

Tekniikan kandidaatintyö

**Sakkaroosikonsentraation vaikutus etanolin
tuotantoon fermentoinnilla**

Lappeenranta 2017

Niko Pullinen

TIIVISTELMÄ

Lappeenrannan teknillinen yliopisto

School of Engineering Science

Kemiantekniikka

Niko Pullinen

Sakkaroosikonsentraation vaikutus etanolin tuotantoon fermentoinnilla

Kandidaatintyö

Kevät 2017

29 sivua, 10 kuvaa, 4 taulukkoa ja 1 liite

Työn tarkastaja: Analyysi-insinööri, TkT Liisa Puro

Hakusanat: fermentointi, hiiva, etanoli, sakkaroosi

Työn tavoitteena on selvittää, kuinka sakkaroosin fermentointiprosessiin *Saccharomyces cerevisiae* -hiivalla voidaan vaikuttaa sakkaroosikonsentraatiolla. Kirjallisessa osuudessa selvitetään fermentoinnin mekaniikkaa, sekä sitä miten eri ympäristötekijät vaikuttavat hiivan kykyyn tuottaa etanolia. Kokeellisessa osuudessa selvitetään, kuinka käytetty sakkaroosin lähtökonsentraatio vaikuttaa fermentointiin. Kokeellisen osan tulokset on esitetty etanolin konsentraatioina eri ajanhetkillä. Lisäksi on tutkittu metanolin ja etikkahapon mahdollista esiintymistä liuoksista. Metanolia ja etikkahappoa ei kuitenkaan muodostunut liuoksiin tarpeeksi suuria määriä, jotta ne olisi ollut mitattavissa käytetyllä kalibrointivälillä. Kalibrintiliuokset olivat välillä 1,25 mg/g ja 125,0 mg/g. Mittaukset on suoritettu kaasukromatografilla. Lisäksi on tutkittu pH:n muutosta fermentoinnin aikana.

Tuloksista huomataan, että optimaalinen sakkaroosikonsentraatio löytyy 6,79 kg/(25 l) lähettyviltä, sillä tällä pitoisuudella saavutettiin suurin etanolipitoisuus näissä koeolosuhteissa. Sakkaroosi tulisi myös lisätä useammassa osassa, jotta liian suuri sakkaroosikonsentraatio ei inhiboi fermentointia alussa. Kun liuosta on fermentoitu noin 300 tuntia 25 – 30 °C:n lämpötilassa, on se saavuttanut lähes maksimietanolipitoisuutensa. Lisäksi huomataan, että pH laskee fermentoinnin aikana. pH:n alenema voi johtua fermentoinnissa syntyneistä sivutuotteista, kuten sukkiinihaposta, joita ei tässä kokeessa ole mitattu.

ABSTRACT

Lappeenranta teknillinen yliopisto

School of Engineering Science

Chemical Engineering

Niko Pullinen

Effect of sucrose concentration on ethanol production with fermentation

Bachelor's thesis

Spring 2017

29 pages, 10 pictures, 4 tables and 1 appendix

Inspector of the thesis: Analysis Engineer D. Sc. (Tech) Liisa Puro

Keywords: fermentation, yeast, ethanol, sucrose

The objective of this work is to investigate how it is possible to affect fermentation done with *Saccharomyces cerevisiae* yeast by changing sucrose concentration. Literature part covers the most essential mechanics of yeast fermentation and how conditions of environment affects yeasts capability to produce ethanol. In experimental part it is researched how different starting sucrose concentrations affects fermentation. The results are presented as ethanol concentrations in different points of time. Ethanol, methanol and acetic acid concentrations were measured with gas chromatograph. Also changes of pH are measured throughout fermentation.

Results doesn't show measurable amounts of methanol or acetic acid, even though calibration solutions were between 1,25 mg/g and 125,0 mg/g. Based on the results it can be interpreted that best starting concentration of sucrose for the solution is near of 6,79 kg/(25 l), because this starting concentration yielded highest ethanol concentration in these experiment conditions.

It would improve fermentation if some of the sucrose is added during fermentation. This is because if the sucrose concentration is too high, it will inhibit fermentation during first days of fermentation. It takes about 300 hours to reach almost maximum ethanol concentration in 25 – 30 °C temperature. It is also noticed that pH decreased during fermentation. Drop of pH can be result of side products that formed during fermentation.

Sisällysluettelo

KIRJALLISUUSOSA

1. Johdanto	5
2. Fermentointi	5
3. Hiiva.....	9
4. Hiivan metabolia	12
4.1 Aerobinen metabolia	12
4.2 Anaerobinen metabolia	13
5. Panosfermentointi	13
6. Inhibitio	13
6.1 Ravinnonlähde.....	14
7. Fermentointiin vaikuttavat tekijät	14
7.1 pH:n vaikutus fermentointiin	14
7.2 Lämpötilan vaikutus fermentointiin	15
7.3 Hiilenlähteen vaikutus fermentointiin.....	16
7.4 Hapen määrän vaikutus fermentointiin.....	16
8. Koejärjestelyt	17
8.1 Alkujärjestelyt.....	17
9. Analyysit	19
9.1 Laitteisto	19
9.2 Kalibrointi.....	19
9.3 Näytteiden ottaminen	21
10. Tulokset	22
10.1 Anaerobinen fermentointi	22
10.2 Aerobinen fermentointi.....	24
10.3 pH:n muutos.....	25
11. Virhearviot	26
12. Johtopäätökset.....	27
Lähteet	27

LIITTEET

KIRJALLISUUSOSA

1. Johdanto

Etanolia on tuotettu hiivalla, fermentoimalla sokereita, kautta aikain. Jo muinaiset roomalaiset valmistivat viiniä fermentoimalla rypäleiden mehua. Yhä tänäkin päivänä monet opiskelijat valmistavat etanolijuomia kotonaan fermentoimalla. Tarkoituksena oli löytää optimaalinen sakkaroosin lähtökonsentraatio ja fermentoimisaika, jotta lopputuotteeseen saataisiin mahdollisimman korkea etanolipitoisuus mahdollisimman vähässä ajassa. Myös sivutuotteiden osuus haluttiin pysyvän mahdollisimman vähäisenä.

Työ koostuu kirjallisesta osasta, jossa käsitellään monia fermentointiin liittyviä mekanismeja, kuten glykolyysi, hiivan metaboliareitit ja hiilenlähteen vaikutus. Työssä oli myös kokeellinen osio, jonka tarkoituksena oli tutkia, kuinka etanolin tuotantoon voidaan vaikuttaa käytetyllä sakkaroosikonsentraatiolla fermentoinnissa. Käytettyjä sakkaroosikonsentraatioita oli viisi: 2,91 kg/(25 l), 4,85, kg/(25 l), 6,79 kg/(25 l), 8,70 kg/(25 l) ja 10,63 kg/(25 l). Näiden liuosten etanolipitoisuutta mitattiin viitenä eri ajanhetkenä. Samalla mitattiin metanoli- ja etikkahappopitoisuutta liuoksissa. Näiden tulosten pohjalta pystyttiin arvioimaan, kuinka fermentointi kannattaa suorittaa kotiolosuhteissa, mikäli lopputuotteessa halutaan saavuttaa mahdollisimman korkea etanolipitoisuus mahdollisimman lyhyessä ajassa.

2. Fermentointi

Fermentoinnilla tarkoitetaan aineenvaihduntatapahtumaa, jossa pilkotaan orgaanista materiaalia anaerobisissa (hapettomissa) olosuhteissa glukoosia tai muita orgaanisia aineita mikrobin energiaksi (Nelson, Cox et al. 2008). Tässä työssä keskitytään vain sokerien fermentointiin hiivalla ja jätetään maitohappofermentointi ja muut alkoholifermentoinnit käsittelemättä.

Mikrobeihin kuuluvista bakteereista ja sienistä, kuten hiivat, osa tuottavat aineenvaihdunnassaan etanolia (Lin, Tanaka 2006). Mikrobit hajottavat sokerin entsyymiensä avulla pyruvaatiksi. Tätä reaktiota kutsutaan glykolyysiksi, joka tunnetaan

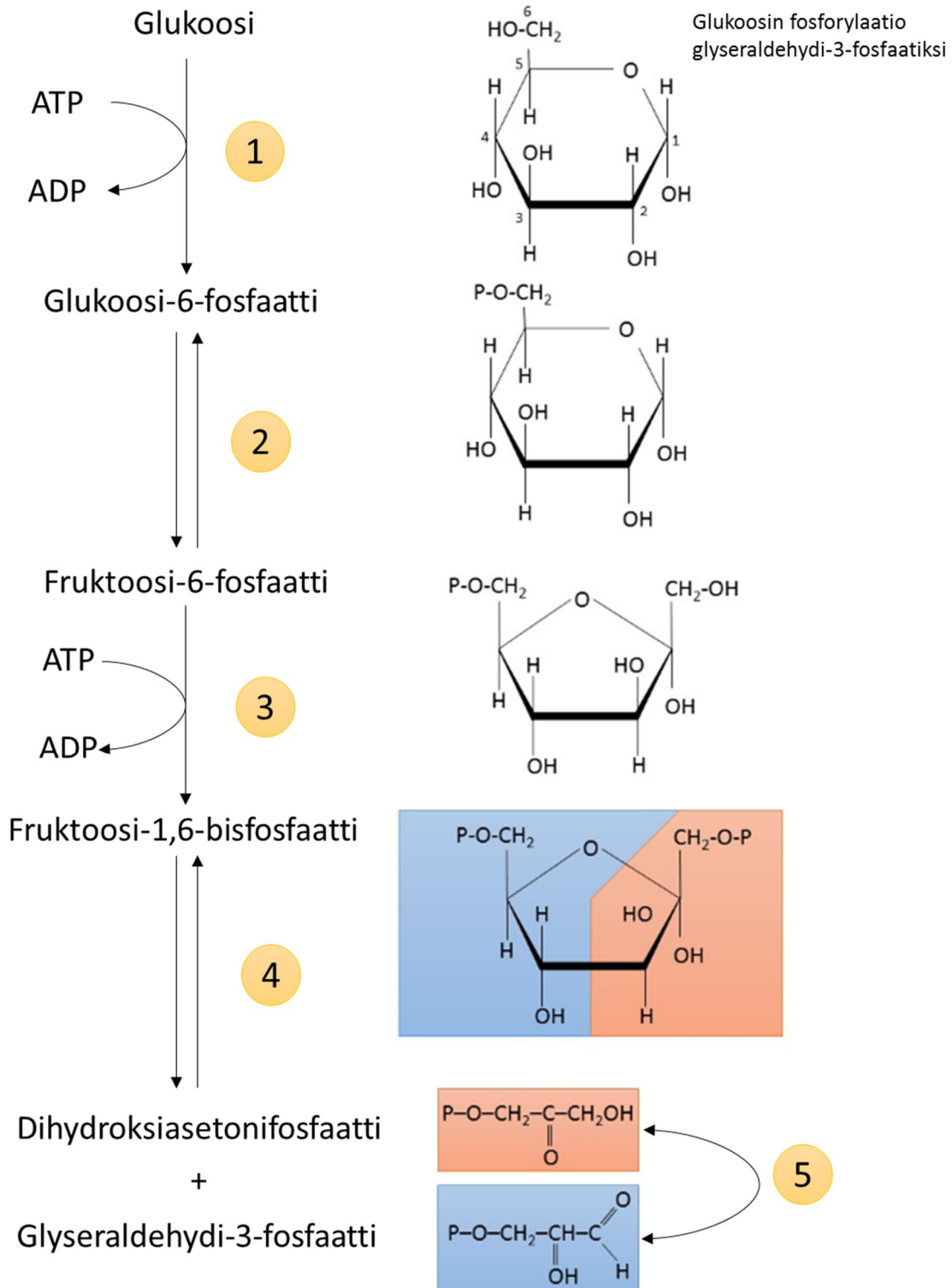
myös Embden-Meyerhof-Parnas-reittinä (EMP-reitti) (Peretó 2011). Tämän jälkeen pyruvaatti hajoaa asetaldehydiksi ja hiilidioksidiksi. Asetaldehydin pelkistyessä muodostuu etanolia.

Glykolyysi koostuu kymmenestä vaiheesta, joista vaiheet 1-5 ovat valmisteluvaiheita ja vaiheiden 6-10 organismi tuottaa itselleen energiaa. Vaiheet on esitetty alla, mitä missäkin vaiheessa tapahtuu. Lisäksi kuvassa 1 on esitetty vaiheet 1-5 ja kuvassa 2 vaiheet 6-10. Reaktioyhtälöissä ja kuvissa "P" tarkoittaa fosfaattiryhmää.

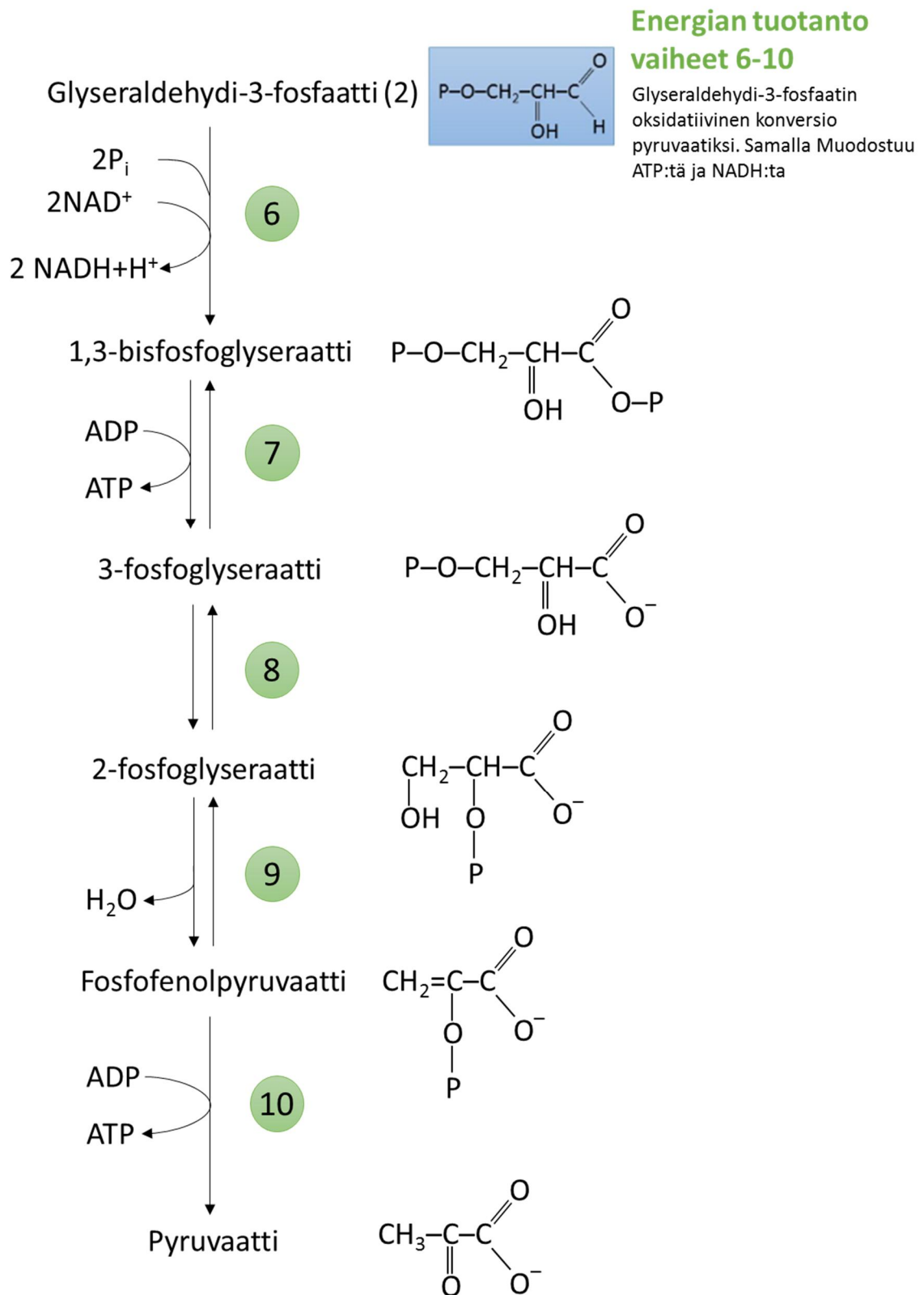
1. ATP:ltä (adenosiinitrifosfaatti) liitetään fosfaattiryhmä glukoosiin heksokinaasin avulla → glukoosi-6-fosfaatti, ohessa $ATP \rightarrow ADP$ (adenosiinidifosfaatti)
2. Fosfoheksoosi-isomeerasin avulla muutetaan glukoosi-6-fosfaatti → fruktoosi-6-fosfaatiksi
3. ATP:n avulla fosforyloidaan fruktoosi-6-fosfaatti. Katalyyttinä toimii fosfofruktokinaasi-1 → fruktoosi-1,6-bisfosfaatti, ohessa $ATP \rightarrow ADP$
4. Aldolaasin avulla muunnetaan fruktoosi-1,6-bisfosfaatti → glyseraldehydi-3-fosfaatti ja dihydroksiasetonifosfaatti.
5. Trioosifosfaatti-isomeerasi katalysoi dihydroksiasetonifosfaatin isomerisaatiota → glyseraldehydi-3-fosfaatti
6. Kaksi glyseraldehydi-3-fosfaattia hapetetaan ja fosforyloidaan glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin avulla → kaksi 1,3-bisfosfoglyseraattia, ohessa $2NAD^+$ (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi) → $2NADH + H^+$.
7. Defosforyloidaan 1,3-bisfosfoglyseraatti fosfoglyseraattikinaasin avulla → 3-fosfoglyseraatti, ohessa $ADP \rightarrow ATP$
8. Fosfoglyseraattimutaasin avulla muutetaan 3-fosfoglyseraatti → 2-fosfoglyseraatti.
9. Enolaasin avulla muutetaan 2-fosfoglyseraatti → fosfoenolipyruvaatiksi, ohessa poistuu H_2O .
10. Pyruvaattikinaasin avulla defosforyloidaan fosfoenolipyruvaatti → pyruvaatti, ohessa $ADP \rightarrow ATP$

(Nelson, Cox et al. 2008).

Valmisteluvaiheet 1-5



Kuva 1 Glykolyysin valmisteluvaiheet (Nelson, Cox et al. 2008).

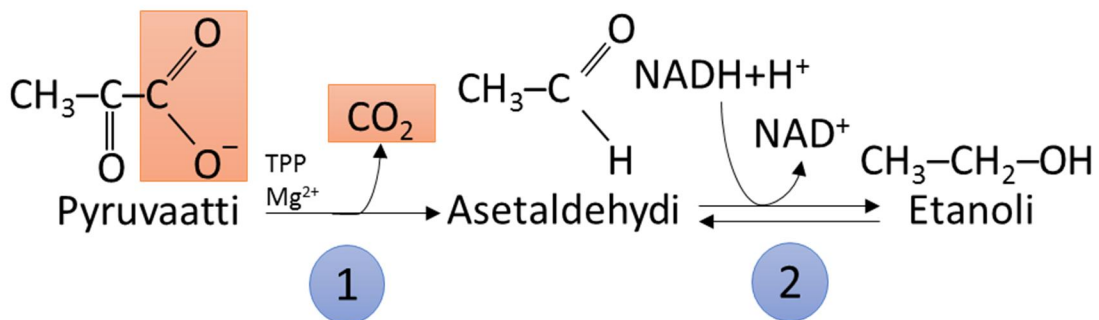


Kuva 2 Glykolyysin energiaa tuottavat vaiheet (Nelson, Cox et al. 2008).

Kun organismi on muodostanut glykolyysin avulla glukoosista pyruvaattia, muuntuu sitruunahappokiertoon päätyvätön pyruvaatti etanoliksi alla esitettyjen reaktioiden kautta. Reaktiot on esitetty myös kuvassa 3.

1. Pyruvaatti dekarboksyloituu pyruvaatti dekarboksyylaasin katalysoimana → Asetaldehydi, ohessa muodostuu CO₂

2. Asetaldehydi pelkistetään → Etanoli, ohessa NADH+H⁺ → NAD⁺



Kuva 3 Pyruvaatin muuntuminen hiilidioksidiksi ja etanoliksi (Nelson, Cox et al. 2008).

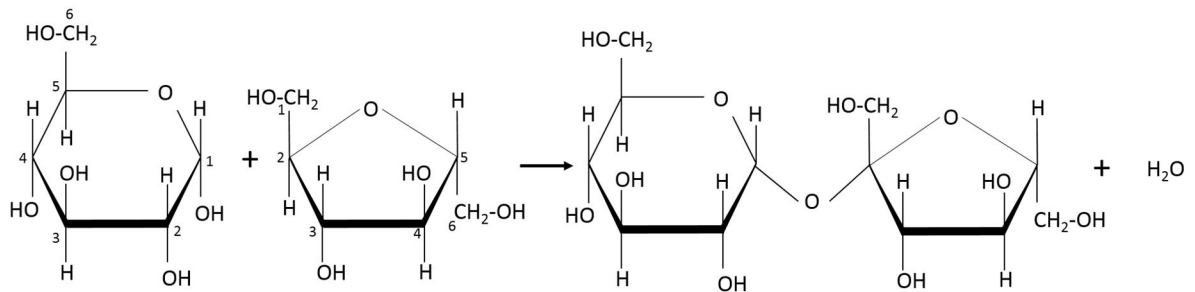
Kokonaisuudessaan glukoosin reaktioyhtälö etanoliksi on yksinkertaistettuna $C_6H_{12}O_6 + 2 ADP + 2P \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2 + 2 ATP$.

Fruktoosin reaktiosarja on muuten sama kuin glukoosin, mutta ensimmäinen ja toinen vaihe korvaantuvat yhdellä reaktiolla, jossa fruktoosi fosforyloidaan fruktokinaasin avulla frukto-6-fosfaatiksi.

3. Hiiva

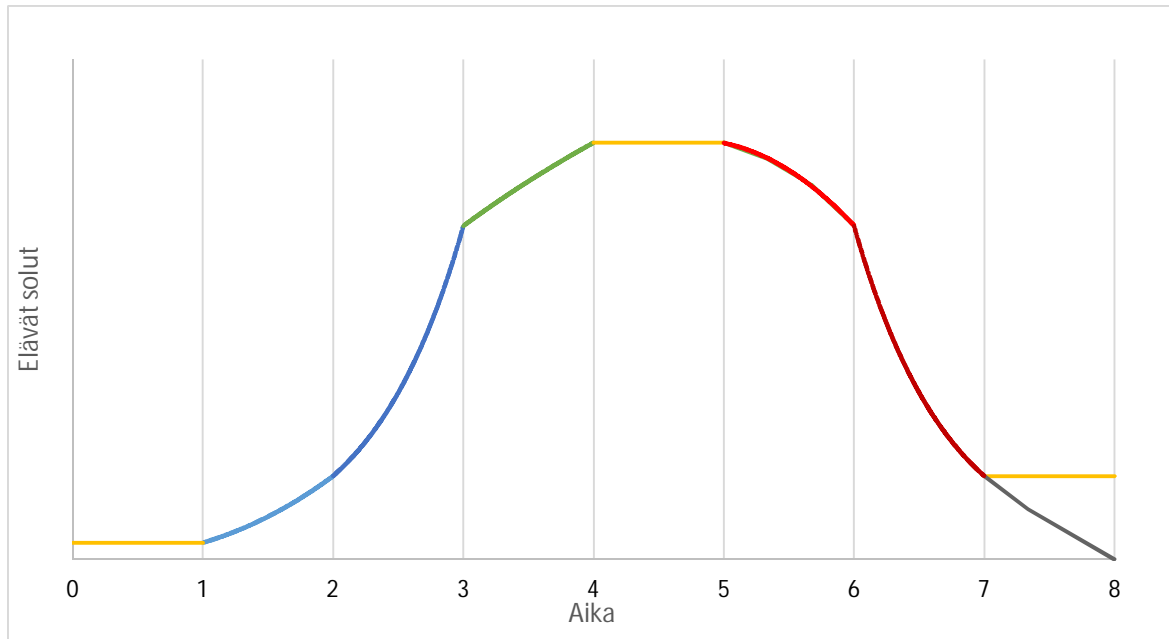
Hiivat ovat yleisimmin käytetyt mikrobit fermentoinnissa. Näistä hiivoista yleisin on *Saccharomyces cerevisiae*, jolla päästään jopa 18 % etanolipitoisuuteen liuoksessa. Kyseinen hiiva kykenee käyttämään ravinnokseen monosakkaridien D-isomeerejä, sekä disakkarideja (Lin, Tanaka 2006) esimerkiksi sakkaroosia. Sakkaroosi muodostuu kahdesta monosakkaridista, glukoosista ja fruktoosista. Sakkaroosissa α-D-glukoosi on yhdistyneenä

glykolisidoksella 1-hiilen hydroksyyli ryhmällään β -D-fruktoosin 2-hiileen. Kuvassa 4 on esitettyinä glukoosin ja fruktoosin yhdistymisreaktio.



Kuva 4 Sakkaroosin muodostuminen ja rakenne.

S. cerevisiae on yleisesti käytetty hiiva leivonnassa sekä etanolin tuotannossa, kuten oluen ja viinin valmistuksessa, sillä kyseinen hiivakanta on todettu turvalliseksi lisäaineeksi ihmisille. (Lin, Tanaka 2006). Fermentoinnin aikana hiivapopulaatio kasvattaa solumassansa. Hiivamäärän muutos panoskasvatuksessa koostuu kahdeksasta vaiheesta: 1. Viipymävaihe 2. Kiihtyvän kasvun vaihe 3. Eksponentiaalisen kasvun vaihe 4. Hidastuvan kasvun vaihe 5. Stationäärivaihe 6. Kiihtyvän kuoleman vaihe 7. Eksponentiaalisen kuoleman vaihe 8. Selviytymis- tai kuolemisvaihe (El-Mansi, Bryce et al. 2007 luku 3). Nämä vaiheet ovat kuvattuna ajanfunktiona kuvassa 5.



Kuva 5 Hiivan elinvaiheet ajan funktiona. Kaavion pystyviivat jakavat kasvukäyrän eri vaiheisiin, jotka on myös merkitty väreillä. 0-1 viipymävaihe, 1-2 kiihtyvän kasvun vaihe, 2-3 eksponentiaalisen kasvun vaihe, 3-4 hidastuvan kasvun vaihe, 4-5 stationäärivaihe, 5-6 kiihtyvän kuoleman vaihe, 6-7 eksponentiaalisen kuoleman vaihe, 7-8 selviytymis- ja kuolemisvaihe (El-Mansi, Bryce et al. 2007 luku 3).

Ensimmäisessä vaiheessa hiiva sopeutuu ympäristöönsä. Tämä tarkoittaa, että hiiva tunnistaa saatavilla olevat ravinneaineet ja valmistaa tarvittavat entsyymit ja proteiinit, joiden avulla kyseiset ravinteet voidaan pilkkoa ja kuljettaa solujen sisälle (Aittomäki et al., 2002 luku 3). Tämän vaiheen aikana solumassan määrä on vakio. Mikäli ympäristössä on useampia hiilenlähteitä, voi viipymävaiheita olla useampia, sillä hiiva käyttää ensin yhden hiilenlähteen loppuun jonka jälkeen sen on sopeuduttava taas uuteen lähteeseen. Tapahtumasta käytetään termiä diauxie-ilmiö. Tämä vaihe voi kestää useita tunteja riippuen muun muassa kasvu ympäristön muutoksen suuruudesta. Koska kaikki hiivasolut eivät ole jakaantumiskykyisiä heti viipymävaiheen jälkeen, tapahtuu eksponentiaaliseen kasvunvaiheeseen siirtyminen kasvavan kasvun vaiheen kautta, jonka aikana saavutetaan maksimaalisen kasvun nopeus. Eksponentiaalisessa vaiheessa solumassan kasvulla ei ole rajoitteita ja kasvu on logaritmista, kuten mikrobien kasvua normaalisti kuvataan. (Aittomäki et al., 2002 luku 2 ja 3). Kasvu siirtyy hidastuvan kasvun vaiheeseen, kun jokin ravinteista loppuu tai jokin tuote alkaa inhiboida kasvua suuren pitoisuutensa vuoksi. (Aittomäki et al., 2002). Inhibitiosta on kerrottu tarkemmin kappaleessa 6. Kun

hiivapopulaatio saavuttaa maksimikokonsa, siirrytään stationäärivaiheeseen (Bailey, Ollis, 1986, luku 7), jonka aikana solumassa pysyy vakiona (El-Mansi, Bryce et al. 2007 luku 3). Kuolemisvaiheen aikana osa soluista hajoaa, jolloin ympäristöön vapautuu ravinteita joita elävät solut voivat käyttää ja kasvaa hitaasti. Kuolemisnopeuteen vaikuttaa hiivan kyky sopeutua ravinnon niukkuuteen. *S. cerevisiae* pystyy sopeutumaan ravinnon vähäisyyteen. Selviytymisvaiheessa solumassan määrä vakioituu ja ympäristössä on tarpeeksi energiaa ylläpitämään elintoiminnot, mutta ei kasvuun. (El-Mansi, Bryce et al. 2007 luku 3). Kuolemisvaiheessa solumassan vähentyminen on yleensä eksponentiaalisesti kasvavaa (Bailey, Ollis, 1986, luku 7). Jotta saavutetaan mahdollisimman suuri fermentointinopeus, tulee viipymävaiheen pituus minimoida ja maksimoida eksponentiaalisen kasvun vaiheen kesto ja nopeus.

4. Hiivan metabolia

S. cerevisiae on fakultatiivinen hiiva. Tämä tarkoittaa, että sen metabolia vaihtelee fermentoinnin ja respiratiivisen välillä. Metabolian vaihteluun vaikuttaa kasvuliuksen happipitoisuus. Mitä enemmän hiivalla on saatavilla happea, sitä voimakkaampaa respiratiivinen metabolia on (Dashko Zhou et al. 2014).

4.1 Aerobinen metabolia

Aerobisella metabolialla tarkoitetaan respiratiivista metaboliaa, jonka aikana hiiva kuluttaa happea ja energianlähteinä toimivat heksoosi- ja pentoosisokerit, alkoholit ja orgaaniset hapot. (Juvonen, Nohynek et al. 2001) Tuotteina syntyy vettä, hiilidioksidia, etanolia ja biomassaa. Mikäli glukoosia on liuoksessa runsaasti, ei kaikki pyruvaatti pääse sitruunahappokiertoon, sillä sitä muodostuu niin paljon. Tällöin pyruvaatista voi muodostua etanolia (El-Mansi, Bryce et al. 2007 luku 3). Mikäli glukoosi on hiivan ainoa hiilenlähde ja hiiva kasvaa panostoimisessa ympäristössä, muodostuu sivutuotteena aina etanolia. Glukoosin loputtua alkaa hiiva käyttää etanolia ravinnokseen (Rieger, Käppeli et al., 1983). Respiratiivinen aineenvaihdunta on hiivalle tehokkaampi tapa tuottaa energiaa verrattuna

fermentatiiviseen. Tämän vuoksi se suosii aerobista reittiä, mikäli happea on liuenneena ympäristöön runsaasti (Tuite, 1991, luku 8).

4.2 Anaerobinen metabolia

Anaerobisella metabolialla tarkoitetaan fermentointia, jolloin hiiva ei kuluta happea. Fermentoinnissa syntyy pääosin etanolia, mutta myös etikkahappoa, sukkiinihappoa sekä glyserolia, jota näistä muodostuu eniten (Aldiguier, Alfenore et al. 2004). Viinifermentoinnin yhteydessä glyserolia voi muodostua jopa 15g/l (Yalcin, Ozbas, 2008). Glykolyysin aikana saatava ATP:sta ei kulu kokonaisuudessaan fermentointiin, vaan osan hiiva käyttää solumassan kasvattamiseen. Tämä on edellytys, että glukoosimetabolia voi toimia ja tuottaa etanolia, sillä muuten glykolyysi inhiboituisi ATP:n akkumuloitumisen seurauksena (Bai, Anderson et al. 2008).

5. Panosfermentointi

Panosfermentoinnissa ajon alussa lisätään kaikki fermentointiin tarvittavat komponentit, mikro-organismi (hiiva), ravinneliuos (sokeri-vesiliuos) sekä mahdolliset lisäravinteet mikrobille (tässä työssä ei käytetty lisäravinteita). Fermentoinnin aikana on mahdollista lisätä happoja tai emäksiä pH:n säätelyyn, ilmaa ja vaahdonestoaineita. Näitä ei tässä työssä kuitenkaan käytetä, lukuun ottamatta mahdollista luonnollisesti tapahtuvaa ilman virtausta fermentoriin. Panosfermentorissa vallitsee dynaamiset olosuhteet, sillä olosuhteet muuttuvat ajan kanssa, kun ravinteet vähenevät hiivan niitä käyttäessä ja tuottaessa sivutuotteita, kuten etanolia.

6. Inhibitio

Inhibitiolla fermentoinnissa tarkoitetaan, kun jokin systeemin komponentti estää hiivaa ottamasta ravintoa mahdollisimman tehokkaasti. Tällaisia komponentteja ovat ravinnonlähde, fermentoinnin lopputuotteet, biomassa (Bai, Anderson et al. 2008) ja

kontaminantit. (Narendranath, Thomas et al. 2001). Näiden komponenttien vaikutus riippuu niiden konsentraatiosta, ympäristön pH:sta ja lämpötilasta. Inhibition esiintymistä voidaan siis hallita säätämällä fermentointiympäristö optimaaliseksi (Almeida, Modig et al. 2007).

6.1 Ravinnonlähde

Ravinnonlähteestä johtuva inhibitio aiheutuu, kun sen konsentraatio ylittää hiivalle ominaisen inhiboimistason. Mitä suurempi konsentraatio on, sitä todennäköisemmin ja voimakkaampana inhibitiota esiintyy (Bai, Anderson et al. 2008). Kun konsentraatio on niin suuri, että se kohdistaa hiivasoluun suurempaa osmoottista painetta kuin solun sisäinen paine, voi hiivan elinvoimaisuus heikentyä. Tällöin liuosta kutsutaan hypertoniseksi. Hypertoninen liuoskonsentraatio on kriittinen piste jonka alapuolella konsentraation kasvaessa etanolin tuotanto kasvaa. Hypertonisella konsentraation tasolla hiivan kasvunopeus vakioituu ja lopulta kasvu voi myös pysähtyä. Hypertoninen liuos vaurioittaa hiivan membraaniin vaurioita heikentäen membraanin nestemäisyyttä ja pienentäen entsyymiaktiivisuutta. Nestemäisyyden heikentyessä hiivasoluun voi kertyä myrkyllisiä metabolian väli- tai lopputuotteita kuten etanolia. Nämä taas aiheuttavat häiriöitä solun toimintaan, kuten metaboliaan. Solu voi myös kuivua. (Zhang, Wu et al., 2015)

7. Fermentointiin vaikuttavat tekijät

Fermentoinnin etenemiseen vaikuttavat ympäristössä vallitsevat olosuhteet, joihin kuuluu lämpötila, pH, hapen määrä ja hiilen lähteen tai lähteiden määrä ja laatu. Näiden tekijöiden vaikutuksia ja aiemmin saatuja tutkimustuloksia käsitellään tässä kappaleessa.

7.1 pH:n vaikutus fermentointiin

Alhaisimmaksi ympäristön pH:ksi, jossa useat *S. cerevisiae* -kannat pystyvät kasvamaan on mitattu 2,8. Optimaalinen pH on 5,0 kun lämpötila on 30 °C. Ympäristön pH:n ollessa 3,0 *S. cerevisiae* –hiivan solunsisäinen pH on lähellä 5,5:ttä (Jiménez-Islas, Pérez-Lerma et al.

2014). pH:n vaikutus solun aktiivisuuteen on riippuvainen siitä, kuinka solun entsyymit sietävät pH-arvon muutoksia (Villadsen, Nielsen et al. 2011, luku 7). Esimerkiksi hiivan elinkykyisyys pH 4,5:ssä voi olla yli 40 % suurempi kuin pH 3,6:ssa (Dorta, Oliva-Neto et al., 2005). Ympäristön pH muutokset 3,5 – 6,0 välisellä alueella eivät vaikuta fermentoinnin aikana solujen kasvuun tai etanolintuottoon. Mikäli ympäristön pH säädetään 4 – 5 välille, vähennetään bakteerikontaminaatoriskiä (Tuite, 1991, luku 8). Hiivan soluissa on sisäisiä mekanismeja, joilla se pystyy ylläpitämään solunsisäistä pH:ta, vaikka ympäristön pH vaihtelisi (Villadsen, Nielsen et al. 2011, luku 7). Tämän vuoksi ympäristön pH:n vaihdelta hiiva kuluttaa energiaa solunsisäisen pH:n säätelyyn, joka voi aiheuttaa reaktionopeuden hidastumista. Solu kuluttaa sitä enemmän ATP:ta, mitä suurempi ero solunsisäisen pH:n ja ympäristön pH:n välillä on (Thomas, Hynes et al. 2002).

7.2 Lämpötilan vaikutus fermentointiin

Lämpötilalla on suuri vaikutus *S. cerevisiae* -hiivan elinvoimaisuuteen, metaboliaan ja aktiivisuuteen ja näiden tekijöiden kautta etanolinsietokykyyn (Amillastre, Aceves-Lara et al. 2012). Lämpötilalla voidaan vaikuttaa solujen ylläpitotoimintoihin ja kasvuprosessiin (Villadsen, Nielsen et al. 2011, luku 7). Matalassa lämpötilassa lämmön aiheuttama inhibitio vähenee, tällöin voidaan ravinnon määrää kasvattaa parantaen tuottavuutta ja pienentäen häviöitä (Dias, Junqueira et al. 2012).

Saccharomyces-suvun hiivat pystyvät kasvamaan 0 – 40 °C lämpötilassa. Maksimaalinen kasvunopeus tapahtuu 28-35 °C lämpötilavälillä ja optimaalinen fermentointilämpötila on 5-10 °C korkeampi. *S.cerevisiae*-hiiva tuottaa etanolia tehokkaimmin 28-37 °C lämpötilassa (Tuite, 1991, luku 8).. Lämpötilan noustessa hiivan etanolinsietokyky laskee (Aldiguier, Alfenore et al. 2004). Rajut lämpötilan vaihtelut vaikuttavat myös hiivan elinvoimaisuuteen negatiivisesti (Amillastre, Aceves-Lara et al. 2012). Etikka- ja sukkiinihapposaantojen on huomattu laskevan lämpötilan noustessa, mutta tällöin glyserolituotanto nousee.

7.3 Hiilenlähteen vaikutus fermentointiin

Hiilenlähde toimii hiivan ravintona fermentoinnissa ja glukoosi on niistä tärkein. Glukoosi toimii myös hiivalle signaalimolekyylinä, jonka konsentraation perusteella hiiva tekee muutoksia metaboliaansa, jotta se kykenee toimimaan optimaalisesti. Kun ravinnonlähteen konsentraatiota kasvatetaan, lisää se hiivan kasvunopeutta ja lähteen kulutusta, kunnes konsentraatio saavuttaa inhiboivan tason. Kun hiivan kasvunopeus ja ravinnonlähteen kulutus nousee, kasvaa myös etanolintuotanto. (Zhang, Wu et al., 2015) Mikäli hiivalle on useampi hiilenlähde, käyttää hiiva ensimmäisenä sen lähteen jota se pystyy tehokkaimmin hyödyntämään. Tämän jälkeen hiiva alkaa käyttää toissijaista hiilenlähdettään viipymävaiheen kautta (diauxie-siirtymä) (Villadsen, Nielsen et al. 2011, luku 7). Mikäli glukoosin määrä alkaa rajoittamaan hiivan kasvua, voi tapahtua myös diauxie-siirtymä, sillä hiiva alkaa käyttää etanolia tai muita fermentointituotteitaan ravinnokseen siirtyessään fermentoivasta metaboliasta respiratiiviseen metaboliaan. (Swinnen, Wanke et al., 2006) Mikäli jokin toinen ravinnonlähde, esimerkiksi typenlähde, alkaa rajoittamaan hiivan kasvua, alkaa hiiva kuluttaa useampia hiilenlähteitä yhtä aikaa. Tällöinkin kasvunopeus on suurimmillaan sama kuin mitä se olisi nopeimman kasvun mahdollistavalla ravinnonlähteellä yksin.

7.4 Hapen määrän vaikutus fermentointiin

Ympäristöön liunneen hapen määrä vaikuttaa siihen kuinka paljon ravinnonlähteestä hiiva kuluttaa kasvamiseensa ja kuinka paljon fermentointiin. Hapen määrän kasvaessa hiivan respiratiivinen aineenvaihdunta kasvaa. Joten mikäli happea ei ole lainkaan saatavilla, toimii hiiva vain sen anaerobisella metaboliallaan. (Nielsen, Lidén et al., 2003, luku 7)

KOKEELLINEN OSA

8. Koejärjestelyt

Tässä kappaleessa esitellään, kuinka mikäkin näyte-erä valmistettiin. Kappaleessa on myös kerrottu, kuinka kalibrointiliuokset valmistettiin ja kuinka näiden avulla luotujen kalibrointisuorien perusteella pystyttiin muuttamaan varsinaisista näytteiden analyyseistä saadut tulokset etanolipitoisuuksiksi.

8.1 Alkujärjestelyt

Työn tarkoituksena oli selvittää, kuinka optimoida etanolin tuotanto tarkastellen etanolipitoisuutta, fermentointiaikaa ja sivutuotteiden pitoisuutta. Hiivan ravinteena fermentoinnissa käytettiin tavallista kidesokeria, joka on sakkaroosia. Sakkaroosikonsentraatit skaalattiin vastaamaan 25 litran kokonaistilavuutta. Sakkaroosi lisättiin fermentointipulloihin sakkaroosi-vesiliuoksena. Liuokset fermentointipulloihin valmistettiin tekemällä kaksi sokeriliuosta. Ensimmäiseen liuokseen laitettiin 2908,7g sakkaroosia ja 3 litraa vettä. Keittämällä saatiin kaikki sakkaroosi liukenemaan veteen ja lopputilavuudeksi saatiin 4,85 litraa. Toiseen liuokseen laitettiin 3867,2 grammaa sakkaroosia ja vettä 4 litraa, lopputilavuudeksi saatiin 6,5 litraa. Taulukossa I on esitetty paljonko mihinkin näytteisiin tuli sakkaroosia ja kuinka lisäys tehtiin. Taulukossa on myös esitetty skaalatut sakkaroosipitoisuudet.

Taulukko I Näytteiden sakkaroosin lähtökonsentraatiot.

Näytepullojen numerot	Kantaliuos 1:n määrä [l]	Kantaliuos 2:n määrä [l]	Sakkaroosi-konsentraatio [g/l]	Skaalattu sakkaroosimäärä [kg/(25 l)]
1, 6, 11, 16, 21	0,194	-	116,348	2,91
2, 7, 12, 17, 22	0,323	-	193,913	4,85
3, 8, 13, 18, 23	0,453	-	271,479	6,79
4, 9, 14, 19, 24	-	0,585	348,048	8,70
5, 10, 15, 20, 25	-	0,715	425,392	10,63

Kokeessa käytettiin erästä kaupallista nopeaan fermentointiin tarkoitettua hiivaa. Hiiva sekoitettiin veteen siten, että saatiin lopputilavuudeksi 1,5 litraa hiiva-vesiseosta, josta jokaiseen pulloon tuli 60 millilitraa seosta. Hiiva-vesiseos oli pullotusvaiheessa 24 °C. Näytteitä fermentoitiin taulukon II mukaiset ajat. Fermentointi suoritettiin uunissa, jonka lämpötila oli fermentoinnin aikana 25 – 29 °C. Pulloihin laitettiin korkki kiinni siten, että pulloon ei päässyt ilmaa sisään, mutta tarpeeksi painetta kerätessään pääsi pulloissa muodostuva hiilidioksidi pois. Näin pulloihin ei kertynyt liikaa painetta ja pullot rikkoutuneet. Taulukossa II on esitettyä, kuinka kauan kukin fermentointipullo oli uunissa ennen ensimmäistä näytteenottoa ja analyysia.

Taulukko II Fermentointiajat eri sokerikonsentraatioilla ennen ensimmäistä näytteenottoa.

Näyte numero	Fermentointi aika [h]				
	23	45	115	283	807
1	1	6	11	16	21
2	2	7	12	17	22
3	3	8	13	18	23
4	4	9	14	19	24
5	5	10	15	20	25

9.

9. Analyysit

Tässä kappaleessa on esitelty, millaisella laitteistolla näytteet analysoitiin. Lisäksi esitellään valmistetut kalibrointiliuokset, sekä niillä muodostetun kalibrointikäyrien avulla muodostetut yhtälöt, joilla analyyttien massaosuudet saatiin laskettua. Myös näytteiden esivalmistelut on esitelty osiossa.

9.1 Laitteisto

Analyysit suoritettiin Agilentin 6890 kaasukromatografilla, käyttäen lämmönjohtavuutta mittaavaa detektoria (TDC). Kolonnina käytettiin kapillaarikolonne Zebron Z-BWAXplus (pituus 30m, sisähalkaisija 0,32mm, filmin paksuus 0,5 μm , lämpörajat: min. 20 °C, max. isoterminenraja 240 °C ja ohjelmaraja 260 °C). Analyysissä 0,2 μl näytettä injektoidiin kolonniin jakotekniikalla. Jakosuhte oli 100:1. Kantajakaasuna käytettiin heliumia. Injektorin lämpötila oli 150 °C. Ajon pituus oli 6 minuuttia ja 18 sekuntia. Uuni oli asetettu alkulämpötilaan 70 °C, jossa laite piti lämpötilaa 3 minuuttia. Tämän jälkeen lämpötila nousi 50 °C/min kunnes saavutti 200 °C jossa lämpötila pidettiin 42 sekuntia.

9.2 Kalibrointi

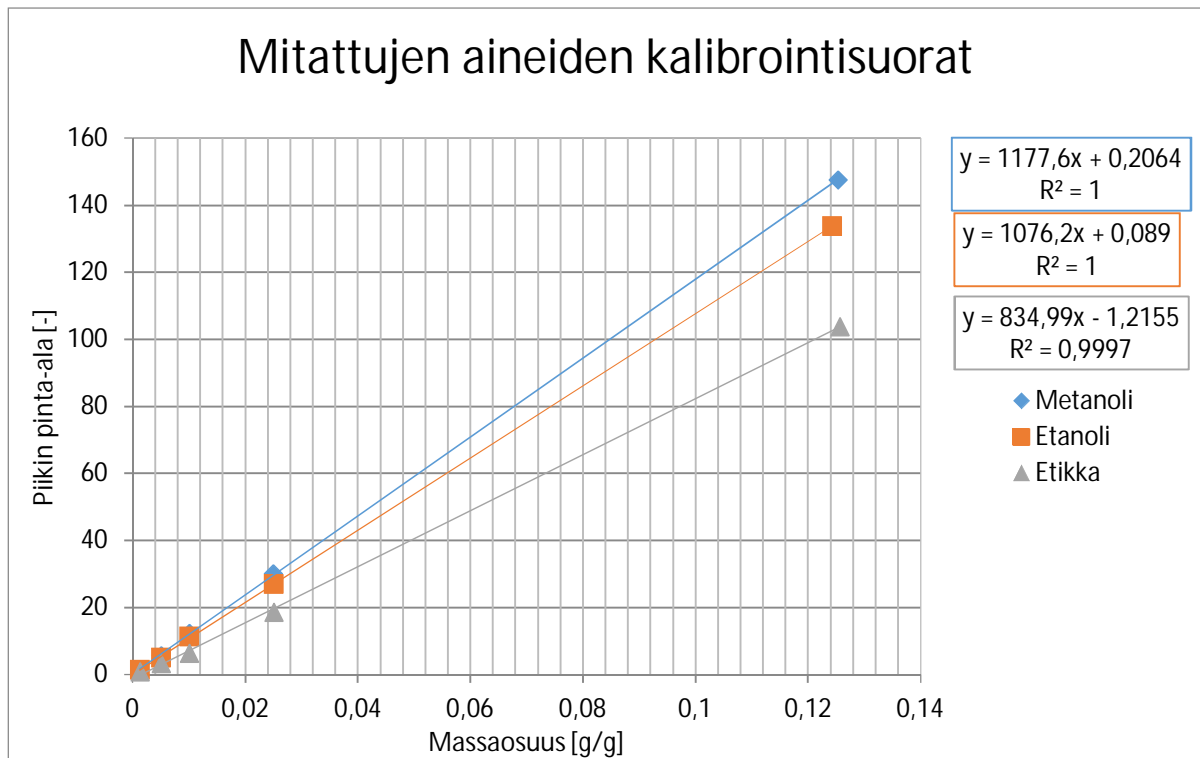
Analyyseja varten luotiin kaksi kalibroinnin kantaliuosta. Kantaliuokseen tuli vettä, etikkahappoa, etanolia ja metanolia. Näitä kaikkia laitettiin kantaliuokseen yhtä suuret massat. Ensimmäisestä kantaliuoksesta valmistettiin 1:2, 1:50 ja 1:200 kalibrointiliuokset. Toisesta kantaliuoksesta valmistettiin 1:10 ja 1:25 kalibrointiliuokset. Kantaliuoksien ja kalibrointiliuoksien ainekohtaiset tarkat massat ja massaosuudet on esitetty taulukossa III.

Taulukko III Kalibrointiliuosten valmistukseen tehtyjen kantaliuosten sekä niistä valmistettujen kalibrointiliuosten ainekohtaiset massaosuudet.

Aine	Kantaliuos 1		kalib. 1:2	kalib. 1:50	kalib. 1:200
	Massa [g]	Massaosuus [g/g]	Massaosuus [g/g]	Massaosuus [g/g]	Massaosuus [g/g]
Vesi	2,000	0,24975	0,62488	0,98500	0,99625
Etikkahappo	2,012	0,25125	0,12562	0,00502	0,00126
Etanoli	1,990	0,24850	0,12425	0,00497	0,00124
Metanoli	2,006	0,25050	0,12525	0,00501	0,00125

Aine	Kantaliuos 2		kalib. 1:10	kalib. 1:25
	Massa [g]	Massaosuus [g/g]	Massaosuus [g/g]	Massaosuus [g/g]
Vesi	1,992	0,24928	0,92493	0,96997
Etikkahappo	2,000	0,25028	0,02503	0,01001
Etanoli	2,002	0,25053	0,02505	0,01002
Metanoli	1,997	0,24991	0,02499	0,01000

Nämä kalibrointiliuokset analysoitiin kaasukromatografilla. Tuloksista muodostettiin kuvassa 6 esitetyt kalibrointisuorat ja niiden yhtälöt.



Kuva 6 Analyttien kalibrointisuorat ja näiden suorien yhtälöt.

Eri yhdisteiden pitoisuudet laskettiin alla olevilla yhtälöillä, jotka saatiin kalibrointisuorista. Yhtälöissä y on mitattavan aineen aiheuttaman piikin pinta-ala ja x on sitä vastaava massaosuus.

Metanoli:

$$x_{\text{metanoli}} = \frac{y_{\text{metanoli}} - 0,2064}{1177,6} \quad (1)$$

Etanoli:

$$x_{\text{etanoli}} = \frac{y_{\text{etanoli}} - 0,089}{1076,2} \quad (2)$$

Etikkahappo:

$$x_{\text{etikkahappo}} = \frac{y_{\text{etikkahappo}} + 1,2155}{834,99} \quad (3)$$

9.3 Näytteiden ottaminen

Keskenään verrannollisia näytteitä anaerobisesta fermentoinnista otettiin viideltä eri ajanjaksolta. Näytteet 1-5 otettiin 23 h, näytteet 6-10 otettiin 45 h, näytteet 11-15 otettiin 115 h, näytteet 16-20 otettiin 283 h ja näytteet 21-25 otettiin 807 h kuluttua fermentoinnin aloittamisesta, kuten taulukossa II on esitetty. Näytteet 5, 10, 15, 20 ja 25 laimennettiin suhteeseen 1:2 ionivaihdetulla vedellä, sillä kahden ensimmäisen näytteen (5 ja 10) kohdalla huomattiin, että laite ei kyennyt kunnolla ajamaan näytettä, oletettavasti liian suuren sakkaroosikonsentraation vuoksi. Fermentointi pullot sekoitettiin ennen näytteenottoa, jotta pullossa oleva seos olisi ollut mahdollisimman homogeeninen. Tämän jälkeen näyte suodatettiin 0,45 μm regeneroidulla selluloosa ruiskusuodattimella näyteastiaan.

10. Tulokset

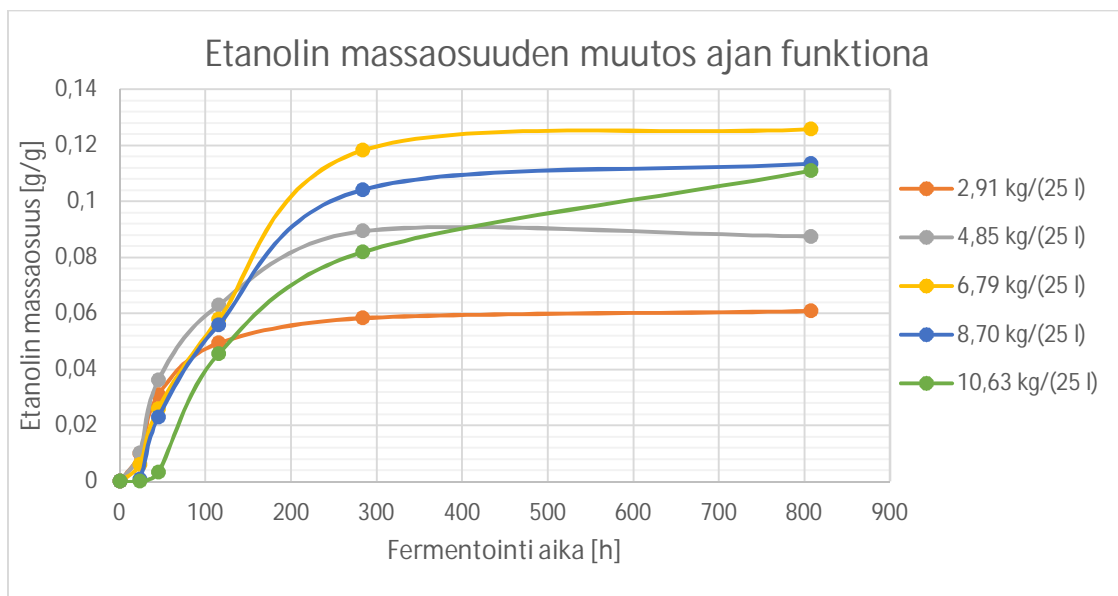
Tässä osiossa esitellään tutkinnallisessa osuudessa saatuja tuloksia anaerobisesta- ja aerobisesta fermentoinnista. Osiossa tarkastellaan eri fermentointiaikojen ja sakkaroosin lähtökonsentraatioiden vaikutusta saavutettuun etanolikonsentraatioon sekä pH:n muutokseen. Tärkeimmät tulokset ovat myös esitettynä kuvaajina tai taulukoina. Kokeiden tuloksissa huomattiin, että korkeampi sakkaroosikonsentraatio hidasti alussa etanolintuotantoa verrattuna pienempiin sakkaroosikonsentraatioihin. 2,91 kg/(25 l) ja 4,85 kg/(25 l) sakkaroosin lähtökonsentraatioilla ei havaittu ensimmäisessä mittauksessa eroa tuotetussa etanolimäärässä, mutta jo seuraavissa mittauksissa huomattiin, että 4,85 kg/(25 l) sakkaroosikonsentraatiolla saavutettiin suurempi etanolipitoisuus kuin 2,91 kg/(25 l). Lopussa mitattu etanolipitoisuus oli suurimmillaan 6,79 kg/(25 l) sakkaroosin lähtökonsentraatiolla.

10.1 Anaerobinen fermentointi

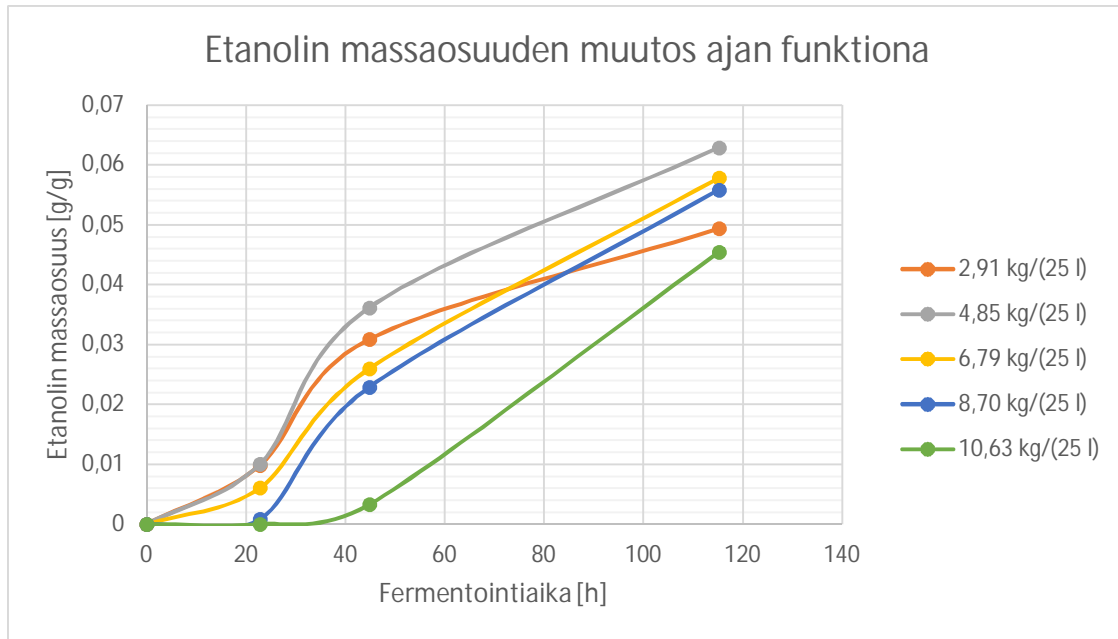
Anaerobisessa fermentoinnissa huomattiin selkeästi, kuinka sakkaroosin lähtökonsentraatio vaikuttaa etanolin muodostumisnopeuteen sekä etanolin loppukonsentraatioon. Kuvassa 7 on esitettynä kokonaisuutena kaikkien näytteiden etanolin massaosuudet. Kuvassa 8 on esitettynä ajanhetkiltä 23 h, 45 h ja 115 h otettujen näytteiden (näytteet 1-15) tulokset, jotta nähdään tarkemmin kuinka liian korkea sakkaroosikonsentraatio inhiboi fermentointia alussa. Tuloksista huomataan, että alhaisella sakkaroosikonsentraatiolla etanolintuotanto on alussa nopeampaa, mutta lopullinen etanolipitoisuus on huomattavasti pienempi kuin suuremmilla sakkaroosikonsentraatioilla saavutettu etanolipitoisuus. Nämä tulokset johtuvat siitä, että liian suurilla sakkaroosikonsentraatioilla ravintoa on hiivapopulaatiolle liikaa ja se alkaa inhiboida fermentointia. Tällöin hiivan kasvuympäristö on hypertonisessa konsentraatiossa eikä hiivapopulaatio kykene hyödyntämään ravintoa kunnolla tuottaen etanolia, kunnes sakkaroosikonsentraatio laskee tarpeeksi alhaiseksi suhteessa hiivapopulaatioon. Sakkaroosin lähtökonsentraatiolla 4,85 kg/(25 l) saavutettiin jo toisessa mittauksessa suurempi etanolipitoisuus kuin 2,91 kg/(25 l). Tämä johtuu siitä, että hiivapopulaatiolla on liian vähän ravintoa käytettäväkseen, mikä myös inhiboi fermentointia.

Etanolipitoisuus oli saavuttanut lähes maksiminsa noin 300 tunnin fermentoinnin jälkeen, paitsi 10,63 kg/(25 l) lähtökonsentraatiolla. Myös lopussa, kun käymisreaktio oli käynyt niin pitkälle kuin mahdollista, mitattu etanolipitoisuus oli suurimmilla sakkaroosikonsentraatioilla pienempi kuin kokeessa saavutettu korkein etanolikonsentraatio, joka tuotettiin 6,79 kg/(25 l) konsentraatiolla. Tämä voi johtua siitä, että hiiva ei ole vallitsevassa ympäristössä yhtä elinvoimainen ja sen kyky sietää etanolia tai muita mahdollisia sivutuotteita on alhaisempi kuin pienemmillä sakkaroosikonsentraatioilla.

Nopeimmat fermentoinnin nopeudet siis saavutettiin alhaisilla sakkaroosikonsentraatioilla, mutta tällöin ravinto loppui kesken fermentoinnin. Tästä syystä olisi hyvä pyrkiä pitämään sakkaroosikonsentraatiota hyvin vakiona, optimaalisena, hiivapopulaatiolle.



Kuva 7 Etanolin massaosuus ajan funktiona anaerobisessa fermentoinnissa eri sakkaroosin lähtökonsentraatioilla.



Kuva 8 Etanolin massaosuus ajan funktiona anaerobisessa fermentoinnissa ensimmäisen 115 tunnin aikana eri sakkaroosin lähtökonsentraatioilla.

10.2 Aerobinen fermentointi

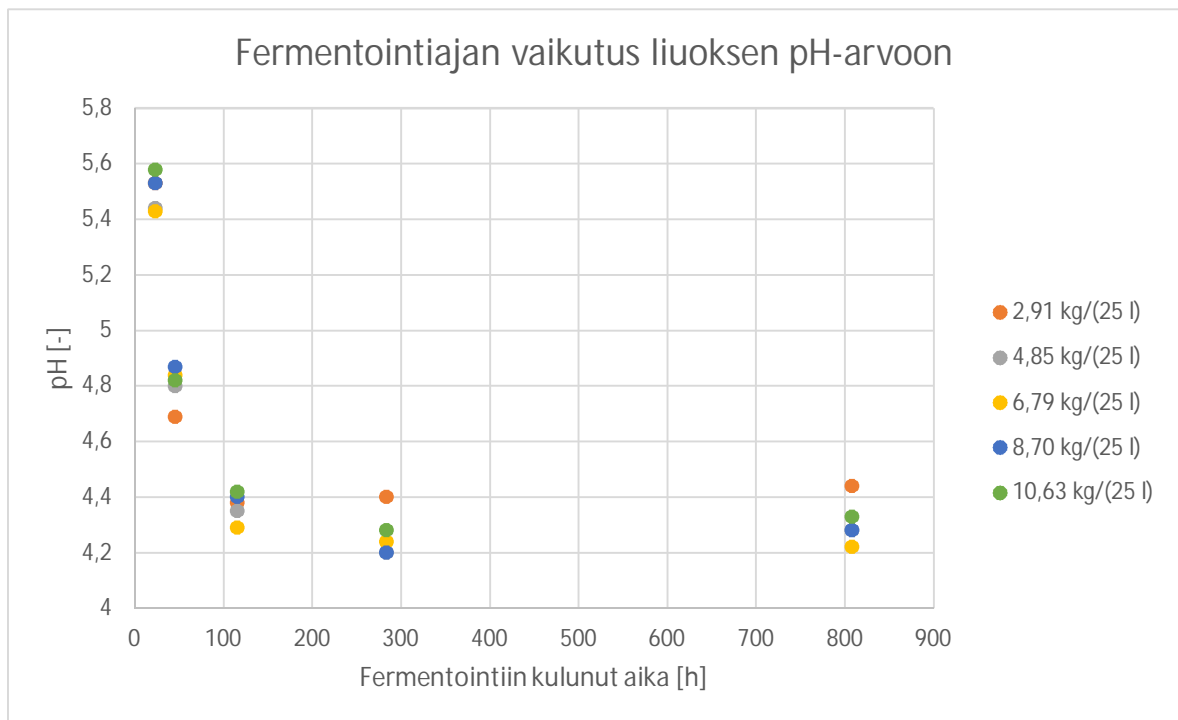
Näytteet 1-5 laitettiin takaisin uuniin ilman korkkia ensimmäisen anaerobiseen fermentointiin liittyvän analysoinnin jälkeen, jotta pulloihin pääsi ilma vaihtumaan vapaasti. Tällä oli tarkoitus tutkia vaikuttaako ilman vaihtuvuus fermentointitulokseen eli alkaako hiiva käyttää liuoksessa respiratiivista metaboliareittiään. Taulukossa IV on esitetty tuloksia, paljonko anaerobinen ja aerobinen fermentointi erosivat toisistaan etanolisaannon suhteen. Huomioitavaa kuitenkin on, että pulloista haihtui huomattavat määrät nestettä uunissa, joten tulokset eivät ole täysin verrannollisia keskenään. Taulukon perusteella voidaan kuitenkin olettaa että respiratiivinen metaboliareitti parantaisi etanolinsaantoa korkeilla sakkaroosipitoisuuksilla. Asiaa tulisi kuitenkin tutkia lisää.

Taulukko IV Saavutettuja etanolin massaosuuksia eri fermentointitavoilla.

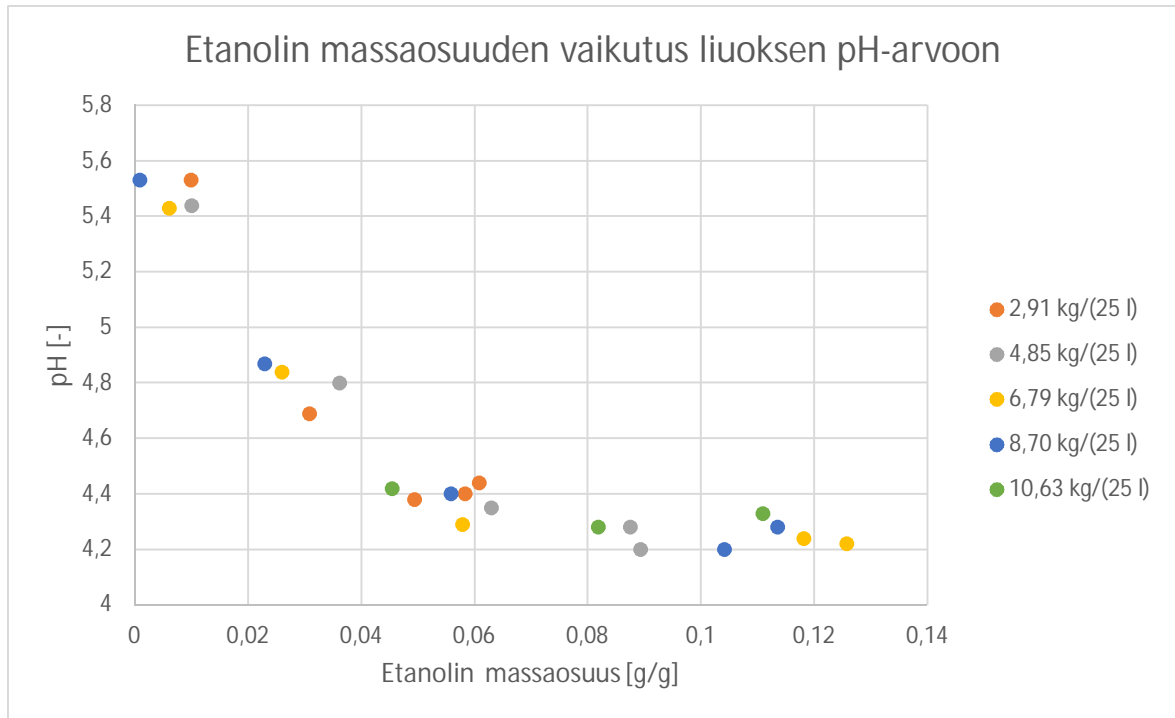
		Sakkaroosin lähtökonsentraatio				
		2,91	4,85	6,79	8,70	10,63
Lähtötilanne						
aerobiselle	Etanolin osuus [mg/g]	9,86	10,05	6,05	0,85	0,00
20 päivää aerobista	Etanolin osuus [mg/g]	23,15	73,79	72,77	104,36	88,19
20 päivää anaerobista	Etanolin osuus [mg/g]	58,27	89,31	117,37	104,08	81,87

10.3 pH:n muutos

Näytteitä analysoitaessa, mitattiin niistä myös pH. Kuvassa 9 on esitettyä fermentointiajanvaikutus eri sakkaroosin lähtökonsentraation näytteiden pH-arvoon. Kuvassa 10 on esitettyä, etanolikonsentraation vaikutus liuoksen pH arvoon. Tuloksista huomataan, että mitä pidempään fermentointi jatkui ja mitä suurempi etanolin osuus liuoksessa oli, sitä alhaisempi oli liuoksen pH. Kuvan 9 ja kuvan 10 perusteella voidaan päätellä, ettei sakkaroosin lähtökonsentraatio vaikuta näissä olosuhteissa liuoksen pH-arvoon.



Kuva 9 Eri sakkaroosin lähtökonsentraatioiden pH-arvot fermentointiajan funktiona.



Kuva 10 Etanolipitoisuuden vaikutus pH-arvoon eri sokerikonsentraatioilla.

11. Virhearviot

Näytteitä analysoitaessa huomattiin, että joihinkin näytepulloihin oli muodostunut jotain muuta tuntemattomaksi jäänyttä ainetta, kuin mitä työssä tutkittiin. Tämä voi vaikuttaa hieman etanolin massaosuuksien todelliseen suuruuteen, mutta ero lasketun ja todellisen massaosuuden välillä on häviävän pieni. Lisäksi inhimillisen virheen vuoksi näytepullon 13 liuos jäi hieman liian laimeaksi, joka vaikuttaa lopulliseen etanolipitoisuuteen ja fermentointinopeuteen.

Näytteiden lopullista sisältöä analysoitaessa, ei kaasukromatografi toiminut oikein näytteiden 18-25 kohdalla. Näiden näytteiden kohdalla ruisku oli injektoinut keskimääräisesti noin 32% oikeasta määrästä, jonka vuoksi mitattua tulosta ei voida käyttää suoraan vertailussa. Sen sijaan etanolipitoisuudelle pystyi laskemaan approksimoidun arvon veden piikkien pinta-alojen avulla, käyttämällä edellisen mittauksen tuloksia. Tämä onnistui, sillä veden ja etanolin piikkien pinta-alojen summa pysyi lähes samana kaikissa mittauksissa.

12. Johtopäätökset

Tavoitteena työssä oli selvittää, kuinka sakkaroosin lähtökonsentraatio vaikuttaa fermentointinopeuteen sekä saavutettuun etanolipitoisuuteen. Tulosten perusteella voitaisiin optimoida käytettyä fermentointiaikaa ja käytetyn sakkaroosin määrää, riippuen minkälaista lopputulosta kaivataan. Liian suuret sakkaroosikonsentraatiot inhiboivat fermentointia, sillä ravintoa on hiivapopulaatiolle liikaa. Myös liian alhaiset sakkaroosikonsentraatiot inhiboivat fermentointia, sillä ravintoa ei ole hiivapopulaatiolle tarpeeksi.

Näiden tulosten perusteella voidaan päätellä, että paras sakkaroosikonsentraatio löytyy 6,79 kg/(25 l) lähettyviltä, ajatellen käytettyä fermentointiaikaa sekä saavutettua etanolikonsentraatiota. Prosessia parantaakseen tulisi alussa laittaa pienempi sakkaroosin lähtökonsentraatio ja lisätä sakkaroosia fermentoinnin aikana.

Lisää aiheesta olisi syytä tutkia, kuinka lämpötila vaikuttaa fermentointitulokseen. Lisäksi tulisi mitata glyserolipitoisuuksia. Myös pH:n vaikutusta tulisi tutkia, kuinka fermentointi etenisi, kun pH pyritäisiin pitämään vakiona koko fermentoinnin ajan. Liuenneen hapen määrän määrittäminen eri vaiheissa voisi myös tuoda lisätietoa ja ymmärrystä prosessista ja tuloksista.

Lähteet

AITTOMÄKI, E, EERIKÄINEN, T, LEISOLA, M, OJAMO, H, SUOMINEN, I and VON WEYMARN, N 2002, *Bioprosessiteknikka*. Werner Söderström Osakeyhtiö 2002, Porvoo.

ALDIGUIER, A.S., ALFENORE, S., CAMELEYRE, X., GOMA, G., URIBELARREA, J.L., GUILLOUET, S.E. and MOLINA-JOUVE, C., 2004. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **26**(4), s. 217-222.

ALMEIDA, J.R., MODIG, T., PETERSSON, A., HÄHN-HÄGERDAL, B., LIDÉN, G. and GORWA-GRAUSLUND, M.F., 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **82**(4), s. 340-349.

AMILLASTRE, E., ACEVES-LARA, C., URIBELARREA, J., ALFENORE, S. and GUILLOUET, S.E., 2012. Dynamic model of temperature impact on cell viability and

major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, **117**, s. 242-250.

BAI, F.W., ANDERSON, W.A. and MOO-YOUNG, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, **26**(1), s. 89-105.

BAILEY, J.E. and OLLIS, D.F., 1986. *Biochemical engineering fundamentals*. 2. ed. edn. New York [u.a.]: McGraw-Hill.

DASHKO, S., ZHOU, N., COMPAGNO, C. and PIŠKUR, J., 2014. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, **14**(6), s. 826-832.

DIAS, M.O.S., JUNQUEIRA, T.L., JESUS, C.D.F., ROSSELL, C.E.V., MACIEL FILHO, R. and BONOMI, A., 2012. Improving bioethanol production – Comparison between extractive and low temperature fermentation. *Applied Energy*, **98**, s. 548-555.

DORTA, C., OLIVA-NETO, P., DE -ABREU-NETO, M.S., NICOLAU-JUNIOR, N. and NAGASHIMA, A.I., 2006. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**(2), s. 177-182.

EL-MANSI, E.M.T., BRYCE, C.F.A., DEMAIN, A.L. and ALLMAN, A.R., 2007. *Fermentation microbiology and biotechnology*. 2. ed. edn. Boca Raton: CRC Press.

JAMES, B. and OLLIS DAVID, F., 1986. *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw Hill Book Company.

JIMÉNEZ-ISLAS, D., PÁEZ-LERMA, J., SOTO-CRUZ, N.O. and GRACIDA, J., 2014. Modelling of Ethanol Production from Red Beet Juice by *Saccharomyces cerevisiae* under Thermal and Acid Stress Conditions. *Food Technology and Biotechnology; Zagreb*, **52**(1), s. 93-100.

JUVONEN, R., NOHYNEK, L., STORGÅRDS, E., WIRTANEN, G., HONKAPÄÄ, K., LYIJYNEN, T., MOKKILA, M. and HAIKARA, A., 2001. Hiivakontaminaatioiden hallinta elintarviketeollisuudessa. *VTT tiedotteita*.

LIN, Y. and TANAKA, S., 2006a. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**(6), s. 627-642.

NARENDRANATH, N.V., THOMAS, K.C. and INGLEDEW, W.M., 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **26**(3), s. 171-177.

NELSON, D.L., COX, M.M. and LEHNINGER, A.L., 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. 5. ed., [Nachdr.] edn. New York: Freeman.

NIELSEN, J., LIDÉN, G. and VILLADSEN, J., 2003. *Bioreaction engineering principles*. 2. ed. edn. New York [u.a.]: Kluwer Acad./Plenum Publ.

PERETÓ, P.J., 2011. Embden-Meyerhof-Parnas Pathway. In: M. GARGAUD, P.R. AMILS, J.C. QUINTANILLA, II, HENDERSON JAMES (JIM) CLEAVES, W.M. IRVINE, P.D.L. PINTI and M. VISO, eds, *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg, s. 485-485.

RIEGER, M., KÄPPELI, O. and FIECHTER, A., 1983. The Role Of Limited Respiration In The Incomplete Oxidation Of Glucose By *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology*, **129**(3), s. 653-661.

SWINNEN, E., WANKE, V., ROOSEN, J., SMETS, B., DUBOULOZ, F., PEDRUZZI, I., CAMERONI, E., DE VIRGILIO, C. and WINDERICKX, J., 2006. Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell division*, **1**(1), s. 3.

THOMAS, K.C., HYNES, S.H. and INGLEDEW, W.M., 2002. Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(4), s. 1616-1623.

TUITE, M.F., 1991. *Saccharomyces*. New York u.a: Plenum Press.

VILLADSEN, J., NIELSEN, J. and LIDÉN, G., 2011. Scale-Up of Bioprocesses. *Bioreaction Engineering Principles*. Springer US, s. 497-546.

YALCIN, S.K. and OZBAS, Z.Y., 2008. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, **39**(2), s. 325-332.

ZHANG, Q., WU, D., LIN, Y., WANG, X., KONG, H. and TANAKA, S., 2015. Substrate and Product Inhibition on Yeast Performance in Ethanol Fermentation. *Energy & Fuels*, **29**(2), s. 1019-1027.

LIIITEET

Liite I Liuos koostumuksien mittaustulokset

Liite I

Liuos koostumuksien mittaustulokset

Mittauskoko	Mittausaika 2.2.2017			Mittausaika 2.3.2017			Mittausaika 2.6.2017														
	Mittausaika	Alka (h)	Näyte	Mittausaika	Alka (h)	Näyte	Mittausaika	Alka (h)	Näyte												
2,91 kg/(25l)	16:30	22:75	#	1	3,06	10,7	4,6	0,028	0,869	0,781	11	12:55	115,1833	#	1	3,089	53,2	18,6	0,0337	3,979	0,883
			EIOH	1	3,08	10,9	4,6	0,0292	0,936	0,852				EIOH	1	3,088	67,8	26,5	0,0313	5,692	0,718
			Wät	2	3,82	1226,4	281,3	0,0727	99,131	3,716				Wät	2	3,829	1283,5	287,2	0,0745	96,021	3,716
4,85 kg/(25l)	13:10	283,4333	#	2	3,814	1152,7	269,5	0,0713	99,064	3,326	12		#	2	3,821	1123,9	266,5	0,0703	94,308	3,991	
			EIOH	1	3,077	6,6	2,8	0,0278	0,654	0,701			EIOH	1	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			Wät	2	3,804	1032,9	242,5	0,0689	99,346	2,633			Wät	2	3,813	1090,8	259,5	0,0701	97,808	3,029	
6,79 kg/(25l)	13:10	283,4333	#	3	3,077	6,6	2,8	0,0278	0,654	0,701	13		#	3	3,086	62,3	24,5	0,0423	5,493	0,722	
			EIOH	1	3,077	10,9	4,6	0,0292	0,936	0,852			EIOH	1	3,083	60,2	22,2	0,0453	6,272	0,56	
			Wät	2	3,752	286	86,6	0,0551	99,643	1,036			Wät	2	3,806	899,4	227,6	0,0659	93,228	2,992	
10,63 kg/(25l)	13:10	283,4333	#	4	3,077	6,6	2,8	0,0278	0,654	0,701	14		#	4	3,086	62,3	24,5	0,0423	5,493	0,722	
			EIOH	1	3,077	10,9	4,6	0,0292	0,936	0,852			EIOH	1	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			Wät	2	3,269	296	93,1	0,053	100	1,941			Wät	2	3,813	1090,8	259,5	0,0701	97,808	3,029	
2,91 kg/(25l)	13:10	283,4333	#	16	3,099	62,8	23	0,0324	4,764	0,593	15 dill 2x		#	15	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			EIOH	1	3,099	62,8	23	0,0324	4,764	0,593			EIOH	1	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			Wät	2	3,836	1295,9	287,2	0,0516	95,236	3,289			Wät	2	3,813	1090,8	259,5	0,0701	97,808	3,029	
4,85 kg/(25l)	13:10	283,4333	#	17	3,095	96,2	43,1	0,0266	7,776	0,963	15 dill 2x		#	15	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			EIOH	1	3,095	96,2	43,1	0,0266	7,776	0,963			EIOH	1	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			Wät	2	3,829	1140,3	269,1	0,0705	92,224	3,469			Wät	2	3,813	1090,8	259,5	0,0701	97,808	3,029	
6,79 kg/(25l)	13:10	283,4333	#	18	3,091	127,2	49,8	0,0426	10,521	0,687	15 dill 2x		#	15	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			EIOH	1	3,091	127,2	49,8	0,0426	10,521	0,687			EIOH	1	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			Wät	2	3,821	1082,1	260,3	0,0693	89,479	2,985			Wät	2	3,813	1090,8	259,5	0,0701	97,808	3,029	
8,70 kg/(25l)	13:10	283,4333	#	19	3,087	112,1	41,6	0,0449	10,45	0,551	15 dill 2x		#	15	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			EIOH	1	3,087	112,1	41,6	0,0449	10,45	0,551			EIOH	1	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			Wät	2	3,814	960,9	240	0,0667	89,55	3,058			Wät	2	3,813	1090,8	259,5	0,0701	97,808	3,029	
10,63 kg/(25l)	13:10	283,4333	#	20 dill 2x							15 dill 2x		#	15	3,084	24,5	9,4	0,0432	2,192	0,63	
			EIOH	1	3,086	44,1	19,1	0,0384	3,738	0,835			EIOH	1	3,086	44,1	19,1	0,0384	3,738	0,835	
			Wät	2	3,822	1136,6	266,8	0,071	96,262	3,336			Wät	2	3,822	1136,6	266,8	0,071	96,262	3,336	