9	-1	1	1	punct factorial
10	0	0	-1.41	punct stea
11	-1	-1	-1	punct factorial
12	0	0	0	punct central
13	0	1.41	0	punct stea
14	0	0	1.41	punct stea
15	0	0	0	punct central

La fel, numărul de puncte centrale utilizate în model depind, de asemenea, de anumite proprietăți necesare pentru modelare. Un CCD conține întotdeauna două sau mai multe „puncte stea” ca factori în model. „Punctele stea” reprezintă valorile extreme ale fiecărui factor din model.

Pentru a menține rotabilitatea, valoarea α depinde de numărul de experimente care rulează în zona CCD factorială. În cazul în care factorialul este complet atunci $\alpha = [2^k]^{1/4}$. În cazul în care $k = 2$ factori, ecuația de mai sus poate fi exprimată ca $\alpha = 1,414$.

Modelul polinomial pătratic este stabilit cu ecuația:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

unde Y este răspunsul predicționat, X_i și X_j sunt variabile de intrare, β_0 este termenul intercept, β_i este efectul liniar, β_{ii} este efectul pătratic și β_{ij} este termenul de interacțiune. În matricea modelului valorile nivelurilor factorilor pot fi trecute sub formă codificată sau sub formă actuală. Relația dintre formele codificate a variabilelor de intrare și valorile actuale sunt descrise de ecuația:

$$X_i = \frac{(A_i - A_0')}{\Delta A}$$

unde: X_i este valoarea codificată; A_i este valoarea actuală; A_0' este valoarea actuală pentru variabilele din punctul central; ΔA reprezintă pasul modificării variabilelor.

Tabelul 12

Factor	UM	-1	0	1
X1		a	b	c
X2		d	e	f
X3		g	h	i

Fiecare factor are un nivel minim codificat -1, unul central sau mediu codificat 0 și un nivel maxim codificat +1. Prin combinarea valorilor nivelurilor factorilor rezultă un plan experimental cu un număr N minim de experimente.

Rezumatul tezei de doctorat

Determinarea răspunsurilor pentru fiecare experiment în parte și reprezentarea grafică 3D va finaliza modelul pătratic CCD. Ecuațiile polinomiale sunt validate prin testul statistic ANOVA pentru determinarea semnificației fiecărui termen al ecuației și pe de altă parte estimează corectitudinea sau corelația în fiecare caz în parte (Techapun, 2002).

3.3. Instalațiile utilizate

3.3.1. Instalații de pregătire a melasei

Această instalație se compune din:

1. vasul pentru pasteurizare, care este un vas cilindric cu fund conic, prevăzut cu agitator și care are o capacitate de 25 m³.
2. vasul pentru diluție care este de asemenea un vas cilindric cu fund conic, prevăzut cu agitator și care are o capacitate de 25 m³.
3. vasul pentru acid sulfuric.
4. pompă dozatoare pentru dozarea acidului sulfuric în vasul de diluare.
5. schimbător de căldură cu plăci Alfa Laval pentru răcirea melasei diluate la temperatura de 30 ... 32 °C.

Melasa din rezervorul de depozitare este pompată continuu în vasul de pasteurizare. Aici este încălzită cu abur direct la temperatura de 92 °C sub agitare continuă. Cu ajutorul unei pompe este trecută în vasul de diluare unde este adusă cu apă la o concentrație de 20-23 °Bx. Tot în acest vas se face neutralizarea și acidularea melasei cu acid sulfuric concentrat până la un pH de 4,5-5,0.

Melasa diluată și acidulată trece printr-un schimbător de căldură unde este răcită la temperatura de 30 ... 32 °C după care ajunge la fermentare și fermentare.



Figura 3.10. Instalația de pregătire a melasei

3.3.2. Instalații de fermentare

Multiplicarea drojdiei . În fabrică multiplicarea drojdiei se realizează în vasul de drojdie. Acesta are o capacitate de 25 m³ este prevăzut cu serpentină de răcire, sistem de recirculare a plămezi și sistem de aerare.

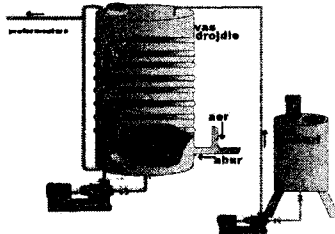


Figura 3.11. Vas de multiplicare a drojdiei

265 827

Rezumatul tezei de doctorat

Melasa diluată la aproximativ 12°Bx, se aduce cu acid sulfuric concentrat la un pH de aproximativ 4,5, se adaugă 50 kg N.K.P. și 5 kg de drojdie rehidratată. Se asigură o aerare moderată de aproximativ 2 L aer/L plămădă și minut, necesară multiplicării drojdiei și o temperatură de aproximativ 30 °C timp de 12 ore. Rehidratarea drojdiei se face cu apă caldă la temperatura de 35 °C timp de 30 de minute cu scopul de a crește rezistența membranei celulare la factorii de stres de mediu și de a pregăti celulele de drojdie pentru reacțiile de metabolism. Cantitatea de drojdie inoculată trebuie să asigure un minim de celule de aproximativ 10⁸ celule/mL.

După o perioadă de aproximativ 12 ore de multiplicare, concentrația plămăzii ajunge la aproximativ 6-7 ° zaharimetrică, vasul de drojdie se transferă în vasul de prefermentare unde se continuă procesul de multiplicare a celulelor de drojdie.

Prefermentarea.

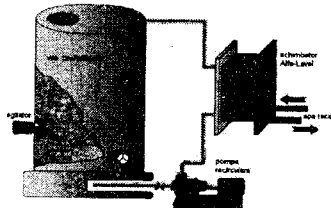


Figura 3.12. Vas de prefermentare

Rolul operației de prefermentare este acela de a realiza continuarea multiplicării drojdiilor în prezența sărurilor nutritive și a oxigenului până la o concentrație de 250-300 x 10⁸ celule/mL. Prefermentarea se realizează într-un vas de inox cu o capacitate de 400 m³. Vasul este prevăzut cu agitator, sistem de aerare și un sistem de recirculare a plămăzii. Pe circuitul de recirculare este interpus un schimbător de căldură cu plăci Alfa Laval, care realizează răcirea plămăzii din vas la temperatura de 30 ... 32 °C. În vasul de prefermentare spălat și sterilizat se începe alimentarea cu melasă și se aduce tot conținutul vasului de drojdie și se pornește aerarea. Sărurile nutritive se dizolvă într-un vas de 2000 litri și se adaugă treptat în vasul de prefermentare. Se reglează debitul de alimentare cu melasă astfel încât extractul aparent al plămăzii să se mențină între 7,5-8 ° zaharimetrică.

În momentul în care nivelul plămăzii a ajuns la 80% din volumul vasului, 40% din plămăda fermentată se trece în vasul de fermentare iar în vasul de prefermentare se continuă alimentarea cu melasă, aerarea și adaosul de săruri nutritive pentru un nou ciclu de prefermentare.

După o perioadă de 5-6 zile de multiplicare în fermentator, numărul de celule de drojdie începe să scadă, vasul de goalește, se spală, se sterilizează și se reia ciclul în prefermentare.

Fermentarea. În timpul procesului de fermentare, în condiții anaerobe, drojdia transformă zaharoza din plămădă în bioetanol, dioxid de carbon și căldură.

Fabrica de alcool are în dotare 3 vase de fermentare, fiecare vas având o capacitate de 400 m³, egală cu cea a vasului de prefermentare.

După introducerea plămăzii de drojdie în linul de fermentare, se începe alimentarea melasei de concentrație 23 °Bx, debitul reglându-se astfel încât extractul aparent în timpul fermentării să se mențină între 7,5-8 ° zaharimetrică. Procesul de fermentare durează 48-54 de ore iar la sfârșit plămăda trebuie să aibă un rest de zaharoză mai mic de 0,3%.

3.3.3. Instalații de distilare rafinare

Studiul s-a efectuat pe trei tipuri de instalații de obținere a alcoolului etilic și anume:

1. Instalație clasică cu funcționare discontinuă care are o capacitate de producție de 5000 litri alcool/24 h.
2. Instalație cu funcționare continuă, care are o capacitate de producție de 8000 litri alcool/24 h.
3. Instalație cu funcționare continuă cu o capacitate de producție de 30000 litri alcool/24 h.

Descrierea instalațiilor:

Rezumatul tezei de doctorat

Instalatia nr.1. este o instalatie clasica și se compune din urmatoarele utilaje:

- ☞ coloana de distilare cu functionare continua;
- ☞ coloana de rafinare cu blaza cu functionare discontinua;
- ☞ vase de depozitare melasa confectionate din OLC;
- ☞ vas pentru pasteurizarea, diluarea, neutralizarea și acidularea melasei confectionat din OLC;
- ☞ linuri de fermentare cu capacitatea de 30 m³, fabricate din OLC;

Instalatia nr.2. este o instalatie cu functionare continua, și se compune din urmatoarele utilaje :

- ☞ coloana de distilare;
- ☞ coloana de hidroselectie;
- ☞ coloana de rafinare;
- ☞ coloana de demetilare;
- ☞ vase depozitare melasa confectionate din OLC;
- ☞ vas pentru pasteurizarea, diluarea, neutralizarea și acidularea melasei;
- ☞ linuri de fermentare cu o capacitate de 75 m³, confectionate din OLC, cu racire exteroara (peliculara) și prevazute cu agitator;
- ☞ panou pentru vizualizarea temperaturilor de pe coloane și de pe schimbatoarele de caldura;

Instalatia nr. 3 se compune din:

- ☞ coloana de distilare,
- ☞ coloana de hidroselectie;
- ☞ coloana de rafinare;
- ☞ coloana de cozi;
- ☞ coloana de demetilare;
- ☞ vase pentru depozitarea melasei din inox;
- ☞ instalatie continua de pregatire a melasei pentru fermentare compusa din vas pentru pasteurizare, vas pentru diluare și acidulare și schimbator de caldura pentru racirea plamezii.
- ☞ linuri de fermentare cu o capacitate de 400 m³, confectionate din inox, unde racirea plamezii se realizeaza printr-un schimbator de caldura situat langa lin. Racirea plamezii în curs de fermentare se realizeaza prin recircularea cu ajutorul unei pompe, prin acest schimbator.
- ☞ intalatia este automatizata în proportie de ~80%. Conducerea procesului tehnologic se realizeaza dintr-o camera de comanda unde sunt amplasate patru calculatoare, conectate la sistemul de automatizare. Pe monitoarele calculatoarelor este dispus fluxul tehnologic și pot fi vizualizate toate vasele, coloanele, pompele cu temperaturi, presiuni și nivelurile lichidului pe fiecare vas sau coloana în parte. Tot de pe calculator se pomesc sau se opresc pompele și ventilile de abur și se setează nivelul lichidului în vase.

Considerații privind influența materialelor din care sunt confectionate utilajele asupra eficienței activității de obținere a alcoolului și a calității acestuia

Utilizarea vaselor de fermentare și a conductelor de legatură din OLC, nu este benefică din cauza procesului de coroziune care apare și care împiedică efectuarea unei igienizări corecte.

Existența unui mediu acid favorizează coroziunea, menținându-se un mediu propice contaminării bacteriene care influențează negativ fermentația alcoolică.

Utilizarea vaselor din inox elimină toate aceste inconveniente.

CAPITOLUL 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1. Studiul influenței drojdiei asupra randamentului de obținere a alcoolului etilic

4.1.3. În cazul utilizării melasei din sfeclă de zahăr

În vederea studierii influenței drojdiei asupra randamentului de obținere a bioetanolului, s-au folosit 5 preparate din drojzii active uscate și anume Safdistil C-70, Etanol Red™, Trockenhefe, Fali[®] și Pakmaya descrise în capitolul de materiale și metode de analiză.

Rezumatul tezei de doctorat

Deprt substrat fermentescibil a fost utilizată melasă din sfeclă de zahăr cu caracteristicile prezentate în capitolul de materiale și metode. Pentru fiecare drojdie utilizată s-au obținut consumuri specifice diferite, exprimate în melasă de tip 50 și % zaharoză, date prezentate în tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. Consumul specific pentru toate tulpinile de drojzii folosite la fermentație în cazul melasei din sfeclă de zahăr

1	Safdistil C-70	3,131±0,05 ^a	1,565±0,07
2	Etanol Red™	3,206±0,07	1,603±0,04
4	Fali™	3,385±0,01	1,692±0,05
3	Trockenhefe	3,217±0,08	1,608±0,01
5	Pakmaya	3,410±0,06	1,705±0,06

Tabelul 4.2. Randamentul în alcool pentru drojdiile folosite la fermentație în cazul melasei din sfeclă de zahăr

1	Safdistil C-70	94,18±0,15	Excelentă
2	Etanol Red™	92,08±0,09	Foarte bună
4	Fali™	87,22±0,15	Bună
3	Trockenhefe	91,77±0,16	Foarte bună
5	Pakmaya	86,58±0,10	Bună

^a deviația standard

În ceea ce privește randamentul practic în litri alcool absolut obținuți din 100 kg zaharoză, cel mai mare randament practic a fost obținut atunci când la fermentare s-a utilizat drojdie uscată de tip Safdistil C-70, randament care reprezintă aproximativ 95% din randamentul teoretic calculat (tabelul 4.2).

Urmărind figura 4.1. se observă că cel mai mic randament în alcool absolut cu valoarea de 58,65 L alcool absolut/100 kg zaharoză, s-a obținut atunci când la fermentare a fost folosită drojdie uscată tip Pakmaya, acest randament reprezentând 86,58% din randamentul teoretic calculat.

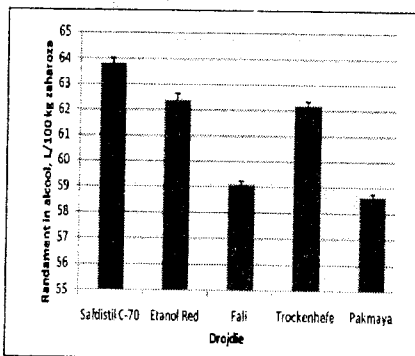


Figura 4.1. Randamentul de fabricație la obținerea alcoolului etilic folosind melasa din sfeclă de zahăr în funcție de tulpina de drojdie utilizată

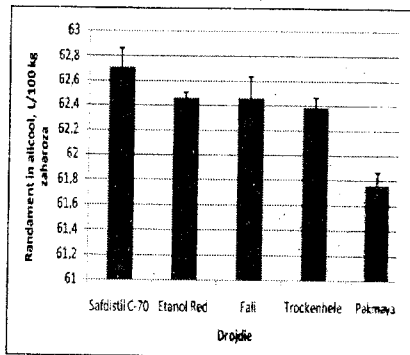


Figura 4.2. Randamentul de fabricație la obținerea alcoolului etilic folosind melasa din trestie de zahăr în funcție de tulpina de drojdie utilizată

4.1.4. În cazul utilizării melasei din trestia de zahăr

În tabelul 4.3. și tabelul 4.4. sunt ilustrate datele obținute (consumuri specifice, randament în alcool) în cazul folosirii melasei din trestia de zahăr.

Rezumatul tezei de doctorat

Tabelul 4.3. Consumul specific în cazul melasei din trestie de zahăr

1	Safdistil C-70	3,189±0,04 ^a	1,594±0,06
2	Etanol Red™	3,202±0,03	1,601±0,04
3	Fall ^R	3,202±0,06	1,601±0,03
4	Trockenhefe	3,207±0,03	1,603±0,03
5	Pakmaya	3,238±0,04	1,619±0,05

^a deviația standard

Diferențele observate în funcție de originea materiei prime, melasa, nu sunt foarte mari.

Tabelul 4.4. Randamentul în alcool pentru toate tulpinile de drojdie folosite la fermentație în cazul melasei din trestie de zahăr

1	Safdistil C-70	92,57±0,15	Excelentă
2	Etanol Red™	92,20±0,09	Foarte bună
3	Fall ^R	92,20±0,15	Bună
4	Trockenhefe	92,08±0,16	Foarte bună
5	Pakmaya	91,10±0,10	Bună

^a deviația standard

Pentru primele patru drojdii folosite randamentul în alcool variază în limite foarte restrânse de la 62,38-62,71 L alcool/100 kg zaharoză (figura 4.2).

Similar, și în această situație folosirea drojdie uscate Pakmaya a condus la obținerea unui randament redus comparativ cu celelalte tulpini de drojdie utilizate, deși ca valoare acest randament de 61,76 L alcool/100 kg zaharoză a fost mai mare decât randamentul obținut cu aceiași drojdie dar folosind melasă din sfecla de zahăr (58,65 L alcool/100 kg zaharoză).

Referitor la calitatea organoleptică a producției obținute în ambele cazuri atât pentru etanolul obținut din melasă din sfecla de zahăr cât și pentru etanolul obținut din melasă din trestie de zahăr, în cazul utilizării drojdiei Safdistil C-70 etanolul a prezentat caracteristici organoleptice excelente.

Etanolul obținut prin utilizarea drojdiilor Etanol Red™ și Trockenhefe a prezentat caracteristici organoleptice foarte bune iar alcoolul etilic obținut din Fall^R și Pakmaya a avut prezentat caracteristici organoleptice bune.

Concluzii parțiale

1. Prin analiza influenței diferitelor preparate uscate din drojdii active asupra randamentului de obținere a alcoolului etilic s-a observat că în cazul melasei din sfecla de zahăr, cel mai mare randament practic a fost obținut atunci când la fermentare s-a utilizat drojdie uscată activă Safdistil C-70, randament care reprezintă aproximativ 95% din randamentul teoretic calculat.
2. De asemenea, cel mai mic randament în alcool absolut cu valoare de 58,65 L a.a./100 kg zaharoză, s-a obținut atunci când la fermentare a fost folosită drojdie uscată tip Pakmaya, acest randament reprezentând 86,58% din randamentul teoretic calculat.
3. În cazul utilizării melasei din trestie de zahăr, folosirea drojdiei uscate Pakmaya a condus la obținerea unui randament redus în etanol, comparativ cu celelalte drojdii utilizate, deși ca valoare acest randament de 61,76 L a.a./100 kg zaharoză a fost mai mare decât randamentul obținut prin fermentare cu aceiași drojdie dar folosind melasă din sfecla de zahăr 58,65 L a.a./100 kg zaharoză.
4. Diferențele observate între randamentele de obținere a alcoolului etilic în funcție de tipul materiei prime (melasa din sfecla de zahăr sau trestie de zahăr), nu sunt foarte mari ele fiind neglijabile.

4.2. Studiul influenței drojdiei utilizate la fermentare asupra compoziției plămezelor fermentate

Deoarece nu s-au observat diferențe remarcabile în compoziția plămezelor fermentate în funcție de natura melasei utilizate ca materie primă, datele obținute sunt redată într-un singur tabel (tabelul 4.5.), ele reprezentând valoarea medie pentru fiecare component în parte.

Rezumatul tezei de doctorat

Cromatogramele aferente obținute la dozarea compuşilor primari și secundari de fermentație sunt prezentate în Anexa 1.

Tabelul 4.5. Compoziția plămezelor fermentate

1	Safdistil C-70	10,2	1,28	57,62	98,46	120,43	80,85	358,64
2	Etanol Red™	9,8	1,34	86,32	103,56	129,61	92,51	413,24
3	Fali ^R	9,2	1,44	96,21	120,15	145,2	110,22	473,14
4	Trockenhefe	9,6	1,45	89,56	110,32	133,41	99,62	434,25
5	Pakmaya	9,3	1,49	115,2	129,14	166,2	130,22	542,19

În ceea ce privește valoarea concentrației alcoolice, drojdia Safdistil C-70 a condus la obținerea unei concentrații alcoolice superioare și anume 10,2% vol. (figura 4.3).

Urmărind datele din figura 4.4, se observă că în cazul plămezii fermentate cu drojdie Pakmaya se obține cantitatea cea mai mare de alcool metilic de 1,49 mg/100 mL a.a. această valoare fiind cu 16,4% mai mare decât cantitatea de alcool metilic obținută în cazul plămezii fermentate cu drojdie Safdistil C-70.

Alcoolul metilic se formează în plămada supusă fierberii, mai ales când aceasta este bogată în pectină (sfecla de zahăr) și mai puțin la prelucrarea materiilor prime cerealiere.

Cu cât temperatura la fierbere a plămezii bogate în pectină este mai mare, cu atât se formează o cantitate mai mare de alcool metilic.

Alcoolul metilic poate să se formeze și la fermentarea plămezii, dacă în plămada există microorganisme cu activitate pectolitică.

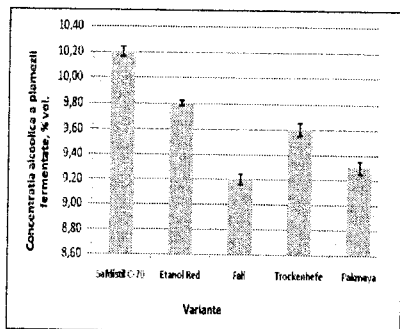


Figura 4.3. Concentrația alcoolică a plămezii fermentate în funcție de drojdia utilizată

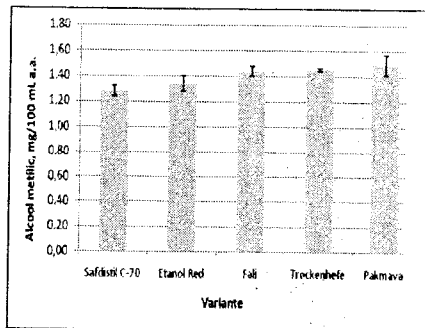


Figura 4.4. Concentrația în alcool metilic a plămezii fermentate în funcție de drojdia utilizată

Se mai observă însă că plămada fermentată cu drojdia Etanol Red™ prezintă un conținut mai ridicat în metanol decât plămada fermentată cu drojdie Safdistil C-70 deși aceasta din urmă a prezentat o concentrație alcoolică mai ridicată.

La fermentația alcoolică, drojdia produce și acizi organici (citric, succinic, lactic, malic, 2-hidroxiglutaric, acetic și alți acizi grași). Producția de acizi organici este cu atât mai mare cu cât deficiența substratului în anumite vitamine (de ex: tiamina) este mai mare.

Acizii organici sunt sintetizați în principal de drojdiile care folosesc gruparea NH₂ din aminoacizi și sunt eliberați în plămada deși unii acizi organici mai provin și prin hidroliza lipidelor existente în plămada.

Așa cum se observă în tabelul 4.5, conținutul în acizi organici a plămezii fermentate a variat între 57,62 și 115,2 mg/100 mL a.a., valoarea maximă fiind înregistrată în cazul fermentării plămezii cu drojdie uscată Pakmaya.

Rezumatul tezei de doctorat

Biosinteza esterilor implică reacția dintre un alcool și un acid. Atât acizii cât și alcoolii sunt produși ai metabolismului drojdiilor. Producția de esterii este stimulată de acidul pantotenic. Biosinteza esterilor din celula de drojdie are loc prin alcooliza compuşilor acil CoA. Alcoolii implicați sunt alcoolul etilic și alcoolii superiori de fuzel. În ceea ce privește concentrația în esterii a plămăzii fermentate valoarea cea mai mare a fost obținută atunci când la fermentare s-a utilizat drojdie Pakmaya și Fali; valorile fiind de 129,14 mg/100 mL a.a. și respectiv de 120,15 mg/100 mL a.a. (figura 4.5).

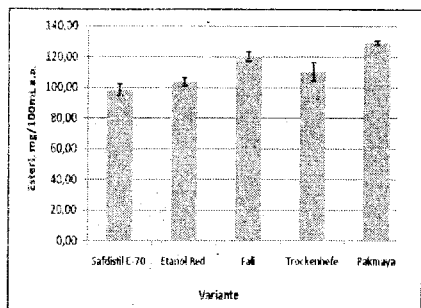


Figura 4.5. Concentrația în esterii a plămăzii fermentate în funcție de drojdia utilizată

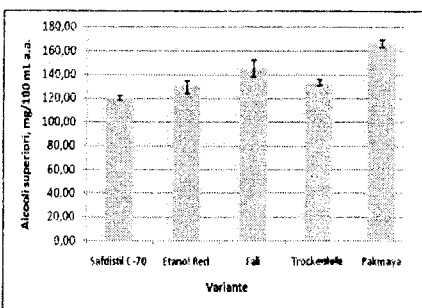


Figura 4.6. Cantitatea de alcooli superiori din plămăzii fermentate în funcție de drojdia utilizată

Enzimele care catalizează sinteza esterilor necesită CoA, în cantitate mare formându-se etilacetatul, deoarece atât alcoolul etilic cât și acetil CoA vor conduce la mărirea producției de esterii din plămada fermentată. Formarea esterilor este dependentă și de aportul de oxigen necesar drojdiilor, care afectează sinteza acizilor grași, respirația și fermentația, având în vedere că drojdiile au un rol important în structura membranei. Acizii grași nesaturați pot proveni din plămada sau pot fi sintetizați de drojdie din acizii grași saturați. Producția de esterii este micșorată prin scăderea concentrației plămăzii dulci, creșterea gradului de aerare a plămăzii, folosirea unei temperaturi mai mari la fermentare. Cele mai reduse valori ale conținutului în esterii au fost obținute în cazul plămăzii fermentate cu drojdie Safdistil C-70.

În figura 4.6. sunt prezentate valorile cantității de alcooli superiori în plămăzii fermentate cu cele 5 drojdie utilizate pentru fermentarea plămăzii. Și în acest caz, valorile cele mai mari ale cantității de alcooli superiori au fost obținute în cazul plămăzii fermentate cu Pakmaya și Fali valorile fiind de 145,20 mg/100 mL a.a. și respectiv de 166,20 mg/100 mL a.a. În cazul utilizării la fermentare a drojdiilor Trockenhefe și Etanol Red s-au obținut valori medii de 133,41 mg/100 mL a.a. și respectiv de 129,60 mg/100 mL a.a. Valoarea cea mai redusă în alcooli superiori a fost obținută în cazul plămăzii fermentate cu drojdie Safdistil C-70 de 120,43 mg/100 mL a.a.

Alcooli superiori alcătuiesc așa-numitul ulei de fuzel. Sursele de alcooli superiori sunt reprezentate de: aminoacizii prezenți în plămada dulce supusă fermentării, care sunt transformați de drojdie prin reacții de deaminare, decarboxilare și reducere; produșii intermediari, cum ar fi hidroxi și ceto-acizii; glucide, pe calea acetolactatului. Factorii care afectează formarea alcoolilor superiori se referă la: creșterea temperaturii de fermentare; agitarea plămăzii în timpul fermentării; aerarea excesivă a plămăzii, concentrația prea mare a plămăzii dulci; compoziția materiei prime folosite la obținerea plămăzii. Principala sursă de alcooli superiori o reprezintă aminoacizii. Astfel, din valină, pe calea α -oxovaleratului, se formează izobutanol, iar din leucină, pe calea α -oxoizocaproatului, se formează alcoolizoamilic. Din izoleucină, pe calea α -oxo- β -metil-valeratului, se formează alcoolizoamilic. Din treonină, pe calea α -oxobutiratului, se formează alcool izopropilic și respectiv, pe calea α -oxovaleratului, se formează alcool n-butilic.

În figura 4.7. este prezentat conținutul în aldehide obținute în plămăzii fermentate în funcție de drojdia utilizată la fermentația alcoolică a plămăzii. Astfel, conținutul în aldehide a fost cuprins în intervalul 80,85 mg/100 mL a.a. atunci când pentru fermentare s-a utilizat drojdie tip Safdistil C-70 și 130,22 mg/100 mL a.a. în cazul utilizării la fermentare a drojdiei Pakmaya. În alcoolul brut, se evidențiază prezența formaldehidei, acetaldehidei, aldehidei propionice, butirice, crotonice și acroleinei.

Dintre aldehidele menționate, acetaldehida apare ca un produs intermediar al fermentației alcoolice, formarea ei fiind posibilă și prin oxidarea alcoolului cu oxigen. Fermentația plămăzii cu aerare puternică duce la creșterea nivelului de acetaldehidă, creștere care este favorizată și de mărirea temperaturii de fermentație. Aldehida

Rezumatul tezei de doctorat

acetică se acumulează în celule și apoi eliberată în mediu în primele zile de fermentare când celulele sunt în fază activă de creștere, ulterior cantitatea de acetaldehidă fiind redusă de celule în timpul fermentației active. Importanța acetaldehidei derivă din rolul său de precursor al etanolului. Valorile întănite în literatură pentru pragul de sensibilitate al acestui compus variază în limitele 10 – 20 mg/L (Briggs și colab., 2004) cu aromă de „mere verzi”.

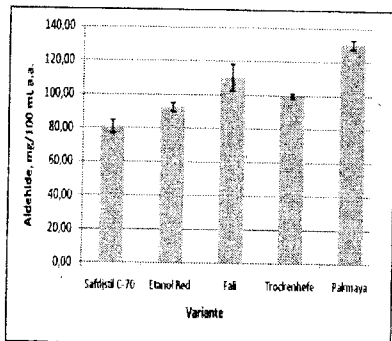


Figura 4.7. Conținutul în aldehide a plămezii fermentate în funcție de drojdia utilizată

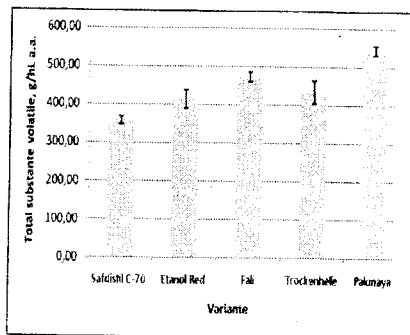


Figura 4.8. Conținutul total în substanțe volatile non alcool a plămezii fermentate în funcție de drojdia utilizată

Legat de conținutul total în substanțe volatile, cea mai mică valoare s-a obținut atunci când pentru fermentare s-a utilizat drojdie tip Safdistil C-70 în valoare de 358,64 mg/100 mL a.a., 413,24 mg/100 mL a.a. la drojdia Etanol Red™, 434,25 mg/100 mL a.a. la drojdia Trockenhefe, 473,14 mg/100 mL a.a. la drojdia Fali^R și 542,19 mg/100 mL a.a. în cazul drojdiei Pakmaya (figura 4.8.).

Concluzii parțiale

1. Studiind influența diferitelor preparate uscate din drojzii active asupra compoziției plămeziilor fermentate s-a constatat că plămada fermentată cu drojdia Safdistil C-70 a prezentat o concentrație alcoolică mai mare de 10,2% vol.ak.
2. Analizând calitatea plămeziilor fermentate și în special cantitatea de alcool metilic formată s-a constatat că plămada fermentată cu drojdia Safdistil C-70 conține mai puțin alcool metilic, numai 1,28 mg/100 mL a.a. și implicit mai puține substanțe volatile totale 358,64 mg/100 mL a.a.
3. Conținutul în acizi organici a plămeziilor fermentate a variat între 57,62 și 115,2 mg/100 mL a.a., valoarea maximă fiind înregistrată în cazul fermentării plămezii cu drojdie uscată Pakmaya.
4. În ceea ce privește concentrația în esteri a plămeziilor fermentate valoarea cea mai mare a fost obținută atunci când la fermentare s-a utilizat drojdie Pakmaya și Fali valorile fiind de 129,14 mg/100 mL a.a. și respectiv de 120,15 mg/100 mL a.a.
5. Valorile cele mai mari ale cantității de alcooli superiori au fost obținute în cazul plămeziilor fermentate cu Pakmaya și Fali valorile fiind de 145,20 mg/100 mL a.a. și respectiv de 166,20 mg/100 mL a.a.
6. Conținutul în aldehide a fost cuprins în intervalul 80,85 mg/100 mL a.a. atunci când pentru fermentare s-a utilizat drojdie tip Safdistil C-70 și 130,22 mg/100 mL a.a. în cazul utilizării la fermentare a drojdiei Pakmaya.
7. Cea mai mică valoare a conținutului total în substanțe volatile, s-a obținut atunci când pentru fermentare s-a utilizat drojdie tip Safdistil C-70 în valoare de 358,64 mg/100 mL a.a., 413,24 mg/100 mL a.a. la drojdia Etanol Red™, 434,25 mg/100 mL a.a. la drojdia Trockenhefe, 473,14 mg/100 mL a.a. la drojdia Fali^R și 542,19 mg/100 mL a.a. în cazul drojdiei Pakmaya.

4.3. Comportamentul drojdiilor în condiții aerobe de cultivare în laborator

Multiplicarea și stabilitatea celulelor de drojdie a fost cuantificată prin:

Rezumatul tezei de doctorat

- Studiul dinamicii de multiplicare a drojdiilor în condiții asincrone;
- Parametrii cinetici de multiplicare: numărul de generații, viteza de multiplicare, timpul de dublare a biomasei;
- Biomasă substanță uscată, g substanță uscată/100 mL mediu fermentativ;
- Gradul de autoliză a celulelor, %Na/Nt

În cadrul laboratorului propriu al fabricii s-a studiat cinetica de multiplicare a drojdiilor. Numărarea celulelor de drojdie, s-a realizat cu ajutorul unei camere Thoma iar viabilitatea drojdiilor prin colorare cu albastru de metilen. Codificarea celor 5 preparate uscate din drojzii active utilizate în studiu este prezentată în tabelul 4.6.

În figura 4.9. este prezentată curba de multiplicare a drojdiilor. Durata de monitorizare a multiplicării drojdiilor a fost de 48 de ore. Curba tipică de dezvoltare (fig. 4.9) comportă următoarele faze: faza de latență, faza de pomire a creșterii, faza de creștere exponențială, faza de încetinire a creșterii și faza staționară.

Celulele care au fost inoculate se aflau în faza activă de creștere motiv pentru care adaptarea constând în faza de latență a fost relativ redusă. Celulele au început să se multiplice cu viteza din ce în ce mai mare atingând o valoare maximă a vitezei de multiplicare μ_{max} pentru condițiile specifice în care se desfășoara procesul.

Tabelul 4.6. Codificarea tipurilor de drojdie utilizate la fermentație

Nr. ord.	Tipul de drojdie	Codificare
1	Safdistil C-70	D1
2	Ethanol Red™	D2
3	Fall [®]	D3
4	Trockenhefe	D4
5	Pakmaya	D5

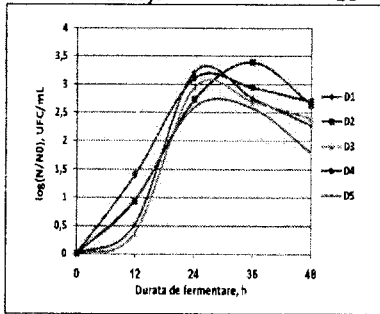


Figura 4.9. Dinamica multiplicării drojdiilor prin cultivare submersă

Din punct de vedere matematic faza exponențială de creștere poate fi descrisă prin două metode: o metoda ce ia în calcul cantitatea de biomasă și o a doua metodă ce ține cont de numărul de celule (Waițes și colab., 2001).

Cunoscând numărul de celule la începutul fazei exponențiale (N_0) și cel de la finalul acesteia (N_t) se poate calcula **numărul de generații (n)** conform relației 4.1.: $N = N_0 \cdot 2^n$ (4.1)

Din ecuația 4.1. se poate calcula **numărul de diviziuni** aplicând logaritmul natural:

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \quad (4.2)$$

Cunoscând perioada de timp corespunzătoare fazei exponențiale de creștere (t) și numărul de generații (n) se poate calcula **timpul de dublare a populației** (conform ecuației 4.3):

$$t_g = \frac{t}{n} = \frac{t \cdot \ln 2}{\ln N - \ln N_0} \quad (4.3)$$

În timpul fazei exponențiale de creștere există o legătură directă între numărul de celule și concentrația de biomasă. Aceasta din urmă crește după o ecuație exponențială de tip (4.4):

$$x = x_0 \cdot e^{\mu t} \quad (4.4)$$

Rezumatul tezei de doctorat

Considerand $t = t_0$ cand $x = 2 \cdot x_0$ ecuația 4.4 devine 4.5:

$$2x_0 = x_0 \cdot e^{\mu t_0} \quad (4.5)$$

Din ecuația 4.5 se poate stabili corelația dintre timpul de dublare t_0 și viteza specifică de creștere a celulelor μ (4.6):

$$t_0 = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (4.6)$$

În faza exponentială de creștere $\mu = \mu_{max}$ unde: μ_{max} - viteza maximă de creștere a celulelor de drojdie, h^{-1}

Pe baza acestor calcule au fost obținute valorile din tabelul 4.7. corespunzătoare celor cinci drojdii testate la nivel de laborator.

Tabelul 4.7. Parametri cinetici de multiplicare pentru tulpinile de drojdie studiate

D1	6,68	0,74	1,33
D2	9,17	0,76	1,30
D3	6,68	0,55	1,79
D4	5,68	0,47	2,11
D5	6,03	0,50	1,98

Se observă că numărul maxim de generații este comparabil pentru drojdiile D1 (Safdistil C-70) și D2 (Ethanol Red™) și mai redus pentru drojdiile D3 (Fali®), D4 (Trockenhefe) și D5 (Pakmaya). O explicație ar fi că adaptarea celulelor aparținând drojdiei D4 (Trockenhefe) a fost mai lungă fapt susținut și de numărul de celule înregistrat în primele 24h la jumătate față de celelalte variante analizate.

Numărul de generații calculat pentru drojdiile utilizate în experiment prezintă valori cuprinse între 5,68 în cazul drojdiei D4 (Trockenhefe) și 9,17 în cazul drojdiei D2 (Ethanol Red™) (fig. 4.10).

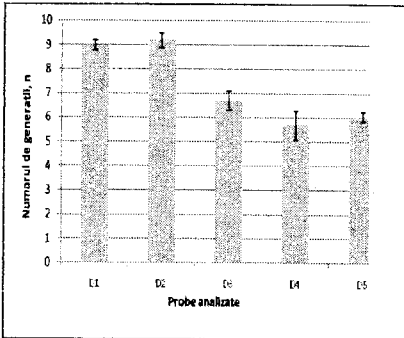


Figura 4.10. Numărul de generații determinat pentru drojdiile studiate

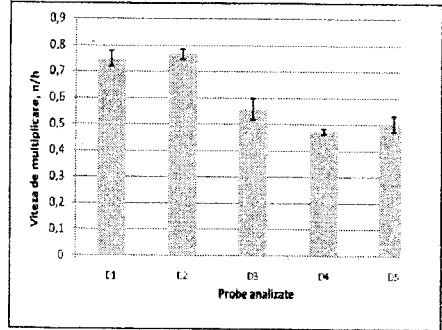


Figura 4.11. Viteza de multiplicare a drojdiilor studiate

Valoarea maximă a vitezei specifice de multiplicare μ este atinsă în primele 24 h pentru variantele D1 (Safdistil C-70), D2 (Ethanol Red™) în timp ce drojdiile D3 (Fali®), D4 (Trockenhefe) și D5 (Pakmaya) necesită aproximativ 36 h, probabil datorită faptului că aceste celule necesită un timp mai lung de separare, mobilizare și sinteză a compușilor necesari adaptării la mediul proaspăt în care pătrund.

Cea mai mare viteză de multiplicare, a prezentat-o drojdia D2 (Ethanol Red™) iar cea mai mică viteză de multiplicare s-a obținut în cazul drojdiei D4 (Trockenhefe) (fig. 4.11).

Evoluția timpului de dublare a biomasei se corelează perfect cu rezultatele obținute anterior, ceea ce exprimă fidelitate acestora (fig. 4.12). Astfel, se observă că valorile cele mai bune ale parametrilor cinetici de multiplicare sunt cele obținute pentru drojdia D2 (Ethanol Red™) urmată de D1 (Safdistil C-70). Pentru tulpina de drojdie D2

Rezumatul tezei de doctorat

(Ethanol Red™), numărul de generații a fost 9,17 (UFC/mL), viteza specifică de creștere 0,76 (h^{-1}) iar timpul de dublare a biomasei 1,307203 (h).

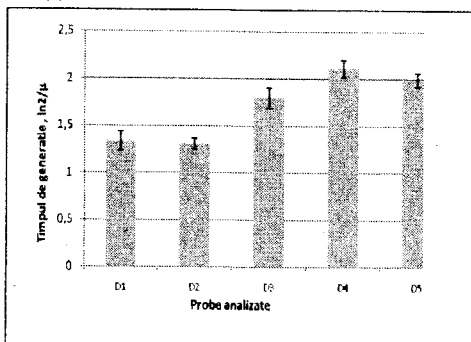


Figura 4.12. Timpul de generație determinat pentru drojdiile studiate

Parametrii cinetici de multiplicare a drojdiilor cu valorile cele mai mici au fost obținute în cazul drojdiei D4 (Trockenhefe) iar valorile cele mai bune pentru parametrii cinetici au fost obținute în cazul drojdiilor D2 (Ethanol Red™) și D1 (Safdistil C-70). Prin studiul stabilității metabolice a drojdiilor (figura 4.13.) se observă că cel mai redus grad de autoliză cu o valoare de 70,37%, după 48 de ore de la începutul fermentației alcoolice se obține la drojdia D2 (Ethanol Red™), urmată de drojdia D1 (Safdistil C-70), diferențele dintre cele două drojdii fiind foarte mici.

Rezultatele obținute la evaluarea randamentului de biomasă substanță uscată (g biomasă substanță uscată/100 mL mediu), după 60 de ore de cultivare confirmă rezultatele obținute anterior, și anume că cel mai bun randament de înmulțire al drojdiilor îl au drojdiile D1 (Safdistil C-70) și D2 (Ethanol Red™) (figura 4.14.).

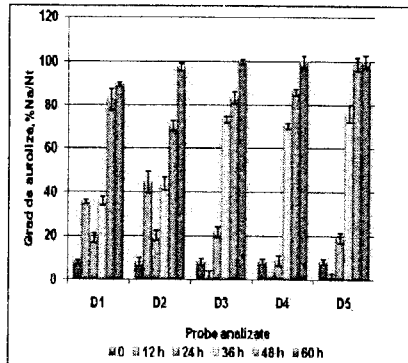


Figura 4.13. Stabilitatea metabolică a drojdiilor

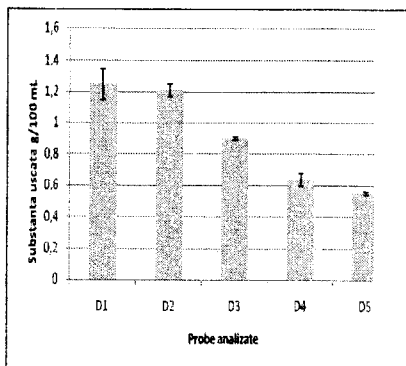


Figura 4.14. Cantitatea de biomasă substanță uscată obținută pentru tulpinile de drojdie utilizate

Concluzii parțiale

1. Prin determinarea parametrilor cinetici de înmulțire a drojdiilor studiate s-a observat că cei mai buni parametri cinetici de fermentare sunt cei obținuți pentru drojdia D2 (Ethanol Red™) urmată de drojdia D1 (Safdistil C-70), diferențele dintre cele două drojdii fiind foarte mici.

Rezumatul tezei de doctorat

2. Cel mai redus grad de autoliză cu o valoare de 70,37%, după 48 de ore de la începutul fermentației alcoolice se obține la drojdia D2 (Ethanol Red™), urmată de drojdia D1 (Safdistil C-70), diferențele dintre cele două drojdii fiind foarte mici.
3. Rezultatele obținute la evaluarea randamentului de biomasă substanță uscată (g biomasă substanță uscată/100 mL mediu), după 60 de ore de cultivare confirmă rezultatele obținute anterior, cel mai bun randament de înmulțire al drojdiilor avându-l drojdiile D1 (Safdistil C-70) și D2 (Ethanol Red™).
4. Drojdia utilizată în procesul de fermentare, la obținerea alcoolului etilic din melasă influențează direct atât randamentul de obținere a alcoolului etilic cât și calitatea alcoolului etilic obținut.

4.4. Studiul factorilor care influențează cinetica de fermentație alcoolică în condiții de laborator

Cinetica fermentației etanolice este direct corelată de efectul mai multor factori.

În condiții de laborator, în cazul tulpinii de drojdie D1 (Safdistil C-70) s-a studiat efectul mai multor factori precum: → cantitatea inițială de inocul; → concentrația în glucide a mediului de fermentație; → temperatura de fermentație; → pH-ul mediului de fermentație; → cantitatea de etanol; → agitarea mediului de cultură; → adăosul de nutrienți.

4.4.1. Efectul mării inoculului asupra cineticii de fermentație alcoolică

Fermentația alcoolică și implicit acumularea de alcool etilic are loc cu atât mai repede cu cât numărul de celule viabile din mediul fermentativ este mai mare (fig. 4.15).

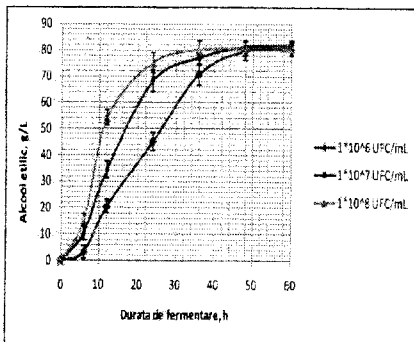


Figura 4.15. Efectul concentrației de celule din mediul fermentativ asupra acumulării alcoolului etilic

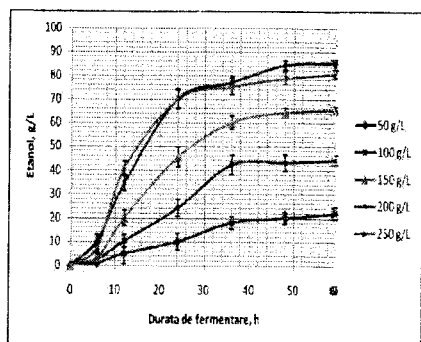


Figura 4.16. Efectul concentrației de zahăr din melasă asupra cineticii de fermentație alcoolică

La un număr mai mic de celule viabile inițiale în mediul de cultură, crește durata fazei lag și acumularea etanolului este întârziată.

Așa cum se poate observa în figura 4.15, pentru un număr inițial de celule de $1 \cdot 10^6$ UFC/mL valoarea fazei lag poate ajunge până la 4 ore.

De aceea în practică se recomandă utilizarea unui număr suficient de mare de celule în mediul fermentativ pentru scurtarea fazei de latență a celulelor de drojdie.

4.4.2. Efectul concentrației în glucide asupra cineticii de fermentație alcoolică

Evoluția cantității de etanol obținută prin fermentarea melasei cu concentrații diferite de zahăr 50 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L și 250 g/L este prezentată în figura 4.16. Analizând această figură este evident faptul că o concentrație în glucide de aproximativ 200 g/L a substratului fermentescibil favorizează pozitiv producerea de etanol.

După 60 de ore de fermentare în plămada cu concentrația în glucide de aproximativ 200 g/L se obține o concentrație în etanol de 65,3 g/L. Cum era și firesc cea mai mică concentrație în etanol s-a obținut în cazul plămazii cu concentrația în glucide 50 g/L de aproximativ 22,2 g/L. La o concentrație foarte mică a substratului

Rezumatul tezei de doctorat

(sub 3 g/L) drojdia moare prin inanție, iar productivitatea în etanol scade (Holzberg și colab., 1963; Hølleberg și Margalič, 1981). La concentrații mai mari se atinge limita de saturație, astfel încât viteza specifică de producere a etanolului de către celulele de drojdie atinge o valoare maximă la o concentrație a glucidelor de 200 g/L. Peste această valoare, inhibiția catabolică a enzimelor drojdiilor prr calea metabolică fermentativă conduce la scăderea vitezei de conversie a glucidelor în etanol (Ergun și colab., 2000).

În cazul concentrației substratului de 250 g/L glucide se observă o scădere a concentrației în alcool etilic, valoarea maximă obținută după 60 de ore de fermentare fiind de 80,9 g/L.

Un efect secundar important al prezenței glucidelor este represiia căii metabolice oxidative (efectul Crabtree).

La concentrații în reduse de glucide (în funcție de tulpina de drojdie), producerea de enzime oxidative este inhibată, forțând astfel metabolismul fermentativ. Această represiie catabolică nu se întâlnește la toate drojdiile și ea este o proprietate dorită la selectarea tulpinilor industriale pentru obținerea de bioetanol.

Drojdiile se dezvoltă în condiții bune, atunci când mediul în care se află are o presiune osmotică cât mai apropiată de aceea din interiorul celulei (izotonie). Schimbările bruște ale presiunii osmotice a mediului pot provoca dereglarea funcțiilor compensatoare de adaptare ale membranei citoplasmatică și chiar lezări ale peretelui celular, ce pot duce la moartea fiziologică a celulei.

În medii cu presiune osmotică ridicată, bogate în glucide sau săruri (medii hipertone), celulele sunt forțate să realizeze în interiorul lor o contrapresiune osmotică echivalentă, lăsând să treacă în mediu o porție corespunzătoare de apă (Siqueira și colab., 2008).

Când celulele se găsesc în medii cu presiune osmotică inferioară celei a conținutului vacuolelor, în apă de exemplu, din aceeași necesitate a realizării unei contrapresiuni osmotice echivalente, acceptă pătrunderea de apă din mediul extern. Drept urmare, turgescența celulelor crește până când presiunea intracelulară depășește rezistența peretelui, care plesnește. Fenomenul de turgescență duce astfel la distrugerea celulelor. Prin deshidratarea drojdiilor, în celule se mărește concentrația în substanțe și crește presiunea osmotică, ce exercită influență asupra proceselor biochimice ale celulei și la un anumit nivel începe șocul osmotic (Thattipamala et al., 1992).

4.4.3. Efectul etanolului asupra cineticii de fermentație alcoolică

Se cunoaște faptul că etanolul este toxic pentru drojdiile, de aceea toleranța mare la etanol este o caracteristică dorită la selectarea tulpinilor industriale (Fretas și colab., 1998). Adăosul de etanol afectează direct viteza de multiplicare a drojdiilor (fig. 4.17). Un adăos de 6% v/v în mediul de cultură va induce o scădere a vitezei de multiplicare cu 16%, în timp ce un adăos de 12% v/v etanol va reduce viteza de multiplicare cu 85%. Efectul inhibitor al etanolului este în general neglijabil la concentrații în etanol mai mici de 20 g/L, dar pentru majoritatea tulpinilor de drojdie, producerea de etanol și creșterea celulară se opresc complet la aproximativ 150 g etanol/L (Akdiguier și colab., 2004; Banat și colab., 2008).

Inhibiția prin etanol este corelată direct cu inhibarea și denaturarea enzimelor glicolitice importante, precum și cu modificarea membranei celulare (Ameborg și colab., 1995; Abdel-Fattah și colab., 2000).

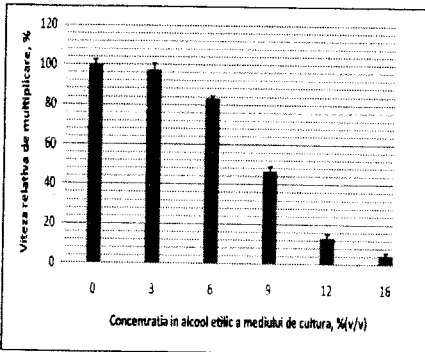


Figura 4.17. Efectul prezenței alcoolului etilic asupra vitezei relative de multiplicare a celulelor de drojdie

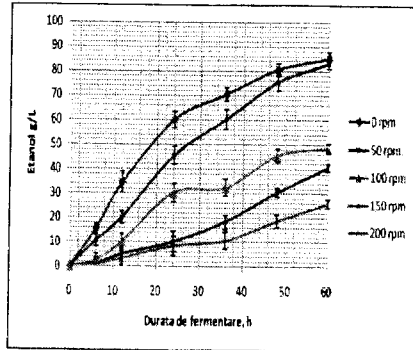


Figura 4.18. Efectul agitării asupra cineticii de fermentație alcoolică

4.4.4. Efectul agitării mediului de cultura asupra cineticii de fermentație alcoolică

În acest experiment, mediul de cultură este agitat folosind următoarele viteze de rotații: 0 rpm, 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm și 200 rpm. În figura 4.18, se poate observa că în cazul în care nu se agită mediul de cultură cât și a unei agitări ușoare de aproximativ 50 rpm fermentația alcoolică este eficientă.

Aceasta probabil se datorează volumului relativ redus care fermentează și se omogenizează, a formării dioxidului de carbon cât și datorită concentrației relativ ridicate de glucide de aproximativ 200 g/L care este adecvată pentru reprimarea consumului aerobic de glucide la drojii (conform efectului Crabtree).

4.4.5. Efectul pH-ului asupra cineticii de fermentație alcoolică

Viteza de fermentație este sensibilă la modificări ale valorii pH-ului, dar majoritatea drojiiilor de fermentație prezintă un pH optim între 4,0 și 6,0 (Lawrence și colab., 2004). În plus, majoritatea drojiiilor pot tolera expunerea la soluții acide la pH = 2,0 fără distrugerea lor.

Pentru evaluarea efectului pH-ului asupra cineticii de fermentație, în condiții de laborator melasa a fost adusă la un pH diferit având valori de 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 și 6,5 prin adăos de acid sulfuric H₂SO₄. În rest, condițiile de fermentare au fost: concentrația în glucide = 200 g/L, T = 30-32°, fără agitare.

Păstrarea mediului de fermentație la un pH acid va împiedica dezvoltarea altor microorganisme care ar putea compromite fermentația alcoolică.

Din figura 4.19, se poate observa că în urma fermentației, compușii volatili se găsesc în cantități mai mari atunci când mediul de fermentație prezintă valori de pH în intervalul 5,5-6,5 față de situația în care mediul de fermentație are pH în intervalul 3,5-4,0.

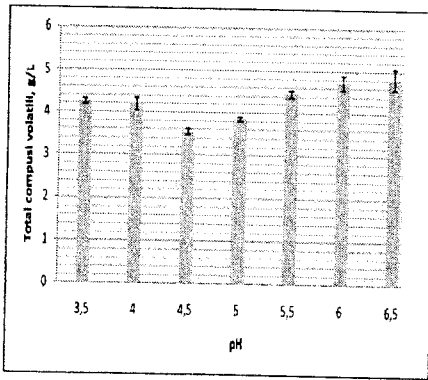


Figura 4.19. Efectul pH-ului asupra compușilor volatili din plămada fermentată

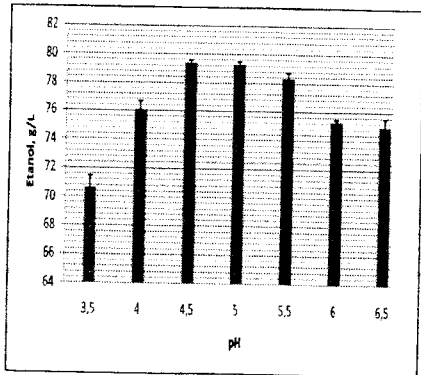


Figura 4.20. Efectul pH-ului asupra cantității de etanol formate în urma procesului fermentativ

Un pH ușor acid favorizează activitatea metabolică a drojiiilor și formarea alcoolului etilic.

Evaluând cantitatea de alcool etilic formată se observă ca la pH-ul 4,5-5,0 se formează cantitatea cea mai mare de etanol după 60 de ore de fermentare în cazul folosirii drojiei D1 de aproximativ 79,35 g/L (fig. 4.20).

Drojiiile se dezvoltă în limite largi de pH, pentru că au capacitatea să se adapteze la unele modificări ale mediului de cultivare. Astfel, dacă pH-ul mediului este mai acid decât valoarea optimă pentru creștere, în celulă devin active enzimele decarboxilaze, când pH-ul este mai bazic, decât valoarea optimă, devin active dezaminazele.

În aceste condiții, produsele rezultate din aminoacizi sub acțiunea catalitică a acestor sisteme enzimactice tind să realizeze neutralizarea și reprezintă sisteme tampon al efectului nociv al pH-ului. După epuizarea stocului de aminoacizi, acțiunea pH-ului duce la moartea celulelor, ca rezultat al unui dezechilibru, prin modificarea schimburilor osmotice între celulă și mediu. Efectul pH-ului mediului nutritiv asupra multiplicării drojiiilor trebuie valorificat în practică. La un pH = 7,5 intensitatea de respirație și randamentul de creștere este cu 60+100 % mai mare decât la pH = 4,0 în diverse medii nutritive cu glucoză la 30°C. La scăderea pH-ului în mediul nutritiv se stimulează pătrunderea protonilor în celule. La un pH = 3,5 și cantități suficiente de săruri de potasiu în mediu

Rezumatul tezei de doctorat

nutritiv crește pH-ul intracelular, ajungând la valorile de 7,5. Variația pH-ului intracelular are o importanță deosebită la reglarea glicolizei și a respirației celulelor de drojdie (Karelina și colab., 2007).

Valoarea optimă a pH-ului la cultivarea drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* oscilează între 4,5+5,8, deși drojdiile sunt mult mai active într-un mediu care are o valoare a pH-ului de 7+7,5. Celulele de drojdie în acest domeniu se găsesc în stare fiziologică bună și se înmulțesc rapid. De nivelul de pH în timpul cultivării drojdiilor, depinde randamentul și calitatea produselor finite. În practică, dezvoltarea drojdiilor se realizează în mediu acid, concentrația mai mare în ioni de hidrogen fiind un mijloc de combatere a microorganismelor de contaminare.

Domeniul de pH în care drojdia se poate multiplica și dezvolta este influențat de compoziția mediului și de conținutul în alcool al acestuia. Într-un mediu de fermentare cu 4,5 % alcool, drojdiile pot să-și desfășoare activitatea până la pH = 1,8. La un conținut de 5,5+6 % alcool, valoarea minimă a pH-ului acceptat de drojdie este de 2,3, iar la un conținut de 8,5+12,5 % alcool, limita inferioară a pH-ului la care drojdia poate acționa este de 3,5, ritmul de creștere la acest pH fiind încetinit. În afară de aceasta, în intervalul de pH 3+3,5 se află punctul izoelectric al unor substanțe colorante din melasă, care sunt absorbite de către celulele de drojdie (Nielsen și Arneborg, 2007). Schimbarea regimului de pH exercită acțiune asupra activității enzimelor, asupra pătrunderii substanțelor nutritive în celula de drojdie și se intensifică respirația. Brusuc se frânează schimbul de aminoacizi în celula de drojdie, scade cantitatea de biomasă rezultată, se înrăutățește calitatea drojdiei. Valorile extreme de pH (medii puternic acide sau puternic alcaline) provoacă denaturarea ireversibilă a enzimelor. Sunt date care arată că mărirea pH-ului provoacă creșterea activității enzimelor, care participă la formarea poliglicidelor, solubile în acizi.

4.4.6. Efectul temperaturii asupra cineticii de fermentație alcoolică

Toleranța temperaturilor înalte este o caracteristică dorită pentru selectarea drojdiilor de fermentație și de obținere a biotanolului, majoritatea având o temperatură optimă de multiplicare de 30...35 °C (Abdel-Fattah și colab., 2000, Araque și colab., 2008).

Temperatura este, din punct de vedere al procesului de biosinteză desfășurată la scară industrială, unul dintre parametrii fizici cei mai importanți, implicat profund, prin efectele sale, în optimizarea procesului.

Variațiile temperaturii au efect asupra randamentului de transformare a substratului în produsul dorit, asupra cerințelor nutritive ale drojdiei, compoziției biomasei obținute și vitezei de creștere (Suutari și colab., 1990).

Drojdia *Saccharomyces cerevisiae* aparține grupului mezofil, temperatura optimă oscilează între 26 °C și 36 °C. În figura 4.21, se observă faptul că, temperatura optimă de fermentare care conduce la obținerea unei cantități maxime de alcool etilic este 30°C. Temperatura optimă de fermentare la concentrații mici de alcool este adesea ceva mai mare (până la 38°C), dar toleranța la alcool este îmbunătățită la temperaturi reduse (Aldiguiet și colab., 2004).

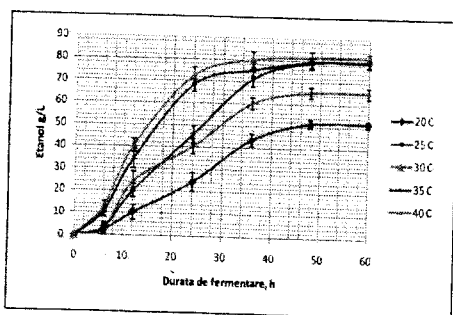


Figura 4.21. Efectul temperaturii de fermentare asupra cineticii de fermentație

Expunerea la temperaturi peste valoarea optimă are ca rezultat degradarea excesivă a enzimelor și pierderea viabilității drojdiei. Metabolismul drojdiilor eliberează pentru fiecare kg de substrat consumat o cantitate de energie de 49 kJ.

Deplasarea cu câteva grade în jurul temperaturii optime de creștere influențează nu numai randamentul în biomasă obținută și viteza de creștere, dar și compoziția biochimică a celulei de drojdie. Datele din literatură arată că variațiile de temperatură afectează multe procese metabolice din celulă, precum și compoziția biomasei în proteine și lipide, conținutul în ARN al celulei. Raportul dintre conținutul în ARN al drojdiilor și viteza lor de multiplicare se mărește la scăderea temperaturii (Araque și colab., 2008).

Rezumatul tezei de doctorat

Temperatura procesului de cultivare condiționează conținutul în lipide din compoziția membranelor celulare. Astfel, membrana drojdiilor psitrofile conține în cantități mai mari acizi grași polinesaturați, cele termofile, acizi grași mononesaturați, iar cele mezofile acizi mono- și polinesaturați (Jamai și colab., 2003).

În condiții de conservare, celulele de drojdie pot suporta temperaturi foarte scăzute, până aproape de zero absolut. Ele supraviețuiesc mai ușor la rece într-un mediu uscat, decât într-unul umed. S-a observat că prin scăderea temperaturii sub limita inferioară de 0°C se constată o reducere a vitezei de metabolism. Astfel, prin scăderea cu 10°C sub temperatura minimă are loc o scădere cu 50% a vitezei de metabolizare a substanțelor nutritive. Această scădere de activitate se explică prin faptul că, prin scăderea temperaturii are loc o pierdere a lanțurilor proteice și mascarea centrilor activi ai enzimelor încât acestea nu mai fac legătura cu substratul și nu mai îndeplinesc funcția de biocatalizatori (Tonja și colab., 2003).

La temperaturi scăzute, se produc pierderi de apă intracelulară, drojdiile trec în stare latentă de viață, când metabolismul se deslășoară foarte lent și pot rămâne viabile timp îndelungat. Prin congelare, drojdiile se pot păstra timp nelimitat, deoarece cantitatea de apă liberă în exteriorul și interiorul celulei se reduce, trecând în stare solidă și numai o parte rămânând disponibilă pentru a fi folosită de celule, încât activitatea celulei este oprită.

S-a evidențiat faptul că o congelare a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* suspendată în apă la -30°C sau -50°C a distrus 48-94 % din celule. Dezghețările și înghețările repetate provoacă însă moartea celulelor de drojdie. Scăderea temperaturii de cultivare de la 30°C la 15°C contribuie la mărirea conținutului de lipide, la 30°C el este de 12 %, iar la 15°C este de 14,5 %.

La *Saccharomyces cerevisiae*, prin scăderea temperaturii de creștere mai jos de optim, se mărește cantitatea de proteine și acizi ribonucleici, iar cantitatea totală de glucide ale celulei scade, în principal, prin scăderea conținutului de trehaloză (Tonja și colab., 2003).

În domeniul de temperatură supraoptimă, creșterea este concuroasă de moartea microorganismelor. Moartea celulelor de drojdie la temperaturi supraoptimale este cauzată de denaturarea termică a proteinelor și enzimelor celulare, încât activitatea de metabolism este oprită și se produce moartea fiziologică a celulei fără să aibă loc distrugerea fizică (Banat și colab., 1998, Rajoka și colab., 2005). Liza drojdiilor este o funcție puternic dependentă de temperatură, fiind caracterizată prin valori ale energiei de activare de 70-90 kcal/mol.

4.4.7. Efectul adaosului de nutrienți asupra cineticii de fermentație alcoolică

La obținerea inoculului de drojdie, pentru obținerea unui randament mare în celule se utilizează creșterea semiaerobă sau aerobă, cu o cantitate mult mai mare de nutrienți suplimentari. Pot fi adăugate suplimente complexe, ca de exemplu extract de porumb, extract de drojdie, extract de malț, hidrolizat caseinic sau diferite alte preparate (Nahvi și colab., 2002).

Pentru evaluarea efectului adaosului de nutrienți asupra cineticii de fermentație, proba martor a fost considerată proba cu îngrășământ N.P.K.

În figura 4.22 se observă că adaosul de sulfat de amoniu, și adaosul de îngrășământ complex N.P.K. cumulat cu preparatele ProtectVit BM1 și BMG influențează pozitiv atât multiplicarea drojdiilor cât și randamentul în alcool etilic (fig. 4.23)..

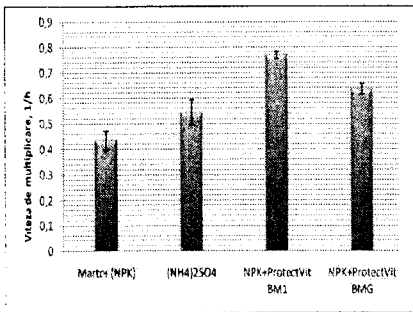


Figura 4.22. Efectul adaosului de nutrienți asupra vitezei de multiplicare a celulelor de drojdie

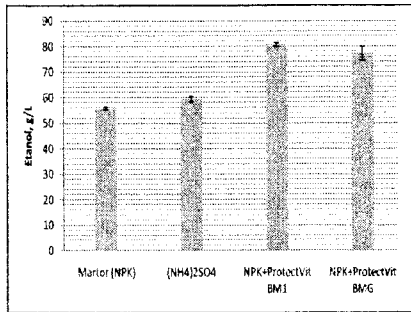


Figura 4.23. Efectul adaosului de nutrienți asupra cantității de etanol formată

Rezumatul tezei de doctorat

În substratul fermentescibil, pentru producerea de etanol plămada de fermentare trebuie să asigure și o serie de nutrienți secundari, necesari pentru multiplicarea și menținerea activității celulare (Malherbe și colab., 2004).

În practică multiplicarea drojdiilor și eficiența fermentației alcoolice sunt mult îmbunătățite prin utilizarea recirculării unei porțiuni din borhotul rezultat de la distilare.

Borhotul conține nutrienți solubili concentrați de la fermentarea anterioară, și suc celular rezultat din autoliza celulelor de drojdie. Borhotul are, de asemenea, o capacitate tampon excelentă și reduce necesarul de acizi pentru ajustarea pH-ului.

4.4.8. Efectul adaosului de subprodusi de fermentație asupra cineticii de fermentație alcoolică

Multiplicarea drojdiei și producerea etanolului pot fi inhibitate de apariția subprodusilor de fermentație. Cei mai importanți subprodusi de fermentație care au efect inhibitor atât asupra multiplicării drojdiei, cât și asupra cineticii de fermentație alcoolică sunt acidul acetic și acidul lactic (Thomas și colab., 2002).

Acidul lactic și într-o mai mică măsură, acidul acetic sunt parțial îndepărtați la distilare, astfel încât subprodusul de fermentație nu impun în mod normal o limită asupra recirculării. În figura 4.24. este prezentat efectul acidului lactic asupra randamentului în etanol, atunci când mediul de fermentație conține cantități variabile de acid lactic după cum urmează: 3 g/L, 6 g/L, 9 g/L acid lactic. În figura 4.24 se observă că un adaos de 3 g/L de acid lactic în mediul de fermentație va induce o scădere cu aproximativ 8% a cantității de etanol față de proba martor iar un adaos de 6 g/L de acid lactic în mediul de fermentație va induce o scădere cu aproximativ 44% a cantității de etanol față de proba martor.

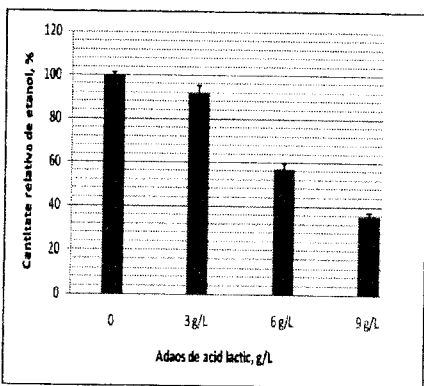


Figura 4.24. Efectul adaosului de acid lactic asupra cantității de etanol

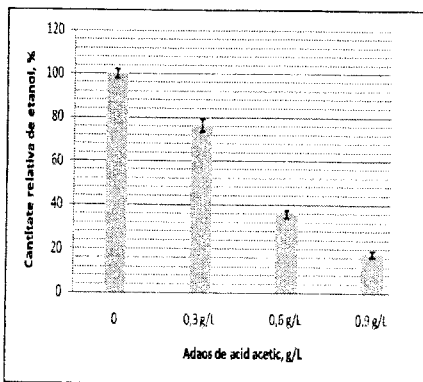


Figura 4.25. Efectul adaosului de acid acetic asupra cantității de etanol

În cazul adaosului de 9 g/L acid lactic în mediul de fermentație, în final etanolul format a înregistrat o scădere de 64% față de proba martor. Din literatura de specialitate se cunoaște că efectul acidului acetic este mai pronunțat. De aceea în mediul de fermentație s-au adăugat concentrații mai reduse de acid acetic și anume 0,3 g/L, 0,6 g/L, 0,9 g/L acid acetic (fig. 4.25.). La un adaos de acid acetic în concentrație de 0,3 g/L s-a observat o scădere cu 24% a cantității de etanol obținute. La un adaos de 0,9 g/L scăderea este de 84%.

Thomas și colab., 2002 a demonstrat că drojdia *Saccharomyces cerevisiae* tolerează concentrații destul de ridicate ale acizilor lactic sau acid acetic, atunci când pH-ul inițial al mediului a crescut după adaosul de acid.

Alți autori au demonstrat că drojdia *Saccharomyces cerevisiae* poate tolera concentrații relativ mari de acid lactic sau acid acetic acizi în medii a căror pH a fost corectat (Palmqvist și colab., 1999; Taherzadeh și colab., 1997). Când sunt expuse la un stres special, celule de drojdie de multe ori răspund adaptativ printr-o rezistență tranzitorie la același stres sau un stres diferit, cu un fenomen cunoscut sub numele de eco-protecție (Carmelo și colab., 1998). Comportamentul diferit al drojdiei la stresul indus de cei doi acizi adăugați se datorează constantelor diferite de disociere ale celor doi acizi. Acidul acetic (pK_a 4.74) are o valoare a constantei de disociere mai mare decât pK_a de acid lactic (pK_a 3.86).

4.4.9. Analiza statistică a datelor

Condițiile pentru optimizarea obținerii de etanol prin fermentarea melasei inoculată cu drojzii și măsurarea parametrilor cu efecte directe asupra acumulării de etanol au fost prelucrate statistic prin analiza factorială utilizând metoda suprafeței de răspuns (Box et al., 1978; Mübeccel și Mutlu, 2000; Hamsaveni și colab., 2001; Phisalaphong și colab., 2006; Cheng și colab., 2010). Rezultatele obținute și detaliate anterior au evidențiat faptul că cele mai relevante variabile cu efect direct asupra obținerii etanolului au fost temperatura (X_1) și pH-ul (X_2). Astfel, a fost utilizat un model factorial pentru a investiga efectul simultan al celor 2 factori asupra răspunsului și anume asupra cantității de alcoolului etilic format (Y). Matricea valorilor studiate este redată în tabelul 4.8. Ecuația care descrie modelul pătratic este: $Y = a + b \cdot X_1 + c \cdot X_2 + d \cdot X_1^2 + e \cdot X_2^2 + f \cdot X_1 \cdot X_2$

Semnificația fiecărui coeficient determinat prin regresie nelineară a fost analizată cu ANOVA. Pentru estimarea coeficienților s-a utilizat programul statistic STATISTICA 8.

Modelul suprafeței de răspuns a utilizat tipul compoziție centrală de modelare (Central Composite Design), utilizând 2 factori, 2 niveluri (+1, -1), 1 punct central (model experimental factorial $2^2 + 1$ punct central), 1 bloc (o singură serie de experimente). Modelul experimental a conținut 9 experimente conform tabelului 4.8.

$R^2 = 0,99346$; R^2 ajustat = 0,99346; MS Rezidual = 2,707315

Modelul corespunde unei ecuații pătratice. În urma rulării programului statistic ecuația modelului pătratic devine:

$$Y = -113,1139 + 11,7538 \cdot X_1 + 13,2417 \cdot X_2 - 0,2142 \cdot X_1^2 - 1,7167 \cdot X_2^2 + 0,0825 \cdot X_1 \cdot X_2$$

Tabelul 4.8. Matricea valorilor

1	20	4	68.5
2	20	5	66.3
3	20	6	64.2
4	30	4	82.2
5	30	5	81.2
6	30	6	78.8
7	40	4	51.3
8	40	5	55.3
9	40	6	50.3

Graficul suprafață de răspuns tridimensional obținut este o reprezentare grafică pentru studiul interacțiunii dintre cei doi factori selectați pentru determinarea concentrației optime în vederea atingerii concentrației maxime de etanol.

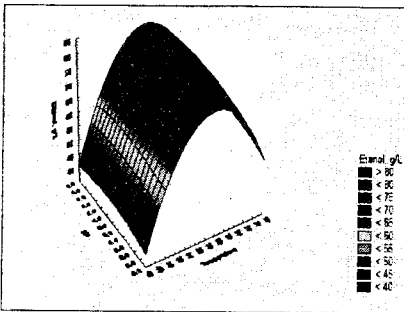


Figura 4.26. Suprafața de răspuns ce descrie variația conținutului în etanol în funcție de temperatură și pH pe baza modelului adoptat

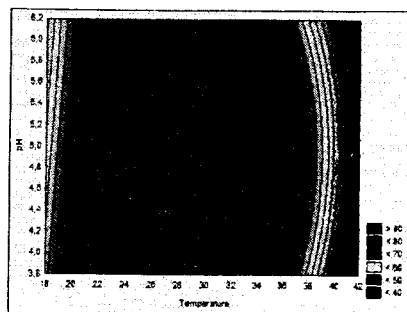


Figura 4.27. Diagrama de contur privind efectul temperaturii și pH-ului asupra conținutului în etanol cât și efectul corelativ al celor doi parametri

Pe intervalul de pH cuprins între 3.8 și 6.2 un factor important este temperatura a cărui maxim este situat în intervalul 26 și 30 °C, cu un optim pentru temperatura de 28 °C, temperatură caracteristică dezvoltării drojdiilor.

Rezumatul tezei de doctorat

4. Productivitatea maximă de obținere a etanolului a fost de 2,33 g/L h atunci când s-a utilizat drojdia D1, după 36 de ore de fermentare, urmată de D2 (2,1 g/L h), D4 (1,8 g/L h), D5 (1,56 g/L h) și D3 (1,46 g/L h).
5. O prelungire treptată suplimentară a timpului de fermentare induce o scădere a productivității în etanol.
6. Valoarea raportului dintre etanolul format și cantitatea inițială de glucide (Y1) în funcție de timp și de tulpina de drojdie utilizată pentru fermentare a fost cuprins în intervalul 4,92% - 72,60%.
7. Valorile medii ale randamentului în etanol raportat la cantitatea inițială de glucide (Y1) au fost maxime în cazul tulpinilor de drojdie D1 și D2 (21,93% și 15,03%) și respectiv 4,92%, 6,35% și 5,81% pentru D3, D4 și D5.
8. Valorile medii ale randamentului în etanol obținut practic raportat la randamentul teoretic (Y₂) după 60 de ore de fermentare s-au situat în intervalul 83,62 – 83,83%.
9. Pentru stabilirea duratei optime a procesului de fermentare trebuie să fie luate în considerare toate aspectele atât din punct de vedere tehnic cât și economic.

4.6. Studiul și optimizarea fermentației alcoolice la nivel Industrial la S.C. Eurovipo S.A., Ploiești, Romania

Faza I. Multiplicarea drojdiei. În fabrică multiplicarea drojdiei se realizează în vasul de drojdie (fig. 4.40.). Vasul de drojdie este din oțel inox de capacitate 25.000 L prevăzut cu: serpentină de răcire pentru asigurarea unei temperaturi optime de multiplicare, sistem de recirculare a plămезii pentru realizarea unei omogenizări corespunzătoare și sistem de aerare. Melasa diluată la aproximativ 12 °Bx ceea ce corespunde cam la 8 % zahăr se aduce cu acid sulfuric la un pH de 4,5. Se adaugă sărurile nutritive, drojdia uscată în cantitate corespunzătoare care să asigure o concentrație de aproximativ de minim 10⁶ celule/mL. Se asigură o aerare moderată de aproximativ 2 L aer/L plămada și minut necesară multiplicării drojdiilor, o temperatură de 30 - 32 °C timp de 12 ore.



Figura 4.40. Vasul de drojdie utilizat pentru multiplicarea drojdiei

După această perioadă de timp, concentrația plămезii ajunge la 6-7 °Bx, se preiau 90% din plămada și se transferă în linul de fermentare unde se continuă etapa de multiplicare a drojdiilor cât și prefermentarea. Peste cele 10% de plămada rămase în vasul de drojdie se aduce altă melasă diluată la aproximativ 12 °Bx cu pH = 4,5 și se continuă multiplicarea în taza I.

Faza II. Prefermentarea. Prefermentarea se realizează în vasele de fermentare (fig. 4.41.). Vasele de fermentare numite și liniuri sunt din oțel inox de capacitate 400 m³. Sunt prevăzute cu: sistem de recirculare a plămезii pentru realizarea unei omogenizări corespunzătoare pe acest circuit fiind interpus un schimbător de căldură (în contracurent circulă apă de răcire dedurizată), agitator și sistem de aerare (fig. 4.42.).

Cele 90% din plămada din vasul de drojdie care se transferă în linul de fermentare sunt completate cu melasă diluată la 22-23 °Bx și pH = 4,5 astfel încât plămada din lin să ajungă la aproximativ 9 °Bx. Se adaugă sărurile nutritive în cantitatea calculată corespunzător pentru melasa nou adăugată și se continuă aerarea. Prefermentarea durează aproximativ 24 de ore și se desfășoară la o temperatură de 30 ... 32 °C.



Figura 4.41. Linuri pentru fermentare



Figura 4.42. Sistem de răcire pentru linuri

Faza III. Fermentarea. Când plămada de prefermentare a ajuns la aproximativ 40% din capacitatea vasului se oprește aerarea și se continuă alimentarea cu melasă până la 80% din capacitatea vasului de fermentare, aceasta constituind faza de fermentare. Fermentarea plămăzeilor durează aproximativ 48 de ore, procesul derulându-se la temperatura de 30 ... 32 °C. În timpul procesului de fermentare, în plamadă pot apărea contaminări cu bacterii acetice sau bacterii lactice. Sursa de contaminare poate fi materia primă contaminată cu bacterii lactice sau acetice sau lipsa de igienă din fabrică. În cazul apariției contaminării în linurile de fermentare, se apelează la administrarea de antibiotice (exemplu Penicilina G potasium), în doza de 0,5-1,5 g/m³. În același timp se începe igienizarea prin curățarea, spălarea și dezinfectarea traseelor, a vaselor sau a schimbătoarelor de căldură responsabile de apariția contaminării respective.

De asemenea, melasa conține substanțe coloidale de natură proteică, pectică, melanoidinică, cât și unele produse de metabolism ale microorganismelor de contaminare, care produc o spumă abundentă în linul de fermentare. În această situație, pentru gestionarea acestui aspect, se apelează la adaosul de acizi grași rezultați în urma procesului tehnologic de rafinare a uleiurilor, în doza de ~0,05 - 0,2 kg/m³ de plamadă.

Concluzii parțiale

1. La nivel industrial procesul de fermentație are loc în următoarele etape: faza de multiplicare a drojdiei (temperatura de 30 - 32 °C timp de 12 ore); faza de prefermentare (temperatura de 30 - 32 °C timp de 24 ore) și faza de fermentare (temperatura de 30 - 32 °C timp de 48 ore).
2. În timpul fermentării în plamadă pot apărea contaminări cu bacterii acetice sau bacterii lactice provenite de la materia primă sau datorită lipsei de igienă din fabrică.
3. În cazul apariției contaminării în linurile de fermentare, se apelează la administrarea de antibiotice (exemplu Penicilina G potasium), în doza de 0,5-1,5 g/m³.
4. Melasa materie primă conține substanțe coloidale de natură proteică, pectică, melanoidinică, cât și unele produse de metabolism ale microorganismelor de contaminare, care produc o spumă abundentă în linul de fermentare, în această situație apelându-se la adaosul de acizi grași rezultați în urma procesului tehnologic de rafinare a uleiurilor, în doza de ~0,05 - 0,2 kg/m³ plamadă.

4.7. Influența utilităților asupra randamentului în alcool și calitatea acestuia

În vederea realizării acestui studiu s-au utilizat cele trei instalații de distilare-rafinare descrise în cadrul capitolului materiale și metode de analiză la subpunctul 3.3.3. Cele trei instalații au fost codificate după cum urmează:

Tabelul 4.10. Codificarea instalațiilor de distilare rafinare

1	Instalație clasică cu funcționare discontinuă care are o capacitate de producție de 5000 litri a.a./24 h.
2	Instalație cu funcționare continuă, care are o capacitate de producție de 8000 litri a.a./24 h.
3	Instalație cu funcționare continuă cu o capacitate de producție de 30000 litri a.a./24 h.

4.7.1. Studiul calității alcoolului etilic rafinat

În tabelul 4.11 sunt prezentate valorile unor compuși prezenți în etanol în funcție de tipul de instalație utilizat în procesul de distilare-rafinare.

Tabelul nr 4.11. Tabel comparativ privind prezența unor grupe de compuși în alcoolul etilic alimentar obținut pe cele trei tipuri de instalație și limitele standard admise

1	Aciditate totală, mg acid acetic/100 mL a.a.	1,5	0,9-1,4	0,8-1,2	0,4-0,7
2	Aldehide, mg aldehydă acetică/100 mL a.a.	0,5	0,10-0,30	0,08-0,15	<0,01
3	Alcooli superiori, mg alcool izoamilic/100 mL a.a.	0,5	0,15-0,4	0,09-0,18	<0,01
4	Esteri, mg acetat de etil/100 mL a.a.	1,3	0,3-0,5	0,07-0,20	<0,01
5	Metanol, mg alcool metilic/100 mL a.a.	30,0	10,85-18,2	1,30-6,65	<0,01

Din analiza datelor prezentate conform tabelul 4.11, se constată faptul că alcoolul etilic alimentar obținut prin utilizarea instalației nr.1 - Instalația discontinuă, prezintă valori maxime ale parametrilor analizați, apropiate de limitele standard admise, fără însă a le depăși. În cazul utilizării celorlalte 2 tipuri de instalații s-a constatat faptul că alcoolul etilic alimentar obținut are parametri calitativ superiori celui obținut la instalația nr. 1. În cazul instalației nr. 3 alcoolul obținut are o calitate foarte bună, anumite grupe de compuși chimici precum: aldehidele, alcoolii superiori, esterii și metanolul apropiindu-se de valoarea zero.

4.7.2. Studiul calității alcoolului etilic obținut prin rafinarea alcoolului tehnic

Datele prezentate în tabelul 4.12., evidențiază faptul că prin rafinarea alcoolului tehnic, se obține alcool etilic alimentar cu caracteristici conforme cu normele în vigoare, sub limitele maxime admise de standard, în cazul tuturor tipurilor de instalații folosite.

Tabelul 4.12. Caracteristicile chimice ale alcoolului etilic alimentar obținut din alcoolul tehnic prin rafinare pe cele 3 instalații, comparativ cu limitele standard admise

1	Aciditate totală, mg acid acetic/100 mL a.a.	1,5	1,10	0,83	0,60
2	Aldehide, mg aldehydă acetică/100 mL a.a.	0,5	0,42	0,34	< 0,01
3	Alcooli superiori, mg alcool izoamilic/100 mL a.a.	0,5	0,38	0,25	0,02
4	Esteri, mg acetat de etil/100 mL a.a.	1,3	0,86	0,62	< 0,01
5	Metanol, mg alcool metilic/100 mL a.a.	30,0	1,80	0,60	< 0,01

Dacă la instalația nr.1 conținutul în compuși analizați este mai mic decât valorile standard obligatorii cu 20-40%, se observă că în cazul utilizării instalației 2 valorile acestor compuși sunt cu 40-60% mai reduși decât valorile standard obligatorii.

Valorile acidității totale a cărei valori maxime admisibile sunt de 1,5 mg acid acetic/100 mL a.a. se observă că în cazul utilizării instalației nr. 1, aciditatea totală este de 1,10 mg acid acetic/100 mL a.a., în cazul utilizării instalației nr. 2 aceasta scade la valoarea de 0,83 mg acid acetic/100 mL a.a., iar în cazul folosirii instalației nr. 3, valoarea acidității totale scade la 0,60 mg acid acetic/100 mL a.a. Conținutul în aldehide exprimat în mg aldehydă acetică/100 mL a.a. prezintă valori de la 0,42 mg aldehydă acetică/100 mL a.a. în cazul utilizării instalației nr. 1 la 0,34 mg aldehydă acetică/100 mL a.a. în cazul instalației nr. 2 și chiar la valori mai mici de 0,01 mg aldehydă acetică/100 mL a.a. în cazul utilizării instalației nr. 3.

Conținutul în metanol este de asemenea redus și variază între 1,80 mg alcool metilic/100 mL a.a. în cazul utilizării pentru procesul de distilare rafinare instalația nr. 1 la valori de 0,60 mg alcool metilic/100 mL a.a. și chiar respectiv mai mici de 0,01 mg aldehydă acetică/100 mL a.a. în cazul utilizării instalației nr. 2 și 3.

În cazul instalația nr. 3 se constată faptul că valorile compușilor chimici sunt foarte apropiate de cele ale alcoolului etilic alimentar obținut prin procesul de rafinare (fig. 4.43).

Rezumatul tezei de doctorat

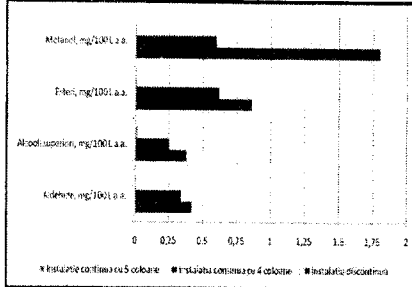


Figura 4.43. Parametri de calitate ai alcoolului etilic obținut în cele trei instalații de distilare-rafinare

4.7.3. Performanțele instalațiilor de distilare rafinare experimentate

În urma procesului de rafinare a alcoolului brut rezultă alcool etilic rafinat și un subprodus numit alcool tehnic.

În compoziția alcoolului tehnic, pe lângă impuritățile din alcool brut, se mai regăsește o cantitate de alcool etilic, care nu mai poate fi separată pe instalație.

Pentru recuperarea unei părți importante din acest alcool etilic, alcoolul tehnic este supus unei noi operații de rafinare, operație numită rerafinare a alcoolului tehnic.

Procentul ridicat de alcool etilic rafinat obținut este un criteriu de performanță al instalației (tabelul 4.13.).

$$\% \text{ alcool etilic rafinat} = (\text{alcool etilic rafinat} / (\text{alcool etilic rafinat} + \text{alcool tehnic})) \times 100$$

Prin utilizarea pentru procesul de distilare-rafinare a instalației nr. 1 se obține un procent de 86% alcool etilic rafinat și 14% alcool tehnic conform tabelului 4.13.

Prin rerafinarea alcoolului tehnic cu aceeași instalație, procentul de etanol rafinat va crește la 92,8% iar procentul de alcool tehnic va scădea la 7,2%.

Tabelul 4.13. Procentul de alcool etilic rafinat obținut în urma procesului de rafinare a alcoolului brut și de rerafinare a alcoolului tehnic

1	86	14	92,8	7,2
2	92,2	7,8	96,2	3,8
3	96	4,0	98,6	1,4

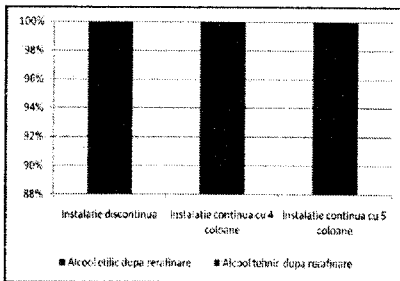


Figura 4.44. Procentul de alcool etilic și tehnic obținut în urma rafinării alcoolului brut

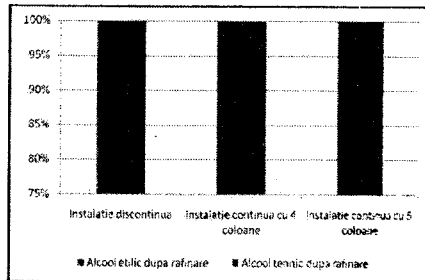


Figura 4.45 Procentul de alcool etilic și tehnic obținut în urma rerafinării alcoolului tehnic

Rezumatul tezei de doctorat

Dacă se utilizează instalația de distilare rafinare nr. 2 se obține 92,2% alcool etilic rafinat, procent apropiat ca valoare de valoarea obținută cu ajutorul instalației nr. 1 după rerafinarea alcoolului tehnic. Similar, valoarea alcoolului tehnic de 7,8% este apropiată de valoarea alcoolului tehnic obținut după rerafinare cu instalația nr. 1 de 7,2%. În figura 4.44 se observă că în cazul utilizării instalației nr. 3 se obține un procent ridicat de alcool etilic, de 96%, după rafinarea alcoolului brut, iar dacă se continuă cu rerafinarea alcoolului tehnic, cantitatea de alcool etilic rezultată ajunge până la 98,6% (figura 4.45).

4.7.4. Evaluarea consumului de energie termică

La fabricarea alcoolului etilic rafinat există o preocupare permanentă pentru reducerea consumului de abur, întrucât costul acestuia are o pondere însemnată din prețul de cost al alcoolului produs finit. Consumul de abur este cu atât mai redus cu cât instalația respectivă are un grad mai mare de recuperare a energiei termice. La fabricarea alcoolului din melasa se consumă abur în următoarele faze tehnologice: la descărcarea melasei din cisternele auto și la depozitare, pentru scăderea vâscozității; sterilizarea linurilor și a conductelor tehnologice în instalațiile de distilare-rafinare

Consumul de abur în cazul instalației nr. 3 este cu 42% mai mic decât în cazul instalației nr. 1 și cu 25% mai mic decât în cazul instalației nr. 2. Din tabelul 4.14 se observă că instalația nr. 3 instalația continuă cu 5 coloane este cea mai performantă din acest punct de vedere, costul aburului pe hectolitru de alcool pur fiind cel mai redus și anume de 15,37 lei/100 L. aa cu 11,01 lei/100 L. aa mai puțin decât în cazul utilizării instalației nr. 1 și cu 5,23 lei/100 L. aa mai puțin decât în cazul utilizării instalației nr. 2.

Tabelul 4.14. Date privind consumul de energie termică pe fiecare tip de instalație

1	2,08	3000	1442	26,38
2	3,33	3750	1126	20,60
3	12,5	10500	840	15,37

* Costul unui kilogram de abur = 0,0183 lei; * Consum specific abur = consum abur [kg/h] / capacitatea instalației [hl/aa/h]

* Costul aburului = consum specific de abur X 0,0183

4.7.5. Productivitatea instalațiilor

În prețul de cost al alcoolului etilic rafinat ponderea cea mai mare o prezintă prețul materiei prime utilizate în procesul de producție. Din acest motiv, o preocupare permanentă într-o fabrică de obținere a alcoolului o constituie evitarea pierderilor tehnologice, respectarea condițiilor de igienă, optimizarea procesului de fermentare sau altfel spus, conducerea corectă a procesului tehnologic, lucru care se materializează printr-un consum specific de melasă cât mai scăzut și un randament în alcool cât mai mare.

Tabelul 4.15. Randamentul în alcool etilic absolut pe cele 3 instalații, în funcție de consumul specific de melasă

1	341,5	170,8	58,58	85,94	Slabă
2	334,1	167,1	59,86	87,82	Bună
3	320,2	160,1	62,46	91,63	Foarte bună

* Randamentul teoretic la prelucrarea melasei pentru obținerea de alcool etilic este de 67,74 litri alcool absolut la 100 kg zaharoză.

Valoarea consumului specific de melasă tip 50% a scăzut de la 341,5 kg melasă tip 50%/hL a.a. la 334,1 kg melasă tip 50%/hL a.a. și respectiv 320,2 kg melasă tip 50%/hL a.a. atunci când se folosește instalația nr. 1, instalația nr. 2 și respectiv instalația nr. 3. Similar, consumul specific de zaharoză scade de la valoarea 170,8 kg zaharoză/hL a.a. în cazul utilizării instalației nr. 1 la valoarea de 167,1 kg zaharoză/hL a.a. atunci când se utilizează instalația nr. 2 și chiar la valoarea de 160,1 kg zaharoză/hL a.a. când se utilizează pentru distilare rafinare instalația nr. 3.

Analizând datele din tabelul 4.15 se observă că cel mai bun randament în alcool se obține în cazul instalației nr. 3, instalație performantă din punct de vedere constructiv lucru datorat și îndeplinirii condițiilor prevăzute mai sus. Raportarea la % dintre randamentul practic și randamentul teoretic a fost de 91,63 % în cazul utilizării instalației nr. 3, 87,82 % atunci când s-a utilizat instalație nr. 2 și de 85,94 % în cazul utilizării instalației nr. 1.

4.7.6. Efectele economice

În tabelul 4.16 sunt prezentate date referitoare la beneficiile obținute din vânzarea alcoolului etilic rafinat obținut prin utilizarea celor 3 instalații. Astfel costul de producție pentru obținerea alcoolului etilic rafinat scade de la valoarea de 2.530 lei / L. aa în cazul utilizării instalației nr. 1 la 2.439 și respectiv 2.365 lei / L. aa dacă se utilizează instalația nr. 2 și respectiv instalația nr. 3.

Rezumatul tezei de doctorat

Pe instalația nr 3 beneficiul obținut este de 30 de ori mai mare decât cel de pe instalația nr1 și de 5,7 ori mai mare decât cel de pe instalația nr 2.

Tabelul nr. 4.16. Date referitoare la beneficiile obținute din vânzarea alcoolului etilic rafinat obținut cu cele 3 instalații

1	5000	2,530	2,616	0,086	12900	154800
2	8000	2,439	2,724	0,285	68400	820800
3	30000	2,365	2,800	0,435	391500	4698000

Analizând datele din tabelul 4.16, se observă că beneficiile obținute prin vânzarea alcoolului etilic sunt superioare pe instalația nr. 3, instalație cu care se pot obține costuri de producție mai mici iar calitatea foarte bună a acestui alcool permite obținerea unui preț mai mare la comercializare.

4.7.7. Ponderea cheltuielilor pe categorii de elemente din costul de producție

Pentru stabilirea ponderii cheltuielilor pe categorii de elemente s-a realizat calculația completă a costului de producție a alcoolului etilic absolut pe cele trei tipuri de instalații de distilare rafinare utilizate. Din analiza datelor din tabelul 4.17 rezultă faptul că ponderea cea mai mare a cheltuielilor o reprezintă cheltuielile cu materiile prime și materialele (50,9-54,0%). Pe locul al doilea se plasează cheltuielile indirecte și anume cheltuielile cu apa curentă, energia electrică și energia termică.

Față de ponderea importantă a celor două categorii de cheltuieli se constată faptul că pentru cheltuielile salariale nu se depășește procentul de 6,1% (în cazul utilizării instalației nr. 3, situație ce indică gradul foarte ridicat de mecanizare și automatizare a procesului de producție).

Tabelul nr. 4.17. Ponderea cheltuielilor pe categorii de elemente, %

Nr. crt.	Tip de cheltuieli	Pondere cheltuielilor pe tip de instalație, %		
		1	2	3
1	Materii prime și materiale	54	51,7	50,6
2	Cheltuieli salariale	6,1	3,2	1,8
3	Amortizare	1,3	4,9	8,8
4	Cheltuieli indirecte (apă, energie electrică, termică)	34,2	29,0	25
5	Cheltuieli generale	4,4	11,2	13,6
6	Total	100	100	100

Concluzii parțiale

1. Comparând calitatea alcoolului etilic obținut cu cele 3 instalații prin dozarea compuşilor volatili se constată că prin utilizarea instalației continue cu 5 coloane calitatea alcoolului etilic este foarte bună, compuşii volatili înregistrând valori extrem de mici.
2. În urma rafinării alcoolului tehnic obținut la cele 3 instalații se observă că alcoolul rafinat obținut de la instalația continuă cu 5 coloane prezintă caracteristici de calitate superioare celorlalte probe rafinate cu celelalte două echipamente.
3. Procentul de alcool tehnic rezultat în urma rafinării a fost mai mic în cazul instalației continue cu 5 coloane de numai 1,4% comparativ cu 3,8% în cazul instalației continue cu 4 coloane și de 7,2% în cazul instalației discontinue de distilare.
4. Consumul de abur a fost cel mai redus în cazul instalației continue cu 5 coloane, costul aburului pe hectolitru de alcool pur fiind de 15,37 lei/100 L aa.
5. Consumurile specifice de melasă, respectiv zaharoză au prezentat valorile cele mai mici în cazul instalației continue cu 5 coloane.
6. Prin utilizarea instalației continue cu 5 coloane randamentul practic de obținere a etanolului a fost de 62,46%, ceea ce reprezintă de fapt 92,2% din randamentul teoretic.
7. Beneficiile obținute prin vânzarea alcoolului etilic sunt superioare în cazul instalației de distilare rafinare continuă cu 5 coloane, instalație la care se pot obține costuri de producție mai mici iar calitatea foarte bună a acestui alcool permite obținerea unui preț mai mare la comercializare.

Rezumatul tezei de doctorat

8. Față de ponderea importantă a celor două categorii de cheltuieli (cu materii prime și auxiliare și cu apă, energie electrică și energie termică) se constată faptul că pentru cheltuielile salariale nu se depășește procentul de 6,1%, situație ce indică gradul foarte ridicat de mecanizare și automatizare a procesului de producție.

CAPITOLUL 5. Concluzii finale

1. Prin analiza influenței diferitelor preparate uscate din drojdii active asupra randamentului de obținere a alcoolului etilic s-a observat că în cazul melasei din sfecla de zahăr, cel mai mare randament practic a fost obținut atunci când la fermentare s-a utilizat drojdie uscată activă Safdistil C-70, randament care reprezintă aproximativ 95% din randamentul teoretic calculat, iar cel mai mic randament cu valoarea de 38,65 mL alcool absolut/100 mg zaharoză, s-a obținut atunci când la fermentare a fost folosită drojdie uscată tip Pakmaya, acest randament reprezentând 86,58% din randamentul teoretic calculat.
2. În cazul utilizării melasei din trestie de zahăr, folosirea drojdie uscate Pakmaya a condus la obținerea unui randament redus în etanol, comparativ cu celelalte tipuri de drojdie, deși ca valoare acest randament de 61,76 mL alcool/100 mg zaharoză a fost mai mare decât randamentul obținut prin fermentare cu aceeași drojdie dar folosind melasă din sfecla de zahăr (58,65 mL alcool/100 mg zaharoză).
3. Diferențele observate între randamentele de obținere a alcoolului etilic în funcție de originea materiei prime, melasa din sfeclă sau trestie de zahăr, sunt nesemnificative.
4. Studiul influenței diferitelor preparate uscate din drojdii active asupra fermentării plămezelor din melasă s-a constatat că plămada fermentată cu drojdia Safdistil C-70, a avut concentrația alcoolică cea mai mare de 10,2% vol.alc.
5. Analizând calitatea plămezelor fermentate și în special cantitatea de alcool metilic formată s-a constatat că plămada fermentată cu drojdia Safdistil C-70 conține mai puțin alcool metilic, numai 1,28 mg/100 mL alcool pur și implicit mai puține substanțe volatile totale 358,64 mg/100 mL alcool pur.
6. Prin determinarea parametrilor cinetici de înmulțire a drojdiilor studiate s-a observat că cei mai buni parametri cinetici de fermentare sunt cei obținuți pentru drojdia D2 (Ethanol Red™) urmată de drojdia D1 (Safdistil C-70), diferențele dintre cele două drojdii fiind foarte mici.
7. Rezultatele obținute la evaluarea randamentului de biomasă (g biomasă substanță uscată/100 mL mediu), după 60 de ore de cultivare confirmă rezultatele obținute anterior, cel mai bun randament de înmulțire al drojdiilor avându-l drojdiile D1 și D2.
8. Cel mai redus grad de autoliză cu o valoare de 70,37%, după 48 de ore de la începutul fermentației alcoolice se obține la drojdia D2 (Ethanol Red™), urmată de drojdia D1 (Safdistil C-70), diferențele dintre cele două drojdii fiind foarte mici.
9. Tipul de drojdie utilizat în procesul de fermentare, la obținerea alcoolului etilic din melasa influențează direct atât randamentul de obținere a alcoolului etilic cât și calitatea alcoolului etilic obținut.
10. La un număr mai mic de celule viabile inițiale în mediul de cultură, crește durata fazei lag și acumularea etanolului este întârziată. Dintre cele trei concentrații inițiale de celule viabile a fost selectată cea de $1 \cdot 10^9$ UFC/mL.
11. La o concentrație foarte mică a substratului în zaharuri (sub 3 g/L) drojdia moare prin înrădăcirea, iar productivitatea în etanol scade. În schimb la concentrații mai mari se atinge limita de saturație, astfel încât viteza specifică de producere a etanolului de către celule atinge o valoare maximă la o concentrație a glucidelor de 200 g/L. Peste această valoare, inhibiția catabolică a enzimelor drojdiilor pe calea metabolică fermentativă conduce la scăderea vitezei de conversie.
12. Fermentația alcoolică este favorizată în cazul în care nu se agită mediul de cultură cât și atunci când mediul se agită ușor la aproximativ 50 rpm.
13. Compușii volatili (non alcool) rezultați în urma fermentației alcoolice se găsesc în cantități mai mari la un pH neutru față de un pH acid. Un pH ușor acid favorizează activitatea metabolică a drojdiilor și formarea alcoolului etilic.
14. Evaluând cantitatea de alcool etilic formată, se observă că la pH-ul 4,5-5,0 se formează cantitatea cea mai mare de etanol după 60 de ore de fermentare în cazul folosirii drojdiei D1.
15. Temperatura optimă de fermentare care conduce la obținerea unei cantități maxime de alcool etilic este 30°C.
16. Adaosul de sulfat de amoniu, și adaosul de îngrășământ complex N.P.K. cumulat cu preparatele Protect/Vit BM1 și BMG influențează pozitiv atât multiplicarea drojdiilor cât și randamentul în alcool etilic.
17. Prezența în cantitate de 3 g/L acid lactic în mediul de fermentație induce o scădere cu aproximativ 8% a cantității de etanol față de proba martor iar prezența în cantitate de 9 g/L acid lactic în mediul de fermentație, conținutul în etanol format a înregistrat o scădere de 64% față de proba martor.
18. Prezența de acid acetic în concentrație de 0,3 g/L în mediul de fermentație a indus o scădere cu 24% a cantității de etanol obținute, iar la 0,9 g/L acid acetic scăderea este de 84%.

Rezumatul tezei de doctorat

19. Comportamentul diferit al drojdiei la stresul indus de cei doi acizi este cauzat de constantele diferite de disociere. Acidul acetic (pKa 4,74) are o valoare a constantei de disociere mai mare decât pKa de acid lactic (pKa 3,86).
20. După 48 de ore de fermentație se observă atât formarea alcoolului etilic cât și consumul zahărului din mediul de fermentație, iar aceasta prezintă o evoluție care poate fi descrisă de ecuațiile polinomiale de ordinul 3, care prezintă coeficienți de corelație foarte buni.
21. Productivitatea maximă de obținere a etanolului a fost de 2,33 g/L.h atunci când s-a utilizat drojdia D1, după 36 de ore de fermentare, urmată de D2 (2,1 g/L.h), D4 (1,8 g/L.h), D5 (1,56 g/L.h) și D3 (1,46 g/L.h).
22. Prolungirea suplimentară a timpului de fermentare induce o scădere a productivității în etanol.
23. Pentru stabilirea duratei optime a procesului de fermentare trebuie să fie luate în considerare toate aspectele atât din punct de vedere tehnic cât și economic.
24. La nivel industrial procesul de fermentație are loc în trei etape distincte și anume: faza de multiplicare a drojdiei (temperatura de 30 - 32 °C timp de 12 ore); faza de prefermentare (temperatura de 30 - 32 °C timp de 24 ore) și faza de fermentare (temperatura de 30 - 32 °C timp de 48 ore).
25. În timpul fermentării în plamadă pot apare contaminări cu bacterii acetice sau bacterii lactice provenite de la materia primă sau cauzată de lipsa de igienă din fabrică.
26. În cazul apariției contaminării în liniile de fermentare, se apelează la administrarea de antibiotice (exemplu Penicilina G potasium), în doza de 0,5-1,5 g/m³.
27. Melasa materie primă conține substanțe coloidale de natură proteică, pectică, melanoidinică, cât și unele produse de metabolism ale microorganismelor de contaminare, care produc o spumă abundentă în linul de fermentare, în această situație apelându-se la adăosul de acizi grași rezultăți în urma procesului tehnologic de rafinare a uleiurilor, în doza de ~0,05 - 0,2 kg/m³ plamadă.
28. Comparând calitatea alcoolului etilic obținut cu cele 3 instalații prin dozarea compuşilor volatili se constată că prin utilizarea instalației continue cu 5 coloane calitatea alcoolului etilic este foarte bună, compuşii volatili înregistrând valori extrem de mici.
29. În urma rafinării alcoolului tehnic obținut la cele 3 instalații se observă că alcoolul rafinat obținut de la instalația continuă cu 5 coloane prezintă caracteristici de calitate superioare celorlalte probe rafinate cu celelalte două echipamente.
30. Procentul de alcool tehnic rezultat în urma rafinării a fost mai mic în cazul instalației continue cu 5 coloane de numai 1,4% comparativ cu 3,8% în cazul instalației continue cu 4 coloane și de 7,2% în cazul instalației discontinue de distilare.
31. Consumul de abur a fost cel mai redus în cazul instalației continue cu 5 coloane, costul aburului pe hectolitru de alcool pur fiind de 15,37 lei/100 L.aa.
32. Consumurile specifice de melasă, respectiv zaharoză au prezentat valorile cele mai mici în cazul instalației continue cu 5 coloane.
33. Prin utilizarea instalației continue cu 5 coloane randamentul practic de obținere a etanolului a fost de 62,46%, ceea ce reprezintă de fapt 92,2% din randamentul teoretic.
34. Beneficiile obținute prin vânzarea alcoolului etilic sunt superioare în cazul instalației de distilare rafinare continuă cu 5 coloane, instalație pe care se pot obține costuri de producție mai mici, iar calitatea foarte bună a acestui alcool permite obținerea unui preț mai mare la comercializare.

6. Contribuții și perspective de continuare a cercetărilor

Producerea alcoolului etilic alimentar este un domeniu de activitate cu o vechime considerabilă. În permanență specialiștii s-au străduit să aducă contribuții noi la îmbunătățirea calității bioetanolului și la scăderea costurilor de producție.

Astfel, având în vedere aceste două obiective, pe parcursul studiului s-au realizat studii asupra modului de transformare a glucozei în bioetanol în funcție de condițiile de temperatură, a valorilor de pH, asigurarea mediului de fermentare, tulpinii de drojdie utilizate, calitatea nutrienților folosiți și cel mai important, monitorizarea procesului tehnologic pe o instalație automatizată, controlată pe calculator, cu o producție zilnică de 30000 litri alcool etilic alimentar.

Originalitatea cercetărilor efectuate, în conformitate cu obiectivele științifice ale tezei de doctorat, se concretizează printr-o serie de elemente de noutate, care sporesc valoarea științifică a studiilor realizate.

În baza rezultatelor experimentale originale obținute în teză se pot evidenția drept contribuții științifice și practice următoarele:

→ S-a studiat influența a cinci tulpini de drojdie asupra randamentului de obținere a alcoolului etilic din melasă cât și asupra compoziției plămezelor fermentate.

→ A fost evaluat comportamentul celor cinci tulpini de drojdie în condiții aerobe de cultivare.

→ S-au studiat factorii care influențează cinetica de fermentație alcoolică în condiții de laborator și la nivel industrial la S.C. Eurovipo S.A., Ploiești, România, în condițiile în care fermentarea s-a efectuat în recipiente de

Rezumatul tezei de doctorat

400 m³, avându-se în vedere asigurarea unei corecte demarări și ulterior a unei corecte desfășurări a fermentației alcoolice, asigurând în același timp și ceilalți factori de mediu la parametri optimi.

→ S-a elaborat și verificat un model matematic pătratic care descrie formarea etanolului sub efectul corelat al factorilor temperatură și pH.

→ Au fost determinați parametri cinetici de fermentare pentru toate cele cinci tulpini de drojdii utilizate la fermentare.

→ S-a studiat influența utilităților de distilare-rafinare asupra randamentului în alcool și calității acestuia. S-a insistat mult pe monitorizarea procesului de distilare-rafinare pentru a găsi formula cea mai bună de separare a compușilor volatili nonalcool de alcoolul etilic, în așa fel încât calitatea bioetanoliului să fie foarte bună, iar procentul de alcool tehnic rezultat să fie cât mai mic.

În acest fel s-au relevat randamente practice de obținere a alcoolului etilic foarte bune, lucru care se reflectă într-o eficiență economică ridicată.

Toate acestea au fost posibile datorită existenței unei instalații moderne, automatizată în proporție de 90%, datorită dotării corespunzătoare a laboratorului fabricii și nu în ultimul rând a calificării superioare a personalului.

Pe parcursul elaborării tezei de doctorat rezultatele obținute au fost comunicate la diverse manifestări științifice și publicate.

Originalitatea studiilor realizate constă în evaluarea și monitorizarea tuturor factorilor care influențează direct randamentul în bioetanol și calitatea bioetanoliului obținut din melasă.

Rezultatele cercetărilor experimentale obținute pot constitui o bază de date științifice, care pot fi punctul de plecare în vederea continuării cercetărilor cu privire la îmbunătățirea randamentului în alcool și a calității alcoolului etilic rafinat obținut din melasă.

Dar, după cum se știe, orice lucrare nu poate oferi totul, aceasta fiind doar o secveță a unui studiu care poate continua.

7. Concretizarea rezultatelor obținute în urma cercetărilor pe tematica tezei de doctorat

Articole/studii publicate în reviste din țară recunoscute de CNCSIS

[1] Patrascu E., Rapeanu G., Bonciu C., Hopulele T., 2010, Comparative study of the multiplication and fermentation yields by using different *Saccharomyces* yeast strains to ethanol production, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 15(3), 289-293.

[2] Patrascu E., Rapeanu G., Bonciu C., Hopulele T., 2009, Bioethanol production from molasses by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology*, ISSN 1843 - 5157, New Series, Year III (XXXIII), 2009, p 50–57, [Anale 2009/vol 2/Full paper E.Patrascu.pdf](#)

[3] Patrascu E., Răpeanu G., Bonciu C., Vicol C., Bahrim G., 2009, Investigation of yeast performances in the fermentation of beet and cane molasses to ethanol production, *Ovidius University Annals of Chemistry*, Volume 20, Number 2, pp.199-204.

Articole publicate în reviste indexate în baze de date internaționale BDI

[4] Patrascu E., Rapeanu G., Hopulele T., 2009, Current approaches to efficient biotechnological production of ethanol, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 1, 1-11.

Participari la manifestări științifice internaționale

[5] Pătrașcu E., Răpeanu G., Bujancea M., Vicol C., Bahrim G., 2009, Investigation of yeast performances during the fermentation of beet molasses, *International Conference CHIMIA 2009 "New trends in applied chemistry"*, May 13-16, Constanta, Romania.

[6] Patrascu E., Rapeanu G., Bonciu C., Hopulele T., 2009, Bioethanol production from molasses by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *International Symposium Euro – aliment 2009, Challenges for Food Science and Food Industry in the Recession Era*, 9-10 octombrie 2009, Galati, Romania.

Bibliografie selectivă

Acevedo A., Godoy R., Bolanos G., 2003, Increase in ethanol production during fermentation of molasses using the enzymatic complex Rhyzozyme. In: XXII Congreso Colombiano de Ingeniería Química, Bucaramanga, Colombia.

Alan E., 2008, Irrigation management of sugar beets Government of Alberta: Rural and Agricultural Development, Irrigation Branch.

Aldiguiet A.S., Alfenor S., Cameleys X., Goma G., Uribealdea J.L., Guillouet S.E., 2004, Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production, *Bioprocess. Eng.*, 28, 217-22.

Ameida C., 2007, Sugarcane ethanol: Brazil's biofuel success. Science and Development Network. Available on the World Wide Web at <http://www.scidev.net>

Arapoglou D., Varzakas Th., Vlyssides A., Israelides C., 2010, Ethanol production from potato peel waste (PPW), *Waste Management*, 30(10), 1898-1902.

Araque E., Parra C., Rodriguez M., Freer J., Baeza J., 2008, Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production, *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 120–123.

Arsilan Y., Eken-Saraçoğlu N., 2010, Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol, *Bioresource Technology*, 101(22), 8664-8670.

Asadi M., 2007. *Beet-Sugar Handbook*. 1st Edn., John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Rezumatul tezei de doctorat

- Avd A., Dönmez S., 2006. Effect of zinc on ethanol production by two *Thermoanaerobacter* strains. *Process Biochemistry*, 41(4), 984-989.
- Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89-105.
- Bai F.W., Chen L.J., Zhang Z., Anderson W.A., Moo-Young M., 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J. Biotechnol.*, 110, 287-293.
- Sanat I., Nigam P., Singh D., Marchant R., Mc Hale A., 1998. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. *World J Microbiol Biotechnol.*, 14, 809-812.
- Banu C., și colab., 2006. *Bioalcoolul-combustibilul viitorului*, Editura Agr. București.
- Baptista C.M.S.G., Côtas J.M.A., Oliveira A.C.M., Oliveira N.M.C., Rocha J.M.S., Dempsey M.J., Lannigan K.C., Beason P.S., 2006. Natural immobilisation of microorganisms for continuous ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1), 127-131.
- Berry D.B., Gasch A.P., 2008. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 4580-4587.
- Bordet și colab., 2007. *Controlul calității în industria panificației, metode de analiză*, Ed. Academică, Galați.
- Borzani W., Vairo M.L.R., Koshimizu L.H., De Melo Cruz M.R., Perego L. Jr., 1981. Kinetics of amyli alcohol production during ethanol fermentation of blackstrap molasses. *Biomass*, 1(2), 115-126.
- Bohast, R.J., Schlicher, M.A., 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 19-25.
- Briggs D.E., Boulton C.A., Brookes P.A., Stevens R., 2004. *Brewing science and practice*, Woodhead publishing limited, Cambridge England.
- Cáceres-Farfán M., Lappe P., Larque-Saavedra A., Magdub-Méndez A., Barahona-Pérez L., 2008. Ethanol production from pineapple (*Agave furcoides* Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts. *Bioresource Technology*, 98(18), 9036-9039.
- Cakar Z., Seker U., Tamerler C., Sönderogger M., Sauer U., 2005. Evolutionary engineering of multi-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 5, 569-78.
- Cardona C.A., Sánchez Ó.J., 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98(12), 2415-2457.
- Carrascosa A.V., 2006. Production of ethanol under high osmotic pressure conditions comprises a microorganism with tolerance to molasses must. Patent ES2257206.
- Cazetta M.L., Celligoi M.A.P.C., Buzzato J.B., Scardino I.S., 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effect of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*, 98(15), 2524-2528.
- Chandrasena G., Walker G.M., 1997. Use of response surface to investigate metal ion interaction in yeast fermentation. *J. Appl. Ind. Microbiol. Chem.*, 55, 24-29.
- Chapple C., Ladisch M., Meilan R., 2007. Loosening lignin's grip on biofuel production. *Nature Biotechnology*, 25, 745-747.
- Chatterjee M.T., Khalilwan S.A., Curran B.P.G., 2000. Cellular lipid composition influences stress tolerance of the yeast *Pichia stipitis*: response element (STRE). *Microbiology* 145, 844-857.
- Cheng K-K, Wang W., Zhang J-A., Zhao Q., Liu P., Xue J-W., 2010. Statistical optimization of simultaneous saccharification and high concentration ethanol production. *Bioresource Technology*, in Press.
- Coll M., Lorel M.O., François J., Benbadou L., 2007. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in a serially diluted fermenter for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Res.*, 7, 22-32.
- Dan V., 2001. *Microbiologia alimentelor*. Editura Alma Galati.
- Ensinas A.V., Nabra S.A., Lozano M.A., Serra L.M., 2007. Analysis of process steam demand reduction and electricity generation in sugar and ethanol production from sugarcane. *Energy Conversion and Management*, 48, 2574.
- EPA. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. U.S. Department of Energy. 2010. *Fuel economy guide: 2010 model year*.
- Eriksson G., Kjellström B., 2010. Assessment of combined heat and power (CHP) integrated with wood-based ethanol production. *Applied Energy*, 87(12), 3632-3641.
- Ge L., Wang P., Mou H., 2011. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renewable Energy*, 36(1), 84-89.
- Ghorbani F., Younesi H., San A.E., Najafpour G., 2011. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 36(2), 503-509.
- Guo Y., Shan-ying Hu, You-run Li, Ding-jiang Chen, Bing Zhu, Karl M. Smith, 2010. Optimization and analysis of a bioethanol agro-industrial system from sweet sorghum. *Renewable Energy*, 35(12), 2902-2909.
- Gupta R., Shama K., Kuhad R., 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technology*, 100(3), 1214-1220.
- Hansen J., Sato M., Ruedy R., Lo K., Lea D., Medina-Elizade M., 2006. Global temperature change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14288. doi:10.1073.
- Hamison J.A.P.D., 2003. The carbon cycle: What goes around comes around. *Visionlearning*, EAS-2(3), 4/8/10.
- Harano K., Kikuchi S., Nakamura Y., Sakamoto H., Takigami M., Kojima Y., 2009. Novel strategy using an adsorbent-column chromatography for effective ethanol production from sugarcane or sugar beet molasses. *Bioresource Technology*, 100(20), 4697-4703.
- Jamal L., Sendike K., Ettayebi You K.M., Rosenfield C.L., Knipple D.C., 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol.*, 69(1), 499-503.
- Jimenez A.M., Borja R., Marin A., 2004. A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion of untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* in batch reactors. *Biochem. Eng. J.* 18, 121-132.
- Jones R.P., Greenfield P.F., 1981. Batch ethanol fermentation with dual organisms. *Biotechnol. Lett.* 3, 325-332.
- Jones R.P., Pamment N., Greenfield P.F., 1981. Alcohol fermentation by yeast: the effect of environment. *Proc. Biochem.* 16, 42-48.
- Kwiatkowski J.R., McAlonan A.J., Taylor F., Johnston D.B., 2006. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products*, 23, 288-296.
- Ladisch M.R., Dyck K., 1979. Dehydration of ethanol: New approach gives positive balance. *Science*, 205(4409), 898.
- Larsson S., Cassland, P., Jönsson, L.J., 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1163-1170.
- Lawrence, C.L., Botting, C.H., Antrobus, R., Conte, P.J., 2004. Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol (HOG) mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: Regulating adaptation to citric acid stress. *Mol. Cell Biol.* 24, 3307-3323.
- Lei, J.J., Zhao, X.Q., Ge, X.M., Bai, F.W., 2007. Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast flocc populations with different size distribution. *J. Biotechnol.* 131, 270-275.
- Liu C-Z., Feng W., Fan O-Y., 2009. Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. *Bioresource Technology*, 100, 878-882.

Rezumatul tezei de doctorat

- Liu S., Qureshi N., 2009. How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*, 26(3-4), 117-121.
- Liu, Z.L., 2006. Genomic adaptation of ethanologenic yeasts to biomass conversion inhibitors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 27-38.
- Lodish H., Baltimore D., Dameli J., 2003. *Molecular Cell Biology – Scientific American Books Inc.*
- Lopez-Ulibarri, R., Hall, G.M. (1997) Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 398-404.
- Maddox, I.S., Hough, J.S., 1970. Effect of zinc and cobalt on yeast growth and fermentation. *J. Inst. Brew.* 76, 262-264.
- Maiorella B., Blanch W.H., Wilke C.R., 1983. By-product inhibition effect on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 103-121.
- Maiorella B., Blanch W.H., Wilke C.R., 1984. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1155-1166.
- Maiorella, B., Wilke, C.R., Blanch, W.H., 1981. Alcohol production and recovery. *Adv. Biochem. Eng.* 20, 43.
- Matherbe S, Fromion V, Hilgert N, Sablayrolles JM., 2004. Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. *Biotechnol Bioeng* 2004,86(3): 261-72.
- Mathewson S.W., 1980. *The manual for the home and farm production of alcohol fuel.*
- Maye, J.P. (2006) Use of hop acids in fuel ethanol production. Patent US2006263484.
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.*, 31 426-428.
- Mohagheghi, A., Ruth, M., Schell, D.J., 2006. Conditioning hemicelluloses hydrolysates for fermentation: effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochem.* 41, 1806-1811.
- Oghonna J.C., Mashima H., Tanaka H., 2001. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology*, 76(1), 1-8.
- Olguin E.J., Doelfel H.W., Mercado G., 1995. Resource recovery through recycling of sugar processing by-products and residuals. *Resources, Conservation and Recycling*, 15(2), 85-94.
- Palmqvist E., Grage H., Meinander N.Q., Hahn-Hagerdal B., 1999. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng* 63, 48-55.
- Peng H., Wu G., Shao W., 2008. The aldehyde/alcohol dehydrogenase (AdhE) in relation to the ethanol formation in *Thermoaerobacter ethanolicus* JW200. *Anaerobe*, 14(2), 125-127.
- Pimentel D., Patzek T.W., 2005. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*, 14(1), 65-76.
- Piskur J., Rozpedowska E., Polakova S., Merico A., Compagno C., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, 22(4), 183-188.
- Pronk J.T., Steensma H.Y., Van Dijken J.P., 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1607-1633.
- Quintero J.A., Montoya M.I., Sanchez O.J., Giraldo O.H., Cardona C.A., 2008. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: Comparative analysis for a Colombian case. *Energy*, 33, 385.
- Rajoka M., Khalid A., Ferhan M., 2005. Kinetic and thermodynamics of ethanol production by a thermotolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett Appl Microbiol.* 40, 316-21.
- Rikhtivanov E., Varakina N., Rusaleva T., Rachenko E., Kiseleva V., Voinikov V., 2001. Heat shock-induced changes in the respiration of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 70, 462-465.
- Robertson, G.H., Wong, D.W.S., Lee, C.C., Wagschal, K., Smith, M.R., Orts, W.J. (2008) Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient bio-refining of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 353-365.
- Roehr M., 2001. *The Biotechnology of Ethanol, Classical and Future Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, New York.
- Rojan P., John, G.S. Anisha, K. Madhavan Nampoothiri, Ashok Pandey, 2011, Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102(1), 188-193.
- Santos, J., Sousa, M.J., Cardoso, H., Inácio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., Leão, C. (2008) Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology*, 154, 422-430.
- Shapouri H., Duffield J.A., Wang M., 2002. *The Energy Balance of Corn Ethanol: An Update*. United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Economic Report Number 813.
- Shigechi, H., Fujita, Y., Koh, J., Ueda, M., Fukuda, H., Kondo, A. (2004) Energy-saving direct ethanol production from low-temperature cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and alpha-amylase. *Biochemical Engineering Journal*, 18, 149-153.
- Siqueira P.F., Karp S.G., Carvalho J.C., Sturm W., Rodriguez-León J. A., Tholozan J.-L., Singhania R.R., Pandey A., Soccol C.R., 2008. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, 99, 8156-8163.
- Spencer, J., Spencer, D.M., 1990. *Yeast technology*, Springer – Verlag, Berlin.
- Sreenath, H.K., Jeffries, T.W., 2000. Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. *Biores. Technol.* 72, 253-260.
- Suutari K., Luukkonen K., Laakso S., 1990. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J General Microbiol.*, 136:1469-74.
- Swain M.R., Kar S., Sahoo A.K., Ray R.C., 2007. Ethanol fermentation of mahua flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*, 162(2), 93-98.
- Taherzadeh M.J., Niklasson C., Liden G., 1997. Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? *Chem Eng Sci*, 52, 2653-2659.
- Thaipanama, R., Rohani, S., Hill, G.A., 1992. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 289-297.
- Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M., 1996. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. *Process Biochemistry*, 31(4), 321-331.
- Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M., 2002. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl Environ Microbiol.* 68, 1616-1623.
- Tortia M.J., Rozes N., Poblet M., Guillamon J.M., Mas A., 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80 (2003) 47-53.
- Vitolo, M., Carvalho J.C.M., Duranti M.A., Breda M., 1991. Invertase activity of intact yeast cells harvested from fed-batch ethanol fermentation of sugarcane cane wackstrap molasses. *Biomass and Bioenergy*, 1(5), 301-304.
- Wates M.J., Morgan N.L., Rockey J.S., Highton G., 2001. *Industrial microbiology – an introduction*, Blackwell Science.
- Wankat P.C., 2006. *Separation process engineering (2nd ed.)* Prentice Hall.

205224