

**Ethanolproduktion von Obstabfälle mit Solid State
Fermentation mit Hilfe von
*Saccharomyces cerevisiae***

Diplomarbeit von

Elham Fanaee Danesh

Eingereicht am

Institut für Biochemie



Fakultät für Technische Chemie, Verfahrenstechnik und Biotechnologie

Technische Universität Graz

Begutachter

Murkovic, Michael, Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn.

INHALTSVERZEICHNIS

1 ALLGEMEINES

| | |
|--|-----------|
| 1-1-Faktor Kreator der Obstabfälle und deren Menge..... | 14 |
| 1-2-Physikalische Eigenschaften von Ethanol und deren Verwendung..... | 15 |
| 1-3-Rohstoffe für die Ethanolproduktion..... | 16 |
| 1-3-1-Zucker | 16 |
| 1-3-2-Roh Stärke | 16 |
| 1-3-3-Roh Cellulose | 17 |
| 1-3-4-Verwendete Lebensmittel bei der Gärung..... | 18 |
| 1-4-Mikroorganismen die Ethanol produzieren | 18 |
| 1-4-1-Arten von Hefe | 19 |
| 1-4-2-Arten von Bakterien | 21 |
| 1-4-3-Pilzarten..... | 22 |
| 1-5-Einflüsse verschiedene Parameter der Ethanolproduktion | |
| 1-5-1-Ethanol Metabolismus in der Hefe..... | 24 |
| 1-5-2-Wirkung von Kohlenstoffatomen | 25 |
| 1-5-3-Wirkung von Ethanol | 25 |
| 1-5-4-Wirkung von Sauerstoff..... | 25 |
| 1-5-5-pH Wirkung | 26 |
| 1-5-6-Temperatur Wirkung | 26 |
| 1-5-7-Die Konzentration von Zucker | 26 |
| 1-5-8-Osmotische Druck | 27 |

2 EINFÜHRUNG

2-2-Methoden zur industriellen Produktion von Ethanol.....29

2-3-Fermentativer Prozess.....30

2-3-1-Submerged Fermentationprozess30

2-3-2-Solid-state-Fermentation33

2-3-2-1-Besonderheitn einer Solid-state-Fermentation und einer
Submerged Fermentation33

2-3-2-2-Vorteile einer Solid-state-Fermentation und einer Submerged
Fermentation34

2-3-2-3-Nachteile einer Solid-state Fermentation.....35

2-3-2-4-Substart Eigenschaften in Solid-state Fermentation36

2-3-2-5-Bio Reaktortypen.....39

2-4-Die Geschichte der Ethanolproduktion mit der Solid-state-Fermentation.....40

2-4-1-Laborforschung von Ethanolproduktion40

3 Materialien und Methoden

3-1-Materialien.....45

3-1-1-Mikroorganismen45

3-1-2-Chemische Materialien45

3-1-3-Laborinstrumente46

3-1-4-Erforderliche Apparate46

3-2-Vorbereitungsmethoden.....46

3-2-1-1-Fruchtzubereitungsmethode46

| | |
|--|-----------|
| 3-2-1-2-Methoden der Zubereitung Slant Medium | 47 |
| 3-2-1-3-Methoden der Vorbereitung vor dem Einpflanzen | 47 |
| 3-2-1-4-Methoden der Zubereitung des Mediums | 47 |
| 3-2-2-Messmethoden | 47 |
| 3-2-2-1-gemessene Feuchtigkeit in% | 47 |
| 3-2-2-2-Zuckermessung | 48 |
| 3-2-2-2-1-Messmethode Dinitrosalicylsäure | 48 |
| 3-2-2-2-2-Nelson-Somogy Methode | 50 |
| 3-2-2-2-3-Zucker messen mit HPLC | 51 |
| 3-2-2-3-Ethanol messen | 52 |
| 3-2-2-3-1-Coway | 52 |
| 3-2-2-3-2-Messung von Ethanol mit der High-Performance Liquid Chromatography..... | 53 |
| 3-2-3-Bestimmung der Zellzah.....l | 55 |
| 4 Die Wirkung verschiedener Parameter auf die Effizienz der Produktion von Ethanol..... | 57 |
| 4-1-1-Einflüsse des Feuchtigkeitsanteil | 57 |
| 4-1-2-Einflüsse des Gärdauer | 59 |
| 4-1-3-Einflüsse der Impfung | 62 |
| 4-1-4-Einflüsse erste Zuckeranfangskonzentration | 63 |
| 4-1-5-Einflüsse der Stickstoff-Quelle | 67 |
| 4-1-6-Einflüsse der Phosphor-Quelle | 68 |
| 4-1-7-Einflüsse des pH Wertes | 69 |
| 4-2-Die Optimierung der Taguchi-Methode..... | 70 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 4-3-Daten und Analyse..... | 70 |
| 5 ERGEBNISSE UND VORSCHLÄGE | |
| 5-1-Ergebnisse..... | 79 |
| 5-2-Vorschläge..... | 80 |
| 6 ANHANG | |
| Anhang I..... | 82 |
| Anhang II | 85 |
| Anhang III | 87 |
| 7 REFERENZEN..... | 97 |

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....

(Unterschrift)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Mann bedanken, welche mich auf meinem Weg durch das Studium tatkräftig unterstützt haben.

Für das Begutachten dieser Arbeit möchte ich a.o. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Michael Murkovic meinen Dank aussprechen.

...der Glaube beginnt dort wo das Wissen endet...

Kurzfassung

Die Entsorgung landwirtschaftlicher Abfälle einschließlich der befallenen Früchte und des befallenen Gemüses, vor allem in Großstädten sind der Mangel an geeigneten Recyclingmethoden nicht nur die Ursachen der Umweltverschmutzung, sondern er führt auch zu einem Verlust von Ressourcen. Diese Abfälle sind eine gute Quelle von Kohlenhydraten, Säuren, Fasern, anorganischen Verbindungen und Vitaminen. Deshalb haben sie ein gutes Potential für die Herstellung von Ethanol, Futtermittel, Enzyme, Pektin, etc.

In diesem Forschungsprojekt wurde die Produktion von Ethanol aus Obstabfällen aus *Saccharomyces cerevisiae* in 28 verschiedene Arten untersucht, mit einem pH-Wert von 4.5 und 77% Feuchtigkeit bei der Solid-State-Fermentation. *S. cerevisiae* wurde von einer mikrobiellen Kultursammlung des Bioenvironmental Research Center (BBRC) gewonnen.

Maximale Ausbeute der Ethanolproduktion mit 13.75% der ursprünglichen Konzentration von Zucker nach 22 Stunden der Fermentation war der Wert von 42.35.

Der optimale Wert der effektiven Parameter in der Produktion von Ethanol wurde bei 1% Ammoniumsulfat, 1.5% Kalium-di-Hydrogen-Phosphat, 2% Glucose und 4×10^6 Zellen/ 50g Obstabfall gefunden. Am Ende der Gärung wurden 71% des Substratzuckers verbraucht.

Abstract

Disposal of Agricultural Wastes including rotten fruits and vegetables particularly in large cities and the lack of appropriate method of their recycle not only causes environmental pollution but also causes a loss of resources. These wastes are a good source of carbohydrates, acids, fibers, inorganic compounds and vitamins. Therefore they have a good potential for production of ethanol, animal feed, enzymes, pectin, etc.

In this research, production of ethanol from fruit wastes was investigated by *Saccharomyces cerevisiae* in 28 °C, pH 4.5 and 77% moisture in solid state fermentation. *S. cerevisiae* was obtained from Biochemical and Bioenvironmental Research Center (B.B.R.C.).

Maximum ethanol production yield 13.75% initial concentration of sugar after 22 hour of fermentation was around $42.35 \frac{g \text{ ethanol}}{kg \text{ fruit wastes}}$.

The optimum value of effective parameters in production of ethanol were found 1% ammonium sulphate, 1.5% potassium Di- hydrogen phosphate, 2% glucose and $4 \times 10^6 \frac{cell}{50 g \text{ fruit waste}}$ inoculation. At the end of fermentation process, 71% of the substrate sugar was consumed.

Einleitung

Eines der größten Probleme in der heutigen Welt sind die Umweltverschmutzung, die Kontamination, Faktoren der Umwelt, sowie Abfall; alle diese Faktoren betreffen auch die Landwirtschaft. Der Iran hat durch das besonders gut geeignete Klima eine bedeutende landwirtschaftliche Produktion von Früchten, Obst und Gemüse, welche aufgrund der hohen Luftfeuchtigkeit besonders dem mikrobiellen Abbau ausgesetzt sind. In der Zeit nach der Ernte kann ein großer Teil von ihnen (zwischen 5 bis 50%) zerstört werden. Der Anteil der Abfälle kann in einigen Fällen bis zu 80% der Ernte erreichen. Die Obstproduktion kann aufgrund von mikrobiellem Verderb nicht für den unmittelbaren Verzehr und auch nicht für Konserven (z.B. Marmelade) verwendet werden. Sie muss deshalb entsorgt werden. Aus der Sicht der Chemie haben die Abfälle einen hohen Anteil an Wasser (über 80%) und ein hohes C/N-Verhältnis. Die wichtigsten Merkmale dieser Abfälle sind die hohen Anteile an Kohlehydraten, Säuren, Ballaststoffen, Mineralstoffen und verschiedenen Vitaminen. Die Entsorgung des Abfalls in die Natur stellt nicht nur das Problem der Umweltverschmutzung dar, sondern verbraucht auch einen Teil des nationalen Kapitals.

Heute können diese Abfälle zu Kompost gemacht oder ohne weitere Verarbeitung als Tierfutter verwendet werden. Mit der Anwendung biotechnologischer Verfahren können die Abfälle aus landwirtschaftlichen Erzeugnissen Rohstoffe an zum Beispiel industrielle Werkstoffe, Pharmaka und weitere Lebensmittel konvertiert werden. Die Abfälle können für die Herstellung von Ethanol als Treibstoff, Tierfutter, organische Säure, Pektin und Enzyme verwendet werden.

Auf der anderen Seite sind fossile Brennstoffe nicht nachhaltig vorhanden und tragen zur anthropogenen Zerstörung der Umwelt bei. Es ist in unserem Interesse die Nutzung der erneuerbaren Energien zu verstärken und neue Ressourcen zu erschließen, wobei insbesondere die Energieträger für Industrie im Vordergrund stehen. Gegenwärtig wird der Ersatz fossiler Brennstoffe durch erneuerbare Kraftstoffe diskutiert. Die Erfahrung der letzten zwei Jahrzehnte mit der Herstellung von Ethanol (**Ethylalkohol**) hat gezeigt, dass dies die einzige sinnvolle Alternative darstellt, wenn damit wirtschaftlich akzeptabel in der globalen Umwelt umgegangen wird. Der Umstieg von fossilen Brennstoffen auf Ethanol in der Transportindustrie geht weltweit nur schleppend voran.

Die Gründe dafür sind:

- Die Häufigkeit und relative Verbilligung der fossilen Kraftstoffe (Benzin und Diesel)
- Ethanol-Engpässe in der Produktion weltweit im Vergleich zur Nachfrage, und die Höhe des Ethanolpreises im Vergleich zu fossilen Brennstoffen

Auch in Bezug auf die großen Öl- und Gasvorkommen wurde wenig für den Einsatz von Ethanol-Kraftstoff für Autos getan. Zurzeit gibt es 26 Ethanol-Anlagen im Iran und 3 oder 4 Projekte für Ethanol-Anlagen sind in Bau. Die bestehende installierte Leistung von etwa 65 bis 70 Mio. Liter pro Jahr reicht wiederum nur für die Industrie, die Ethanol als alternativen Treibstoff einsetzt.

Ein geeignetes Design muss eines der folgenden Merkmale haben:

- a) Es kann für alle Arten von Früchten, die zur Verfügung stehen (Kerne signifikant), verwendet werden.
- b) Obst schnell zum Produkt verwandeln, sodass es für eine lange Zeit lagerfähig wird.
- c) Das ganze Jahr über sollte das Rohmaterial für die maximale Nutzung der Maschinen zur Verfügung stehen.
- d) Die Abfälle des Verfahrens sollten möglichst gering sein.

In dieser Studie wird aus einem Gemisch aus diversen Obstabfällen in einer Solid State Fermentation Ethanol produziert.

1 ALLGEMEINES

1. Grundvoraussetzungen zur Ethanolproduktion

1.1. Faktor Kreator der Obstabfälle und deren Menge

1.2. Physikalische Eigenschaften von Ethanol und deren Verwendung

1.3. Rohstoffe für die Ethanolproduktion

1.4. Mikroorganismen die Ethanol produzieren

1.5. Einflüsse verschiedener Parameter der Ethanolproduktion

1.1. - Faktor Kreator der Obstabfälle und deren Menge

Obstabfälle entstehen aus Obst, dem keine andere Verwertung (z.B. Kompott) zugeordnet werden kann, da sie keine Standard-Qualität besitzen. Durch das Fehlen von adäquaten Bedingungen für die Lagerung von Obst, Saftproduktion und Kompott sowie anderen Produkten im Land, wird jedes Jahr ein Teil der Produkte entsorgt. Außerdem sind einige nicht hochwertige Produkte für den Einsatz in anderen Prozessen daher für die Produktion von Ethanol sehr gut geeignet. Ein ökonomischer Review und die Ethanol-Produktionsstatistiken von einigen Früchten als Rohstoff befinden sich in Anlage 3.

Den Statistiken zufolge kommen Obst und Gemüse in Mengen von über 70.000 Tonnen monatlich nach Teheran, die je nach Saison 10 bis 30% Abfall und Müll ergeben. Es werden somit im Monatsdurchschnitt etwa 14,000 – 15,000 Tonnen Obst als Abfall entsorgt.

Läsionen der Früchte können vor oder nach der Ernte entstehen. Untersuchungen zufolge sind etwa 30 bis 40% der geernteten Früchte verdorben. Wesentliche Ursachen für Abfälle können wie folgt dargestellt werden:

- a) ungeeignete Materialien für Verpackung und Transport
- b) unangemessene Sammlung und Ernte
- c) ungeeignetes Mittel zur Beförderung von landwirtschaftlichen Produkten (7-3%)
- d) fehlende Einstufung von Maschinen oder Geräten, die für 5-3% des Abfallaufkommens der Produkte verantwortlich sind. Ursachen dafür können sein:
 - Mangel an geeigneten Einrichtungen für die Reinigung und Desinfektion von landwirtschaftlichen Erzeugnissen
 - Mangel an Kontrolle
- e) Mangel an Fabriken, alten Werkstätten und technischen Ausrüstungen
- f) Der Mangel an gekühlter Lagerkapazität (3-5%)
- g) Limitiertes Service-Paket (Verpackungen, Verpackungsmaschinen, Verpackungsmaterial, Preiserhöhung, moderne Ausrüstung). Aufgrund der begrenzten Möglichkeiten sind etwa 2-3.5% der oben genannten Produkte verdorben.

- h) Verwendung von Mehrwegprodukten in Märkten
- i) Mängel im Distributionssystem
- j) Verbraucher erhöhen die Produktion von Abfällen aufgrund folgender Umstände:
 - Sie kaufen zu viel Obst und verwerten es nicht rechtzeitig
 - Mangel an geeigneten Lagerungsmöglichkeiten im Haushalt.

Diese Gruppe macht etwa 5 – 8% der Abfälle aus [3].

1.2. - Physikalische Eigenschaften von Ethanol und deren Verwendung

Ethanol ist eines der Produkte, das aus Abfällen von Früchten hergestellt wird. Ethanol ist die älteste synthetische organische Substanz, die von Menschen eingesetzt wird. Ethanol mit C_2H_5OH als geschlossene Formel gehört zur Gruppe der organischen Alkohole. Bei Normaltemperatur ist es flüssig, farblos und mischbar mit Wasser. Es kann darüber hinaus in vielen organischen Lösungsmitteln gelöst werden. Sein Siedepunkt liegt bei $78.3^{\circ}C$, seine Dichte beträgt 78% [11] bei $20^{\circ}C$ und hat den Gefrierpunkt bei $-114^{\circ}C$. Außerdem verbrennt Ethanol leicht unter Bildung von Wasser und Kohlensäure, verdampft schnell und hat somit nur geringe Auswirkungen auf die Umwelt.

Der größte Verbraucher ist die chemische und pharmazeutische Industrie. In diesen Industrien wird es als Lösungsmittel in Lack für glänzende Plakate, Parfüms und Essenzen verwendet. Außerdem ist Ethanol ein wichtiger Rohstoff für die Synthese anderer Verbindungen.

Es wird auch seit vielen Jahren eine Mischung aus Benzin-Ethanol und Industrie-Alkohol als Kraftstoff verwendet [11]. Der Einsatz von Ethanol als Kraftstoff im Auto erfolgte 1880 zum ersten Mal, als Henry Ford ein Auto entwickelte, das nur mit Ethanol betrieben wurde. Autos der nächsten Generation arbeiten mit einer Mischung aus Benzin und Ethanol. Mittlerweile liegt der Anteil des Benzin-Ethanol- Gemisches bei 10% des gesamten Kraftstoffverbrauches in den USA. Es wird selten reines Ethanol als Kraftstoff verwendet und kann abhängig von verschiedenen Umständen mit Benzin gemischt. Ohne mechanische Änderungen im Kraftstoffsystem kann in Benzinfahrzeugen 5 - 10% Ethanol zugemischt werden. Neben der Erhöhung der Oktanzahl, werden dadurch auch Abgasschadstoffe reduziert.

In der Medizin ist Ethanol ebenfalls von Bedeutung da es unter anderem als Desinfektionsmittel eingesetzt werden kann. Da Ethanol erst bei $-114^{\circ}C$ friert, kann es für Thermometer verwendet werden [11].

1.3. - Rohstoffe für die Ethanol-Produktion

Die Auswahl des Rohstoffs für die Ethanolproduktion ist sehr wichtig. Im Allgemeinen werden die Rohstoffe für die Ethanol-Fermentation Methoden in drei Kategorien eingeteilt: Zucker, Cellulose-Materialien, Stärke-Materialien.

Fermentierbare Zucker benötigen die geringste Vorbereitung, wobei aber der Preis am höchsten ist. Stärkezucker sind billiger, müssen aber einen Prozess, in dem die Stärke in Zucker umgewandelt wird, durchmachen. Die auf Cellulose basierten Abfallstoffe haben die höchsten Vorbereitungskosten.

1.3.1. - Zucker

Zuckerrohr-, Rübensaft-, Sirup-, Molke- und Obstabfälle sind wichtige Stoffe für die Ethanol-Produktion. Saccharose ist in Zuckerrohr zu finden. Für die Herstellung von Zuckerrohrsaft wird Zuckerrohr zerkleinert und anschließend gepresst. Die Mineralien werden durch die verdünnte Schwefelsäure und Kalk ausgefällt. Zuckerrohrsaft kann direkt für die Ethanol-Produktion verwendet werden.

Schwarzer Melassesirup ist ein Nebenprodukt der Zuckerproduktion. Zuerst verdampft das Wasser aus dem Zuckerrohrsaft mehrstufig in Türmen, woraufhin die Saccharose kristallisiert wird. Der restliche Teil, der vor allem aus Glucose und Fruktose besteht, wird nicht weiterverarbeitet. Die restliche Lösung mit 50 – 60% Wasser wird als Melassesirup bezeichnet. Viele Zucker sind in der Melasse vorhanden, die leicht gespeichert werden können. Eine Verdünnung von 10 bis 20% W/v ist für die Fermentation notwendig [12].

Frische und getrocknete Früchte, frische Molke und Melasse wurden (um Material für Ethanol zu erhalten) berücksichtigt. Bei Kläranlagen scheint die Verwendung dieser zur Herstellung von Ethanol sehr geeignet zu sein, vor allem da es als Mittel um ökologische Verschmutzung zu reduzieren verwendet werden kann. Doch dieser Prozess ist teuer, da der hohe Wasseranteil (97%) verdampft werden muss [23].

Unreife Früchte wie Äpfel, Trauben, Orangen, Pfirsiche, Pflaumen, Birnen, Ananas und Bananen können für die Ethanolproduktion verwendet werden. Obstpulpe wird aus Weintrauben und Äpfeln nach dem Fermentationsverfahren gewonnen, und als Substrat für die Ethanolproduktion im Rahmen einer Solid-State Fermentation [1] verwendet.

1.3.2. – Roh Stärke

Stärkehaltige Rohstoffe für die Produktion von Ethanol sind Getreide (Mais, Weizen, Gerste, Reis, etc.), Wurzeln, stärkehaltige Pflanzen (z.B. Süßkartoffeln) und einige Pflanzenarten wie Kakteen. Getreide für die Ethanolproduktion können lange Zeit gelagert

werden. Mais mit 50 – 60% Stärke ist für die Ethanolproduktion von großer Bedeutung. Die Stärke ist in diesen Materialien nicht direkt zu fermentieren, was eine Vorbereitung notwendig macht. Die Stärke muss zu einfachen Zuckern enzymatisch hydrolysiert werden. Das Getreide wird zunächst gemahlen und anschließend unter Druck bis sich dessen Stärke löst, gekocht. Nach dem Abkühlen werden Amylasen zugesetzt. Enzyme können von Pilzen (Amilo Prozess) oder dem Malta Prozess gewonnen werden. Bei der Hydrolyse, wird die Stärke zu Dextrin und Maltose innerhalb von 1 – 2h abgebaut. Bei einem kontinuierlichen Prozess erfolgt die Umwandlung der Stärke in Zucker innerhalb weniger Minuten.

Auch Kartoffeln benötigen die Hydrolyse. Diese sind viel effizientere Stärkeprodukte in Bezug auf Hektar Anbaufläche. Das Ablagerungsproblem, damit diese die notwendige Ethanol-Produktion liefern, ist noch nicht gelöst [1].

1.3.3. - Roh- Cellulose

Diese Klasse von Materialien umfasst weiches Holz, Zelluloseabfälle aus der Landwirtschaft (Reis Weizenstroh, Maisstroh, Zuckerrohrabfall) und Papier, sowie Zeitungen. Diese Materialien enthalten Cellulose, Hemizellulose und Lignin und können zu Glucose und anderen fermentierbaren Zuckern hydrolysiert und durch Gärung zu Ethanol umgewandelt werden. Aus chemischer Sicht ist Cellulose stabiler als Stärke. Für die Hydrolyse sind harte, saure Bedingungen oder starke enzymatische Lösungen erforderlich. Daher können die Kosten der Umwandlung von Cellulose in Vergärung viel höher als von Stärke-Hydrolyse sein und die Rentabilität ist in der Regel viel niedriger. Dieser Prozess ist noch nicht so weit ausgereift, dass eine wirtschaftliche Rechtfertigung möglich wäre [12]. Allerdings werden für die Hydrolyse von Lignozellulosen drei Möglichkeiten angewandt:

I. Enzymatische Hydrolyse

Bei dieser Methode werden die Substrate für 10 Minuten mit Wasserdampf bei 250°C behandelt. Mit diesem wird die Zellulose in größere Einheiten gebrochen. Da die Poren in Folge größer werden, kann das Enzym in die Faser eindringen. Nach dieser Phase wird eine Zellulose zugesetzt. Die Enzyme dringen in die Faser ein, was durch die Hydrolyse zur Bildung von Glucose führt. Dieser Prozess dauert zwischen 24 und 72 Stunden.

II. Hydrolyse von Cellulose-Verbindungen mit verdünnter Säure

Diese Methode hat zwei Stufen. In der ersten Stufe werden die Hemizellulosen unter Verwendung der vorhandenen verdünnten Säuren und Dämpfe hydrolysiert. Zwischen 130 - 190°C bei einer Aufenthaltszeit zwischen 10 und 20 min. In der zweiten Stufe wird unter

derselben Verwendung von verdünnten Säuren und Dämpfen hydrolysiert, wobei die Temperaturen zwischen 190°C und 265°C liegen und die Verweilzeit nur wenige Sekunden beträgt. Die Zuckerlösung wird bei dieser Methode mit Kalk neutralisiert und anschließend vergoren.

III. Hydrolyse mit konzentrierter Säure

Die erste Methode besteht darin, Futtermittel zu trocknen, bis es eine Feuchtigkeit von 10% erreicht (um Verdünnung von Säure in der Hydrolyse-Phase zu verhindern). Die Hydrolyse wird in der Regel aktiv in einer Stufe, bei einer Temperatur von 35°C und einer Verweilzeit zwischen 5 und 60 min. durchgeführt. Wie bei den bisherigen Methoden wird die Zuckerlösung nach der Hydrolyse mit Kalk neutralisiert und vergoren [2].

1.3.4. – Verwendete Lebensmittel bei der Gärung

Für die Produktion von Ethanol werden neben Zucker auch andere Materialien für das Wachstum von Zellen benötigt. Laboruntersuchungen haben gezeigt, dass Glucoselösung mit Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat, Kaliumchlorid und Hefeextrakt angereichert werden und dies zu einem verbesserten Zellwachstum führt, wodurch die Ethanol-Produktion schneller abläuft und in Folge die Rentabilität von Ethanol höher ist. Ammoniumionen sind Stickstoffe, die für die Proteine und Nukleinsäuresynthese benötigt werden. Das Hefeextrakt enthält alle notwendigen Faktoren (Aminosäuren, Purine, Pyrimidine die Vitamine und Mineralien), die das Wachstum von Hefe anregen. In der Zellstruktur sind sowohl Phosphor, Kalium, Magnesium als auch Kalzium zu finden, als Cofaktor werden einige Enzyme verwendet. Mineralien, Ammoniumsulfat, Kaliumchlorid und Vitamine stimulieren das Wachstum. Pyridoxin erhöht die Produktion von Ethanol. Industrielle Substrate enthalten viele notwendige Materialien für die Gärung. Falls etwas in der Gärung fehlt muss es nachträglich hinzugefügt werden. [6]

1.4. - Mikroorganismen die Ethanol produzieren

Viele Arten von Mikroorganismen, die Ethanol aus Zucker produzieren, wurden identifiziert. Hefe wird mehr als anderen Mikroorganismen verwendet, vor allem *Saccharomyces cerevisiae*.

Hefen sind die einzigen Mikroorganismen die für großtechnische Produktionen von Ethanol verwendet werden. Diese Gruppe stellt einen hohen Prozentanteil der Substrate auf Ethanol um und bildet wenige Nebenprodukte. Hefen sind sehr widerstandsfähig und größer als Bakterien, sodass das Arbeiten mit ihnen wesentlich leichter ist. Andere Mikroorganismen wie *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermo anaerobacterethalicus*, auch andere thermophile Bakterien wie *Pachysolemtanno philus* und *Zymomonas mobilis*

sind untersucht worden. Diese Mikroorganismen können sowohl Pentose als auch Hexose vergären. Aber Studien haben gezeigt, dass diese Mikroorganismen viele Nebenprodukte erzeugen und daher strikt anaerobe Bedingungen notwendig sind [21].

Bakterien wie *Zymomonas mobilis* können Glucose, die eine 5 bis 10% größere Effizienz als die meisten Hefen besitzen, zu Ethanol umwandeln. Nachteile dieser Bakterien sind, dass sie im Vergleich mit den meisten Hefen empfindlicher gegen Ethanol sind. Forscher arbeiten derzeit mit den genetisch veränderten *Zymomonas mobilis* die Pentosen vergären können und auch widerstandsfähiger gegen Ethanol sind [21]. Auch Pilze werden für Ethanol-Produktionen benutzt. Als die ersten Materialien in Umwandlung Zellulose Material untersucht haben. Folgende Merkmale müssen die Mikroorganismen, die für die Ethanolproduktion verwendet werden, aufweisen:

- Die Intensität, das Wachstum und die Gärung sind hoch.
- Die Ethanol Rentabilität soll hoch sein.
- Sie müssen stabil gegen Glucoseänderungen und Ethanol sein.
- Sie müssen gegen osmotischen Druck resistent sein.
- Das pH-Optimum ist gering.
- Die optimale Gärtemperatur ist hoch.

Der Widerstand gegen Ethanol- und Glucoseänderung macht die Umwandlung vom Substrat zum Produkt möglich. Die Resistenz gegen den osmotischen Druck macht die Verwendung von Substraten mit höherem Salzgehalt möglich. Ein niedriger pH-Wert verhindert die Gärung durch Bakterien. Hohe Gärtemperaturen vereinfachen die Kühlung des Fermentors.

1.4.1. - Arten von Hefe

Saccharomyces, fermentative Hefen, sind die mächtigsten. Die Zellen haben eine vegetative Vermehrung und Acetat-Agar kann die Entfernung von Sporen verursachen.

Saccharomyces ist für die Ethanol-Produktion sehr ideal. Das sind Zellen, in der Regel kugelförmig, oval oder stabförmig sind und eine Größe von 3–7 x 4–12 µm. Diese Art kann mehr als 8–20 Vol% Ethanol produzieren.

Saccharomyces bayanus produzieren hohe Konzentrationen von Ethanol.

S. exigus sind kleiner. Diese Zellen sind oval, mit einer Größe von 2.5–5 x 3.5–6.5 µm. Hefe toleriert einen zu niedrigen pH-Wert, so kann sie für die Herstellung von Sauerteig weiter verwendet werden.

Die Zellen *Torulaspota delbrueckii* sind rund oder oval. Sie haben eine Größe von 2.5–7 x 2.5–6.5 µm und mit 6 – 10 Vol% wird Ethanol erzeugt.

Hansenula anomalla ist oft auf Trauben zu finden und kann in Form einer Kugel oder eines Stäbchens sein. Diese Zellen haben eine Größe von 1.9–4.1 x 2.1–6.1 µm. Diese Hefe-Art enthält erhebliche Mengen von Ethylacetat und Essigsäure und die diploiden Zellen besitzen ein bis vier Sporen. Diese Hefe produziert eine geringe Menge von Ethanol.

Zygosaccharomyces bailii und *Zygosaccharomyces rouxii* sind Hefen die unter osmotischem Druck stehen können. Die haploiden Zellen sind kugel-, stabförmig oder oval. Die Zellgröße von *Z. bailii* beträgt 3.5–7 x 5.5–14 µm. *Z. rouxii* Zellen produzieren Exosporen und werden zu den haploiden *Saccharomyces* gezählt. Sie besitzen mehr Toleranz, als die Fähigkeit Ethanol zu produzieren. Diese Hefe toleriert hohe Konzentrationen von Glucose, Ethanol, Schwefeldioxid und Essigsäure.

Hanseniaspora guilliermondii sind Zitronenförmige, ovale oder stäbchenförmige Zellen mit einer Größe von 4.5-10.2 x 2.2-5.8 µm. Diese Art produziert Ethanol aber ihr Wachstum wird von Ethanol gehemmt.

Metschnikowia pulcherima sind kugelförmige oder ovale Zellen. Sie haben eine Größe von 4-7 x 2-6 µm. Diese Hefe produziert Sporen in Form von Nadeln. Sie produziert leicht Ethanol; es wird eine höhere Konzentration von Glycerin und Alkohol produziert.

Saccharomyces ludwigii sind zitronenförmig, Wurst-, Stabförmig oder oval. Die Größe der Hefezellen beträgt 7-23 x 4-8 µm. Sie können bis zu 8 Vol% Ethanol produzieren, während sie größere Konzentrationen von Ethanol und SO_2 tolerieren können.

Schizosaccharomyces pombe ist in der Regel zylindrisch. Ihr Wachstum wird durchgeführt, wenn eine Wand in der Mitte des Stabes Zellen bildet. Die Größe der Zellen ist 4-16 x 3-6 µm. Hefe kann gleich wie *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol produzieren. Hier wird die Maleinsäure durch Hefe zu Ethanol umgewandelt.

Pichia membranefaciens sind eier- oder stabförmig, 2.5-17 x 1.8-4.5 µm groß. Diese Zellen können lange Ketten, Cluster, oder einen Film bilden. Diese Hefe-Art besitzt ein bis vier Sporen und ihre Ethanolproduktion ist sehr gering (2 Vol%), aber sie ist gegen große Ethanol Konzentrationen stabil.

Klachera apiculata haben eine sphärischen Form oder eine Stange. Die Größe der Zellen beträgt $2.5-11.5 \times 1.5-5 \mu\text{m}$. Diese Hefe ist eine unvollständige Form von *Hansenia sporauvarum*. Sie produziert 5-6% Ethanol, aber kann höhere Konzentrationen von Ethanol tolerieren. Eine bestimmte Menge an Fruchtsaft steht zur Verfügung. *Klachera apiculata* kann relativ hohe Konzentrationen von Essigsäure, Ethylacetat, Mannit, Sorbit und Ribit produzieren.

Candida stellata sind ovale Zellen mit einer relativ geringen Größe von $2-3 \times 4-6 \mu\text{m}$. Sie bilden oft Sternhaufen, weshalb sie oft *stellata* genannt werden. *Candida stellata* ist eine osmophile Hefe; sie ist stabil gegen hohe Temperaturen ($30-35^\circ\text{C}$) und fermentiert Fructose schneller als Glucose.

Candida vini und *Mycoderma vini* sind Zellen mit einer durchschnittlichen Größe von $2.9-3.4 \times 5.8-10.1 \mu\text{m}$. Sie kommen einzeln oder in Form von Paaren oder Ketten vor. Diese Hefe produziert Mycel. *Candida vini* erzeugt kleine Mengen von Ethanol, welche entweder an der Flüssigkeitsoberfläche oder am Boden des Gefäßes wachsen.

Die oben erwähnten Hefe-Arten wurden nur kurz erläutert, da es sich um ein Konzept handelt, das von bestimmten Gruppen verwendet wird, müssen sie zwangsläufig ähnlich sein. Zum Beispiel produzieren nicht alle Arten *Saccharomyces* wenig flüchtige Säuren [9].

1.4.2. - Arten von Bakterien

Rogers verwendete im Jahr 1979 die Bakterien *Zymomonas mobilis* für die Ethanol Gärung. Dieser Mikroorganismus kann mehr Glucose aufnehmen ($5.45\text{g Glucose/g Zellen(h)}$) und hat eine viel höhere Ethanolproduktion ($25.3 \text{ g Ethanol / Zelle(h)}$) als *S. carlsbergensis*. Die Glucoseabsorption beträgt $2.08 \text{ g Glucose/g Zelle (h)}$ und die Ethanolproduktionsgeschwindigkeit $0.78 \text{ g Ethanol/g Zelle (h)}$. *Zymomonas mobilis* hat unter anaeroben Bedingungen eine Rentabilität von $1.8-1.9 \text{ mol Ethanol pro mol Glucose}$. Kluyver hat herausgefunden dass aus 25% der Glucoselösung mehr als 10 %W/v Ethanol produziert wird. Swing hat gezeigt, dass die Hälfte dieser Hefe-Arten haben die Fähigkeit in 40% der Glucosekultur zu wachsen. Laut einer Studie von Rogers über den diskontinuierlichen Prozess haben sich einige Vorteile von der Verwendung von *Zymomonas mobilis* für die Ethanolproduktion ergeben:

Bei *Zymomonas mobilis* wird die Absorptionsrate für die Glucoseaufnahme und Ethanolproduktion im Vergleich zu Hefe deutlich erhöht, wodurch in den Systemen mit Zellrückhalt wesentlich mehr Ethanol produziert wird. Im Vergleich mit der Hefe *Zymomonas mobilis* hat mehr Ethanolproduktion eine höhere Effizienz und die Ethanolkonzentration ist geringer. Die Konzentration der Bakterien im Vergleich zu Hefe ist niedriger, weshalb auch weniger Energie für das Wachstum verbraucht wird. Bei der Kultur

Zymomonas mobilis Metabolit Glucose von Enter-Dodoroff wird ein mol ATP pro mol Glucose hergestellt. Im Gegensatz dazu kann die Hefe beim Abbau von Glucose über die Glycolyse aus 1 mol Glucose 2 mol ATP erzeugen. *Zymomonas mobilis* wurde anaerob gezüchtet, im Gegensatz zu Hefe ist es aber nicht notwendig durch das Hinzufügen von Sauerstoff zu den Zellen, Überlebensraten und Konzentrationen in kontinuierlichen Systemen zu kontrollieren. Der Betrag der Ethanol-Toleranz ist bei einigen Arten von *Zymomonas mobilis* wie bei *S. cerevisiae*. Mit *Zymomonas mobilis* können Konzentrationen von 70 bis 80 g/L (über 10 %v/v) in kontinuierlicher Kultur und über 130 g/L in diskontinuierlicher Kultur von Ethanol gewonnen werden. Ein breites Spektrum an Techniken, die *in vivo* und *in vitro* zur genetischen Manipulation von Bakterien entwickelt wurden, dient dazu, dass die Domäne von verschiedenen Substraten durch *Zymomonas mobilis* erhöht werden kann. Andererseits kann *Zymomonas mobilis* genetisch verändert werden, sodass die Mutanten gegen Ethanol resistent sind.

Atkinson hat die Bakterien *Bacillus stearothermophilus* für die kontinuierliche Ethanolgärung bei 65°C verwendet. Der Temperaturanstieg reduzierte die Ethanollöslichkeit so, dass dieser als Gas aus dem Medium entfernt werden konnte. Loginova zeigte, dass sich die Ethanolproduktionsgeschwindigkeit mit thermoresistenten Mikroorganismen erhöht, weil Wärme die Cytochromaktivität reduziert und die Alkohol-Dehydrogenaseaktivität erhöht [2].

1.4.3. - Pilzarten

Von mehreren Arten von Pilzen ist bekannt, dass ein Enzym-System für die Ethanolproduktion vorhanden ist: *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Neurospora*, *Monilia*, *Polyporus*, *Paecilomyces* sind dafür bekannt, dass sie Xylose und Glucose zu Ethanol umwandeln (Tabelle 1).

Wenn das Wachstum von Fikomyst in die Kultur eintaucht, sind von Ethanol die meisten Metaboliten zur Verfügung.

Je höher die Zellvermehrung, umso geringer ist die spezielle Wachstumsrate von *F. oxysporum* *F. lini*. Diese Mikroorganismen können je g Xylose 0.41 g Ethanol produzieren. Suhko und Enari haben auf 26 Arten deren Fähigkeit Ethanol aus Glucose und Xylose zu gewinnen, getestet. Bei allen Arten von *Fusarium* (außer *F. oxysporum*) wurden beide Zucker verwendet. *F. oxysporum* VTT-D-8014, 134 war die beste Art mit einer Effizienz von 0.46 g Ethanol /g Xylose.

Tabelle(1-1): Eigenschaften der Organismen

| wichtige Eigenschaft | Organismen |
|--|------------------------------|
| Glucose zu Ethanol und Essigsäure | <i>Aspergillus niger</i> |
| Glucose zu Ethanol und Essigsäure | <i>Fusarium lini</i> |
| Glucose und Xylose zu Ethanol | <i>Fusarium ssp</i> |
| Zellulose zu Ethanol (direkt) | <i>F. oxysporum F3</i> |
| Abfälle zu Essigsäure | <i>F. oxysporum DSM 84.1</i> |
| Xylose Änderung | <i>F. oxysporum lini</i> |
| Zellulose zu Ethanol (direkt) | <i>Monilia</i> |
| Glucose zu Ethanol, Essigsäure, | <i>Mucor</i> |
| Zellulose, Heimzellulose zu Ethanol | <i>Neurospora crassa</i> |
| Ethanolproduktion von allen wichtigen Pflanzenzucker (Biomass Hydrolyse) | <i>Paecilomyces</i> |
| Stärke, Saccharose und Fructose zu Ethanol und Essigsäure | <i>Polyporus anceps</i> |
| Glucose zu Ethanol und Essigsäure | <i>Rhizopus oryzae</i> |

Perlman hat die Fähigkeit sechs Sorten von *Mucor* zu Glucose umzuwandeln getestet. Klar, dass jede dieser Arten mittlerweile mindestens 1g Ethanol/Stunde erzeugen kann. *Mucor* 101 und *Mucor* 105 produzieren 6.6 -7 g/L Ethanol in bestimmten Zuckerbereichen. Die bekannte Sorte *Paecilomyces* NF1 hat die Eigenschaften, die für die Ethanolproduktion erforderlich sind. Dieser Pilz kann alle wichtigen Zucker, die durch Biomassehydrolyse der Pflanzen erzeugt werden, in Ethanol umwandeln. Eine maximale Organismenkonzentration (\square) von 76 g/L kann erreicht werden.

Nur wenige Pilzarten sind in der Lage Zellulose zu Ethanol direkt zu konvertieren. *Monilia*, *Neurospora crassa*, und *Fusarium oxysporum* haben die Fähigkeit Zellulose zu Ethanol und Essigsäure umzuwandeln. Ethanol wird produziert, wenn das Mycel, das unter aeroben Bedingungen gewachsen ist, in anaerobe Bedingungen gebracht wird. Der Prozess der Ethanolproduktion durch Fadenpilze ist begrenzt. Eine vollständige Umstellung nimmt viel Zeit in Anspruch.

Die Geschwindigkeit Zucker in Ethanol umzuwandeln ist bei Hefe hoch. Pilze haben die Fähigkeit in Cellulose- und Biomasseanlagen zu wachsen, während dem Hefe-System diese Fähigkeit in der Regel fehlt [2].

1.5. - Einflüsse verschiedenen Parameter der Ethanolproduktion

1.5.1. - Ethanol-Metabolismus in der Hefe

Aerobe und anaerobe Stoffwechselwege der Hefe sind in Abbildung 1.1. dargestellt [6]. In anaeroben Bedingungen wird Glucose durch Glykolyse zu Ethanol und Kohlendioxid konvertiert. Bei dieser Reaktion werden pro mol Glucose zwei mol Ethanol, zwei mol Kohlendioxid und die Menge an Energie, die zur Biosynthese verwendet wird, erzeugt.



In der Praxis wird nur eine geringe Menge von Glucose für die Biomasse und Nebenprodukten verwendet. Die tatsächliche Rentabilität von Ethanol durch Gärung mit Hefe beträgt 95% des theoretischen Wertes. Wenn der Substratkomplex (z. B. welche industrielle Herstellung für Ethanol verwendet wird) verwendet wird, werden weitere Nebenprodukte erzeugt und die Rentabilität auf bis zu 90% des Theoriewertes reduziert. Außerdem wird unter aeroben Bedingungen der gesamte Zucker zu Biomasse und Nebenprodukten konvertiert.

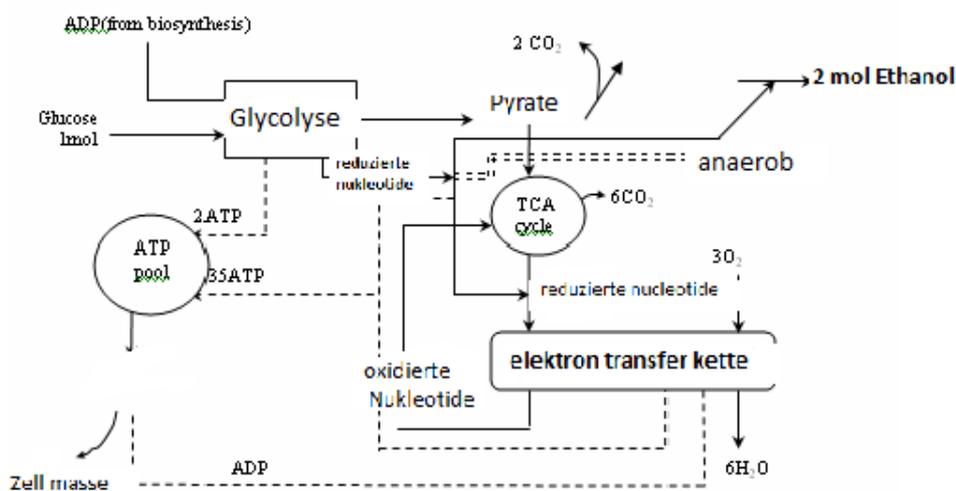


Abbildung (1.1.) Aerobe und anaerobe Abbauewege der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [6]

1.5.2. - Wirkung von Kohlenstoffatomen

Sechs Kohlenstoffatome zusammengesetzt mit Zucker (Glucose, Fructose, Galaktose und Maltose), sind erste Reaktanten beim Hefestoffwechsel. Unter fermentativen Bedingungen ist die Ethanolproduktion von Zucker konzentrationsabhängig. Ausgedrückt wird dies mit ähnlichen Gleichungen wie der von Monod.

$$V = \frac{V_{\max} C_s}{K_s + C_s}$$

Dabei gilt:

V= spezifische Ethanolproduktion V (g Ethanol/ g von Zellen h)

C_s= Glucosekonzentration (g/L)

K_s= konstante Sättigung

Bei niedrigen Substratkonzentrationen wird die Produktivität reduziert und bei hohen Konzentrationen wird eine Sättigungsgrenze erreicht. Diese Intensität der Ethanolproduktion ist das Maximum. Eine höhere Zuckerkonzentration würde keine höhere Ethanolproduktion verursachen. Bei höheren Ethanol-Konzentrationen findet eine Catabolitinhibition statt. [1]

1.5.3. - Wirkung von Ethanol

Ethanol ist giftig für Hefe. Darum soll die Hefe, die für die Ethanolproduktion verwendet wird, stabil gegen Ethanol sein. Diese Inhibitionswirkung von Ethanol ist bei einer Konzentration von weniger als 20 g/L vernachlässigbar, wird aber bei höheren Konzentrationen signifikant. Die Ethanolproduktion und das Zellwachstum vieler Hefe-Arten werden aber mit Ethanolkonzentrationen von mehr als 110 g/L vollständig beendet. Die Inhibitionswirkung von Ethanol steht im Zusammenhang mit Inhibition und Denaturieren von glycolytischen Enzymen und auch Änderungen in den Zellwänden [2].

1.5.4. - Wirkung von Sauerstoff

Wenn zu viel Sauerstoff zur Verfügung steht, wird ein aerober Stoffwechsel für Hefe verwendet und Substrat wird verbraucht ohne Ethanol zu produzieren. Aber kleine Mengen an Sauerstoff können den fermentativen Stoffwechsel der Hefe anregen. Sauerstoff ist für das Hefewachstum (für die Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren

und Lipiden in Mitochondrien und Plasmamembran) notwendig. Für die Hefe, die Crabtree-Eigenschaften zeigen, ist ein hoher Zuckerspiegel ausreichend um den aeroben Verbrauch von Zucker zu verhindern. Für den Rest der Hefe oder wenn die Glucosekonzentration gering ist, sollte die Menge an Sauerstoff begrenzt werden [12].

1.5.5. - pH Wirkung

Die Intensität der Gärung ist gegenüber dem pH-Wert empfindlich. Die meisten Hefen haben einen optimalen pH-Wert zwischen 4 und 6. Dieser pH-Bereich ist jedoch für die meisten Bakterien nicht geeignet. Viele der Hefe-Arten können einem sauren Milieu mit einem pH-Wert von etwa 2 ausgesetzt werden ohne ernsthaften Schaden zu erhalten [2].

1.5.6. - Einfluss der Temperatur

Die Stabilität gegen hohe Temperaturen ist eine geeignete Eigenschaft für Hefen die für die Ethanolproduktion verwendet werden. Die optimale Wachstumstemperatur liegt für die meisten Hefen für die Ethanolproduktion zwischen 28 und 30°C. Die optimale Temperatur der Gärung in geringen Konzentrationen von Ethanol ist in der Regel etwas höher als im oben angegebenen Bereich (bis zu 38°C). Bei niedrigeren Temperaturen sind Hefen widerstandsfähiger gegen Ethanol [12]. Bei Temperaturen oberhalb der optimalen Temperatur werden Enzyme zerstört und Hefen verlieren ihre Fähigkeit Ethanol zu produzieren. Zusätzlich wird die Effizienz der Ethanolproduktion reduziert. Große Mengen an Ethanol werden mit Kohlendioxid entfernt. Hefe kann bei Temperaturen von etwa 0°C gelagert werden, wodurch sie leicht aktiviert und verwendet werden können. Die anaerobe Vergärung von Zucker durch Hefe wird die Wärme von ca. 24 kcal/ mol g Glucose reaktiv durch Fermentation [12] freigeben. Die Temperaturerhöhung auf etwa 35°C, vor allem in hohen Konzentrationen von Ethanol, zerstört Hefezellen [12].

1.5.7. - Die Konzentration von Zucker

Glucose ist der erste Reaktant im Hefestoffwechsel und in sehr niedrigen Konzentrationen (weniger als 10 mg/L) vorhanden. Der Glucoseverbrauch wird fast linear mit zunehmenden Zuckerwerten erhöht. Hohe Konzentrationen von Glucose (100 bis 150 g/L) verursachen eine Hemmung der Enzyme. Das Ethanol wird bei einer Konzentration zwischen 3 und 100 g/L, auch in Gegenwart von Sauerstoff, hergestellt.

Unter anaeroben Bedingungen und mittleren Glucosekonzentrationen, wird die Geschwindigkeit der Ethanolproduktion der Beziehung Monods folgen:

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_s + S}$$

Dabei gilt:

V= Geschwindigkeit der Ethanol-Produktion

S= Glucose-Substrat Konzentration (g/ L)

K_s= Konstante

1.5.8. - osmotischer Druck

Das Wachstum von Hefe-Arten wird durch erhöhten osmotischen Druck gehemmt. Der hohe osmotische Druck von Obstsaften entsteht durch hohe Konzentrationen von Zucker, insbesondere Glucose und Fructose. Bei hohen Glucosekonzentrationen findet die Gärung nicht statt; hingegen zeigen osmotolerante Hefen eine gute Fermentation. [12,27]

2 HERSTELLUNG VON ETHANOL

2.1. Einführung

2.2. Methoden zur industriellen Produktion von Ethanol

2.3. Fermentativer Prozess

2.4. Die Geschichte der Ethanolproduktion mit der Solid-State-Fermentierung

2.1. - Einführung

Bei Gärung wird immer Ethanol erzeugt. Doch nach dem zweiten Weltkrieg verbreitete sich die Ethanolproduktion auf Basis von Ethyl-Entwässerung aufgrund des günstigen Zugangs zu Ethylen (sie waren das Produkt von Erdgasverwertung und Benzinproduktion) schnell. Da sowohl durch diese Quellen Druck auferlegt wurde sowie zusätzliche Kapazitäten nach dem Weltkrieg verursacht wurden, kam es zur Schließung vieler Einrichtungen, die fermentative Herstellung von Ethanol betrieben. Nach dem weltweiten Öl-Boykott im Jahr 1973 folgte ein rascher Anstieg der Ölpreise. Derzeit wird Ethanol sowohl mit der Fermentationsmethode als auch durch chemische Verfahren hergestellt.

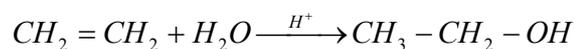
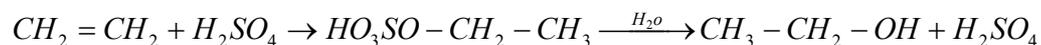
Im Jahre 1973 wurde in drei viertel Teilen der Welt das Ethanol mit derselben Methode, wie der im Jahre 1940, das heißt durch langsame Gärung und mehrstufige Destillation, produziert. Eine nicht-kontinuierliche Gärung verursacht die langsame Reaktion. Verbesserte Mikroorganismen erhöhen die Effizienz der Ethanolproduktion durch den Einsatz neuer Technologien mit Hilfe eines optimierten Fermentors und optimierten Kulturen. Dies ist für die Steigerung der Effizienz der Ethanolproduktion sehr wichtig [6].

2.2. - Methoden zur industriellen Produktion von Ethanol

Beim industriellen Maßstab zur Herstellung von Ethanol wird aus organischen Rohstoffen wie Öl, Erdgas, Kohle und Biomasse verwendet. Drei Methoden sind für die Ethanol-Produktion unerlässlich:

a) Hydratisierte Alkene erhalten von Öl Crack

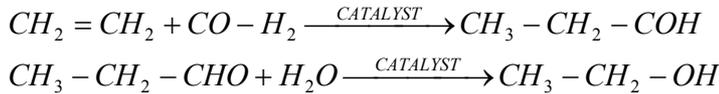
Alkene werden leicht durch Zugabe von Schwefelsäure oder Wasser, gefolgt von Hydrolyse, zu Alkohol umgewandelt. Durch diese Methode kann nur Alkohol entstehen, weil ihre Bildung nicht im Widerspruch zu Markownikoff steht und daher durch die Reaktion mit Ethylen Ethanol hergestellt wird [11]:



b) - Prozess Exo

Ethanol kann aus dem Prozess Exo hergestellt werden. Ethylen, in Gegenwart eines geeigneten Katalysators, reagieren mit Kohlenmonoxid und Wasserstoff zu Propanal. Propanal wird leicht mit katalytischer Hydrierung zu Ethanol umgewandelt. Die meisten Exo Prozesse finden statt, wenn eine Reduktion des Prozesses gleichzeitig mit einer

Propanalproduktion auftritt. Dann kann Ethanol direkt gewonnen werden. Exo Reaktionen sind:



Beim Exo-Prozess ist der Katalysator Octacarbonyldicobalt ($Co_2(CO)_8$), welcher durch Reaktion von Kobalt mit Kohlenmonoxid erhalten wird [11].

c) Vergärung von Kohlehydraten

Gärung durch Hefe ist der älteste synthetische Prozess der für den Menschen nutzbar wurde und noch immer Bedeutung für die Ethanolproduktion und andere Alkohole hat. Kein Zweifel, in Zukunft brauchen die Menschen die Kohlenhydrate als Quelle von Kohlenstoff für die Synthese von organischen Chemikalien und Brennstoff. Zudem hat der Gärprozess immer weiter an Bedeutung gewonnen.

Die Ethanolbildung kann im Labor mit folgenden Methoden erreicht werden: Merkuration, Dimerkuration, Hydroborierung, Oxidation, Grignard Reaktion, alkalische Hydrolyse, Reduktion von Carbonylverbindungen, Säuren und Ester, sowie die Hydrooxidation.

2.3. -Fermentativer Prozess

In der Regel erfolgt die Herstellung von Ethanol in submerged Fermentation (SF) und solid state Fermentation (SSF). Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Methoden ist im Substrat, das verbraucht wird, zu finden. In der submerged Fermentation wird das Substrat in Form einer Zuckerlösung dem Fermentor zugesetzt. Bei der Solid-State-Fermentation ist das Substrat fest und feucht und enthält vergärbare Zucker.

2.3. -Submerged Fermentationsprozess

Die Fermentationsmethode hat Vorteile wie: präzise Steuerung (von Temperatur, pH-Wert, kombiniert Chemiemittel, etc.), mögliche Mikroorganismen, und Trennung von Abwasser und Wiederverwertung derer. Die Fermentation bietet die Möglichkeit zur maßgeblichen Vergrößerung der Ethanolproduktion und es sind alle Methoden und Informationen, die für das System notwendig sind, vorhanden.

Die größten Nachteile dieser Methode sind Abwasser mit hohem Volumen und hoher BOD. Darum ist dieser Fermentationstyp für Substrate mit niedriger Zuckerkonzentration ungeeignet.

2.3.1. -Typen von Submerged Fermentation [6]

a) Normale diskontinuierliche Fermentation (Konventional Batch Fermentation)

Die diskontinuierliche Gärung mit Hefe beginnt mit einer Impfung. Eine Reinkultur eines Schrägagarröhrchens soll in einen Kolben übertragen werden. Wenn die Kultur ihr maximales Wachstum erreicht (12 bis 14 Stunden) wird der Inhalt des Kolbens in die Kultur 30 bis 50 Mal mehr aufgenommen. Dieser Prozess wird wiederholt, bis die Impfkultur ein Volumen von 2 bis 5% von der Hauptkultur erreicht hat. Die Anbaubedingungen des Samens müssen in der Regel steril sein. Das Substrat hat zwischen 13 und 17 % (w/w) Zucker. Normalerweise wird das Substrat mit einer Temperatur zwischen 25 und 30°C zudosiert. Am Beginn der Gärung wird die Temperatur langsam auf 30 bis 35°C erhöht, dann wird die Kühlung eingeschaltet um die Temperatur konstant zu halten. Die Fermentationszeit, hängt vom Substrat und der Hefeart ab. Nach Abschluss der Gärung wird der Fermentor entleert und alle oben genannten Schritte wiederholt.

b) Prozess "Melle-Boinot"

Dieser Prozess ist eine Verbesserung des konventionellen diskontinuierlichen Prozesses, in dem Hefezellen rückgeführt und die Gärzeit deutlich reduziert wird. Beim Beginn der diskontinuierlichen Fermentation ist ρ zwischen 5 und 10×10^6 /L. Bis zum Ende wird ein Wert von 100×10^6 /L erreicht. Bei der diskontinuierlichen Gärung ist die Rate der Ethanolproduktion proportional zur Zelldichte. Am Anfang bei der diskontinuierlichen Fermentation ρ niedrig. Einige Zeit vergeht, ohne dass nennenswerte Produktmengen erzeugt werden. Im Melle-Boinot's Prozess wird etwa 80% der Hefezellen vom Fermentorausgang zentrifugiert und in den Fermentor zurückgegeben. Am Anfang der Fermentation gibt es folglich hohe Zelldichten und die Gärung ist viel schneller als bei der diskontinuierlichen normalen Gärung abgeschlossen.

c) einfache kontinuierliche Gärung

Bevor das sterile Medium möglich wäre, müssten alle Versuche unternommen werden, eine alkoholische Gärung anzuhalten, da eine Kontamination nicht erfolgreich wäre. Mit den Methoden der kontinuierlichen Sterilisation des Mediums war das Problem der Kontamination gelöst. In Europa und Japan gibt es viele Ethanolproduzenten. In diesem Prozess werden kontinuierlich sterile Substrate in den Fermentor gepumpt. Bei der kontinuierlichen Gärung wird das Substrat von oben zudosiert. Die Ethanolkonzentration des Ausgangstroms ist gleich wie die innerhalb des Fermentors. Wenn eine hohe Konzentration von Ethanol erwünscht ist, wird die Gärung verlangsamt um somit zu einer hohen Ethanolkonzentration zu gelangen. Die Intensität der Substratdosierung sollte so

eingestellt werden, dass die neuen Zellen in der Lage sind als Ersatz für die Ausgangszellen heranzuwachsen. Das Rühren der Kultur im kontinuierlichen Prozess ist sehr wichtig, da sonst ein schneller Substratverbrauch verursacht wird und die Verweilzeit sich verkürzen würde.

d) kontinuierliche Gärung mit Hefe -Rückführung

Der Prozess ist ähnlich wie der kontinuierliche Prozess, nur mit dem Unterschied, dass die Hefe vom Ausgangsstrom über einen Separator rückgeführt wird. Die Effizienz des Systems hat als einfacher kontinuierlicher Prozess erheblich zugenommen.

e) Mehrstufiger kontinuierlicher Prozess

Dieser wird angewendet, wenn der vollständige Verbrauch von Substraten und eine hohe Ethanolkonzentration erwünscht sind. Es werden Fermentoren in Serie verwendet. Zum Beispiel, wenn die beiden Fermentoren in eine Serie verbunden sind, kann die Verweilzeit so gewählt werden, dass nur ein Teil des Zuckers verbraucht wird. Im zweiten Fermentor wird die Gärung beendet. So wird die Ethanolinhibition im ersten Fermentor reduziert und die Substrate können schneller zudosiert werden. Der zweite Fermentor begegnet einer Ethanolinhibition, weil ein Teil der Zucker im ersten Fermentor metabolisiert wurde. Die Kapazität kann höher sein als bei einem einzelnen Fermentor. Daher kann bei in Serie auftretenden Fermentoren die Produktivität erhöht werden.

f) Prozess Biostill

Biostill ist ein modifizierter, kontinuierlicher Prozess mit Biomasserückführung. In diesem Prozess wird das Fermentationsmedium durch eine kontinuierliche Zentrifuge (für die Beschaffung von Hefezellen) in eine Destillationskolonne geführt. Ein Großteil vom Ethanol wird darin isoliert und der Rest des Zuckers und andere Verbindungen in den Fermentor rückgeführt. Die Ethanolkonzentration im Fermentor kann in jeder Ebene (die nicht Inhibitor wird), mit Regulierung des Rückgabestromes konstant gehalten werden. Bei größerer Rückgabe des Flüssigkeitsstromes im Fermentor wird das Medium verdünnt und so können dicke Substrate verwendet werden. Die Vorteile dieses Verfahrens sind ein geringer Wasser- und Stromverbrauch. Das Medium wird durch die Destillation sterilisiert und somit die Wahrscheinlichkeit einer Systemverschmutzung reduziert. Obwohl es in diesem Prozess schwierig ist die Ethanolinhibition zu beseitigen, werden trotzdem allmählich toxische Verbindungen gebildet, welche den Prozess begrenzen können.

2.3.2. - Solid-State-Fermentation

Der Begriff Solid-State-Fermentation wird meist bei anderen Prozessen verwendet. Die genaue Bedeutung dessen ist noch nicht klar. Dieser Begriff bezieht sich auf das Wachstum von Mikroorganismen auf Feststoffen ohne die Anwesenheit von freiem Wasser. Feuchtigkeit wird entweder vom Feststoff absorbiert, oder ist mit dem komplexen Netzwerk verbunden. Die Solid-State-Gärung ist nicht immer die Fermentation von Feststoffen in flüssiger Phase. Es gibt keine genaue Definition für eine bestimmte Grenze des festen Zustandes der Flüssigkeit. Die endgültige Maß an Feuchtigkeit in Solid State ist abhängig von der Absorption eines beliebigen Substrates. Zum Beispiel Rinde von Ahorn, wo freies Wasser mit 40% Feuchtigkeit und Stroh mit einem Niveau von 75% auftreten können. Da fast alle biologischen Aktivitäten unter 12% Feuchtigkeit gestoppt werden, ist dies das Minimum bei der Solid-State-Fermentation. Wenn der Gehalt an Feuchtigkeit dem Substrat sehr nahe ist, wird die mikrobiologische Aktivität verzögert. Aufgrund des geringen verfügbaren Wassers in der Solid-State-Fermentation sind die am besten geeigneten Mikroorganismen Pilze. Auf die gleiche Weise kann das Wachstum von Pilzen gesehen werden. [7]

2.3.2.1. - Besonderheiten einer Solid-State-Fermentation und einer Submerged Fermentation

- a) Das Medium bei der SSF ist nicht flüssig, das bei der SF hingegen schon.
- b) In der Regel ist das Medium bei der SSF nicht tief, aber das Medium bei der SF ist immer tief.
- c) Ein festes Substrat, das in Wasser unlöslich ist, die Quelle von Kohlenstoff und Stickstoff darstellt, enthält Mineralien und Enzyme bei der SF, aber unterschiedliche Materialien, die in Wasser löslich sind, werden für diesen Zweck verwendet.
- d) Das feste Substrat absorbiert Feuchtigkeit aus seiner Umgebung und von diesem feuchten Substrat werden Materialien absorbiert. Bei der SF sind die Nährstoffe im Wasser löslich weshalb es zur Absorption kommt.
- e) Wenn die Gärung fortschreitet erhalten die Lebensmittel einen Konzentrationsgradienten, aber zu jeder Zeit der Gärung werden bei der SF Lebensmittel sofort in der Umwelt verteilt.
- f) Wasser steht nur für das Wachstum und Metabolismus von Mikroorganismen zur Verfügung. Deswegen macht das Wasser nur wenig % des Volumens seiner

Umgebung aus, doch beim SF wird ein höherer Prozentsatz an Wasser der Umgebung benötigt.

- g) Bei der SSF gibt es drei Phasen in der Kultur: fest, flüssig und gasförmig. Bei der SF treten sie nur in flüssiger und gasförmiger Form auf.
- h) Bei der SSF ist die flüssige Phase diskontinuierlich, bei der SF hingegen kontinuierlich.
- i) Nach der SSF werden keine vollständigen Bedingungen vorgelegt, die SF wird aber unter sterilen Bedingungen durchgeführt.
- j) Bei der SSF ist eine genaue Kontrolle aller Parameter mit Ausnahme der Feuchtigkeits- und Sauerstoffkontrolle, sowie der Abkühlung erforderlich, bei der SF hingegen müssen tatsächlich alle Parameter genau kontrolliert werden.
- k) Mehr Impfkultur
- l) Der für das Wachstum und Metabolismus notwendige Sauerstoff wird bei der SSF von der Gasphase versorgt, in der SF hingegen wird der notwendige Sauerstoff in Blasen, die in der flüssigen Phase auftreten, gelöst.
- m) Lüftung, die Sauerstoffzufuhr zu einem metabolischen Wärme und die gasförmigen Produkte aus, aber in SF Lüftung für Temperatur Kontrolle nicht anwendbar ist.
- n) Das Rühren kann bei der SSF notwendig sein, bei der SF ist aber auf jeden Fall eine gleichmäßige Durchmischung notwendig, außer in der anaeroben Vergärung.
- o) Bei der SSF wachsen Hefen und Bakterien an einem Substrat, auf dem sie haften, aber bei der SF werden Hefe und Bakterien gleichmäßig im Substrat verteilt.

- Vorteile einer Solid-State-Fermentation und einer Submerged Fermentation

In Modern Engineering hat SSF einige attraktive Aspekte. Durch den Vergleich dieser Methode mit der Methode Gärtanks, die einen Mixer mit Belüftung enthält, hat SSF folgende Vorteile:

- a) Da kein freies Wasser im Medium vorhanden ist, kann die Proportion des Volumens der Kultur/g Substrate reduziert werden. Das hat folgende Vorteile:
 - In Anbetracht der Effizienz der Ethanolproduktion wird für die Anlagen wenig Platz benötigt.

- Wenig Abwasser wird produziert.
 - In vielen Fällen ist eine Filtration nicht erforderlich, weil die Produkte zur Genüge kondensiert werden (z. B. fermentierte Lebensmittel).
 - Wenn es notwendig ist, Produkte des Substrats zu extrahieren, wird in diesem Prozess im Vergleich zu CSTR weniger Lösungsmittel benötigt. Regovin hat gezeigt, dass zweimal Extraktion mit Chloroform 95% der insgesamt verfügbaren Aflatoxine aus der Fermentation von Reis entfernt wird. Wenn eine Gärung erforderlich ist, wird der Platzbedarf deutlich verringert.
- b) Da die Aktivität von Bakterien mehr Feuchtigkeit braucht, ist bei dieser Art der Gärung eine wesentliche bakterielle Verunreinigung sicher und der größte Teil dieses Prozesses soll nicht steril werden.
- c) Im Gegensatz zu den synthetischen Kulturen wird diese Kultur in natürlicher Form verwendet.
- d) Die Lüftung ist einfach, denn zwischen den festen Partikeln ist bereits Luft vorhanden. Außerdem ist in den meisten Fällen keine Durchmischung erforderlich.
- e) Bei der SSF werden nicht nur materielle Volumen reduziert, sondern es werden auch schädliche Mikroorganismen abgetötet weshalb keine Gerüche entstehen und das Insektenwachstum verhindert wird.
- f) Die SSF wurde in einen diskontinuierlichen Prozess implementiert.
- g) Da Sporen direkt in den Tanks verwendet werden müssen, ist eine Vorbereitung für das Impfmateriale nicht nötig.
- h) Da die Körner in vollem Umfang genutzt werden, sind in der Regel Zusatzstoffe nicht erforderlich.
- i) Die Bedingungen für das Pilzwachstum sind den natürlichen sehr ähnlich. Unter diesen Umständen ist es einfach, Sekundärmetaboliten auf Wunsch herzustellen. Unter diesen Bedingungen (es wird ohne Wasser gearbeitet) ist weniger Verschmutzung zu erwarten.

Nachteile einer Solid-State-Fermentation

- a) Die Mikroorganismen, die für die SSF verwendet werden, sind in der Lage, mit geringer Feuchtigkeit zu wachsen. Solche Mikroorganismen sind Pilze, Hefe,

Streptomyces. Wenn Mikroorganismen freies Wasser benötigen, werden große Tanks mit Flüssigkulturen verwendet.

- b) Beim Up-Scaling muss die Wärme aus der mikrobiellen Atmung beseitigt werden.
- c) Der CSTR Begrenzungsschritt der Geschwindigkeit ist der, bei dem durch Sauerstoffübertragung aus Luftbläschen eine flüssige Masse erstellt wird, damit dieser Parameter mit verschiedenen Variablen gesteuert werden kann. In der SF-Phase findet der Sauerstofftransport in die Flüssigkeit nur langsam statt, wodurch die Geschwindigkeit begrenzt wird. Um diese Geschwindigkeit zu erhöhen, muss die Drehzahl der Rührung erhöht werden. Der Geschwindigkeitsbegrenzte Schritt bei der SSF ist der Stofftransport zwischen Partikeln, was mit sorgfältiger Vorbereitung des Substrats vor Eintritt der Gärung (z.B. Körner zersplittern, Reis dampfen, etc.) kontrollierbar ist, und wodurch die Wirkung dieser Stufe geringer wird. Mit den heutigen Technologien sind jedoch die molekularen Stofftransporte während der Gärung schwer zu kontrollieren.
- d) Messung der Feuchtigkeit, pH-Wert, Sauerstoff, Kohlendioxid und Effizienz sind bei einem SSF-Produkt schwierig.
- e) Westliche wissenschaftliche Informationen sind in japanisch verfügbar.
- f) Die Anzahl der geimpften Sporen sollte sehr hoch sein.
- g) Die oben genannten Punkte werden Ingenieure helfen, für den SSF-Prozess die geeignete Methode zu finden. Kurz, wir können sagen, dass die Solid-State-Fermentation Vorteile wie geringes Volumen des Fermentors, einfachere Vorbereitung, weniger Verschmutzungsprobleme und wenig Abwasser hat. Der wichtigste Nachteil der Solid-State-Fermentation ist das begrenzte System für die Mikroorganismen die bei niedriger Feuchtigkeit wachsen. Die Wärmeentfernung, die während der Gärung produziert wird, ist schwer, da die Gärung kein bestimmtes Kriterium für das Prozess-Design darstellt. [2]

2.3.2.2. – Substrat Eigenschaften in Solid-State-Fermentation [7,19]

Feste Substrate und deren Eigenschaften beeinflussen den Erfolg der SSF wesentlich. Die Eigenschaften des festen Substrats kann verändert werden, damit es für den Prozess geeignet wird. In diesem Abschnitt werden die allgemeinen Merkmale der Substrate die bei der SSF verwendet werden, diskutiert.

- a) Enzymproduktion

Die Substrate der SSF haben die Gemeinsamkeit, dass ihre Moleküle groß sind. Da keine Mikroorganismen in der Lage sind Makromoleküle zu absorbieren, ist es notwendig Exo-Enzyme in das Medium zu sekretieren bis eine Absorption möglich wird. Dieses biopolymere Material kann nicht selbst in Zellen eindringen um die Enzymproduktion zu stimulieren, weshalb folgende Methoden zur Induktion von Enzymproduktionen angewendet werden:

- Die endgültige Enzymproduktion führt zur Produktion niedermolekularen Produkten, die verstärkt die Enzymproduktion anregen.
- Niedermolekulare Verbindungen, die normalerweise mit der Biotechnologie polymer verbunden sind, können anregend wirken.

b) Partikelgröße

Die Solid-State-Fermentation wird in erheblichem Maße vom Stofftransport kontrolliert. Ein wichtiges Ziel besteht darin, dass die Geschwindigkeit des Massentransfers von Substraten zur Biokatalyse steigt, bis dieselbe Geschwindigkeit des Massentransfers vom Substrat zum Produkt erreicht wird. Rohstoffe werden zu diesem Zweck immer gesplittet und Mikroorganismen gleichmäßig verteilt.

Die Partikelgröße ist in der SSF sehr wichtig, weil sie die Ebene/das Volumen beeinflusst. Die Ebene/das Volumen zeigt den Anteil des Substrats, das am Anfang für Mikroorganismen verfügbar ist, an. Ebenfalls erforderlich ist, dass die Korngrößen gleich sind. Reis oder Weizenkleie sind daher ideal. Ebenfalls erforderlich ist, Sojabohnen in 5 bis 6 Teile zu zerkleinern. Für die Kontrolle der Teilchengröße wird ein Filter mit einer speziellen Porengröße verwendet. Für den Vergleich der Teilchengrößen unter den Teilchen, die nicht den gleichen Formfaktor haben, kann das Volumen/die Ebene verwendet werden. Auch die Partikelgröße zeigt den Raum zwischen den Teilchen. Die aerobe Kultivierung für den Sauerstoffeinfluss auf die Zwischenräume der Teilchen ist sehr wichtig. Das Substrat, das oft in der SSF verwendet wird, sollte vor seiner Verwendung in Stückchen geteilt werden. Aufgrund zu hoher Kosten dieses Prozesses sollte eine zulässige Grenze für die Partikelgröße der Gärung gefunden werden. Diese Grenze muss für verschiedene Systeme unterschiedlich hoch sein.

c) die Teilchen

Neben der Partikelgröße wird die Form der Teilchen auf der Ebene/dem Volumen zwischen den Teilchen und das Eindringen von Sauerstoff zwischen den Teilchen beeinflusst. Die Lüftung durch das feste Substrat soll nicht gestört werden. Wenn das

Substrat durch das Mycel verbunden wird oder die Partikel klebrig sind, wird die Luftströmung verhindert. Reis mit einer Luftfeuchtigkeit von etwa 28% ist ideal, weil unter diesen Bedingungen die Substratoberfläche getrocknet wird und eine bakterielle Kontamination verhindert wird. Darum ist der Reis ideal, in den die Sporen leicht eindringen. Wenn Mais oder Soja verwendet wird, sollte das Korn zuerst zerkleinert werden.

d) Teilchen-Porosität

Die Porosität der Teilchen ist für die Einschätzung des Einflusses der Mikroorganismen oder deren Exo-Enzyme von großer Bedeutung. Je höher die Porosität ist, umso leichter können die Mikroorganismen oder Enzyme eindringen. Pflanzliche Zellwände sind für Mikroorganismen nicht durchlässig. So ist das Zerschneiden von Zellwänden für das Eindringen der Mikroorganismen in die Pflanze notwendig.

e) Teilchendichte

Dieser Parameter hängt von dem Teilchen ab, welche Oberflächeneigenschaften sie besitzen; Insbesondere Adhäsion, Festigkeit der Partikel und der Prozentanteil der Feuchtigkeit des Substrates. Andere Oberflächeneigenschaften wie elektrochemische oder hydrophobe Eigenschaften sind für den Kontakt zwischen den Mikroorganismen und der Substratoberfläche wichtig. Das verbrauchte Volumen des Substrates in der SSF sollte im Vergleich mit der Containergröße nicht groß sein, da sonst die Lüftung nicht ausreicht.

Kultur Vorbereitung:

Anders als bei der Fermentation im flüssigen Zustand, ist bei der Solid-State-Fermentation eine eingehende Vorbereitung des Mediums nicht erforderlich. Die meisten Substrate enthalten bereits alle notwendigen Nahrungsmittel für die Gärung, in einigen Fällen enthalten sie sogar Mikroorganismen.

Da der Stofftransport innerhalb der Partikel und deren Zwischenräume in der Solid-State-Fermentation wichtig ist, wird eine physikalische Substratveränderung sinnvoll damit der Widerstand für den Stofftransport minimiert wird. Wenn zum Beispiel das gewünschte Substrat Reis ist, ist es notwendig diesen zu bedampfen und wenn es Mais ist, wird dieser langsam zerkleinert. Falls das Substrat städtischer Müll ist, sollte dieser permanent werden. (nicht-organische Stoffe sollen entfernt werden).

In einigen Fällen, Inhalt des Substrats ist nicht proportional. Zum Beispiel sollte für die Herstellung von Kompost Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis 20 sein. In Nordamerika

aufgrund der großen Anzahl von Altpapier das variiert zwischen 20 und 70. Unter diesen Umständen ist die zusätzliche Stickstoff-Quelle fügte hinzu damit die Gärung beschleunigt wird (z. B. Klärschlamm). Es ist erwähnenswert, dass der Wassergehalt ebenfalls optimiert werden muss.

2.3.2.3.-Bei der Solid State Fermentation kann unterschieden werden wie folgt: [19]

1. Fermentation ohne mischen
2. Gärung mit kontinuierlichem Mischen, das in vier Gruppen unterteilt werden kann:
 - A) Gärung ohne Belüftung unter Druck
 - B) Gärung bei langsamen und kontinuierlichem Rühren ohne Belüftung unter Druck
 - C) Gärung mit Belüftung unter Druck
 - D) Gärung bei langsamen und kontinuierlichem Rühren mit Belüftung unter Druck

2.3.2.4. - Bio Reaktortypen

Viele Solid-State-Gärungen treten in großem Maßstab bei dem zylindrischen Fermentor und dem in Tablettform auf. [1,19,26]

a) Fermentoren in Tablettform

Die einfachsten Arten der Fermentoren sind aus Holz, Metall (Aluminium und Eisen) oder Kunststoff. Die Fermentortiefe sollte so eingestellt sein, dass die Luft einfach unter das Substrat geht. Zwischen den Tablett soll ein bestimmter Abstand sein. Die Gärung erfolgt unter solchen Bedingungen, dass die Luftfeuchtigkeit kontrolliert und die Betttemperatur mit warmer oder kalter Luft reguliert werden kann. Vor tausenden Jahren wurden Tablett in Japan und vor dreitausend Jahren in China für die Herstellung von Sojasoße verwendet.

b) Zylindrischer Fermentor

Der Reaktor besteht aus einem zylindrischen Fermentor mit rotierenden Maschinen und einem Eingang und Ausgang für die Luft. Die Lufteingangsrohre werden entweder in der Mitte oder am Boden des Fermentors angebracht. So ein Fermentor ist für die Belüftung unter Druck geeignet.

Das Substrat wird in zylindrischen, rotierenden Fermentoren gemischt und beträgt etwa 1 bis 10 U/min, was von der Gärung der Merkmale abhängt. Aber es wurde bereits von höheren Geschwindigkeiten berichtet. Einer der Nachteile einer hohen Geschwindigkeit des Rührens ist der Schaden für Pilze. Ein weiterer Nachteil dieses Fermentors ist, dass die Kontrolle dessen schwierig ist, da die Substratteilchen in verklumpter Form auftreten.

c) Fermentorspalte

Wie der Name schon sagt, entsteht eine Spalte bei Glas oder Kunststoff, die doppelte Wände haben, indem die Wasserrotation mit der Temperatur kontrolliert wird, oder es entsteht eine Spalte in einem Wasserbad, das mit der Temperatur kontrolliert wird. Fermentoren dieser Art werden für Laboruntersuchungen verwendet.

2.4. - Die Geschichte der Ethanolproduktion mit der Solid-State-Fermentation

Für die Ethanolproduktion wird der normale Prozess, wie zum Beispiel bei Zuckerrüben, verwendet. Hoch entwickelte Geräte werden für das Extrahieren und Abnehmen von Fiber benutzt, bis eine Zuckerlösung gewonnen und mit der Submerged-Methode vergoren wird. Die industrielle Zuckergewinnung aus Rohmaterialien ist bei fortgeschrittenen Einheiten nur bis zu 95% vollständig möglich. Bei kleineren Einheiten bis zu 90%. Die Vorbereitungs- und Ausrüstungskosten für die Gewinnung von Zuckerlösung beträgt mehr als 50% der gesamten Kosten der Ethanolproduktion. Die Rohstoffe, Zusatzstoffe und die Anlagenabnutzung betragen 24% der endgültigen Kosten der Ethanolproduktion. Bei der Solid-State-Gärung ist es unter optimalen Bedingungen möglich bis zu 99% der Zuckerverbindungen mit sechs Kohlenstoffatomen des Rohstoffs zu verwenden. Der Zweck einer Anwendung der Solid-State-Fermentation für die Ethanolproduktion kann eine Minimierung der Kosten bei der Zuckerextraktion von Rohstoffen sowie eine Reduktion der Kosten bei der Abwasserbeseitigung sein.

2.4.1. - Laborforschung von Ethanolproduktionen

1. Hang hat sehr viele Tests für die Verwertung der Wertstoffe von Trauben-Pulpe durchgeführt. [27] Ihm zufolge können Kohlenhydrate durch die Solid-State-Fermentierung in Zitronensäure oder in Ethanol umgewandelt werden. Tartrate und Anthocyane können in der Pulpe mit Extraktionsverfahren extrahiert werden. Der Rest ist eine Lignozellulosemischung aus der mit anaerober Vergärung Methan produziert werden kann.
2. Hang und Wooden haben die Möglichkeit, Ethanol durch Fermentation im festen Zustand zu produzieren [27], geprüft. Die Rebsorte Trester besteht aus 13.7% Zucker, 64.4% Feuchtigkeit und hat einen pH-Wert von 3.6. Vier Arten von Hefe werden bei der

Gärung verwendet. Für die Fermentation wurden 1kg eines Zellstoffs mit 25mL Hefeimpfung (4g Trockenhefe) gemischt, in einem 2L-Kolben inkubiert und bei einer Temperatur von 25°C über einen Zeitraum von 96h gegoren. In diesem Forschungsprojekt wurde eine natürliche Gärung (ohne Zugabe von Hefe) durchgeführt. Um den Effekt der Temperatur zu sehen, wurde die Gärtemperatur auf 18°C herabgesetzt. Der hergestellte Alkohol wurde mit Wasser extrahiert und mit Gaschromatographie analysiert. Der restliche Zuckergehalt des Gärungsmediums wurde anhand der Phenol-Schwefelsäure-Methode gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Gärgeschwindigkeit bei einer Temperatur von 25°C höher als bei 18°C ist. Bei 25°C ist die Gärung nach 48h abgeschlossen. In diesem Experiment stieg die Zahl der Hefe von 10^5 auf 10^7 pro g Pulpe.

3. Forscher haben auch die Ethanolproduktion durch Apfelpulpe mit der Solid-State-Fermentation [28] geprüft. In diesem Test ist eine alkoholische Gärung Standard. Er wird mit einer 2L-Flasche mit 800g Pulpe und 25mL Hefeimpfung durchgeführt. Die Hefeinkubationstemperatur beträgt 30°C, weiterhin wird in einem Zeitraum von 96h gegoren. Nach der Vergärung, wurde Alkohol aus der Gärung extrahiert und mit Gaschromatographie gemessen. Der restliche Zucker der Gärung wurde wiederum mit Phenol-Schwefelsäure gemessen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die natürliche Gärung von Apfelpulpe zur Produktion von kleinen Mengen von Alkohol führt. Für die Herstellung von Alkohol müssen Hefezellen in das zu vergärende Medium aufgenommen werden. Die Temperatur hatte einen großen Einfluss auf die Vergärung: Bei einer Gärtemperatur von 30°C wurde viel mehr Alkohol produziert als bei 15°C und 25°C. Die Rohproteinmenge der Pulpe betrug vor der Gärung 6%, nach dem Abschluss der Gärung erhöhte sie sich auf 9%.
4. Correia und Ngadi prüften mit der Solid-State-Fermentation die Ethanolproduktion von Apfeltrester in einem diskontinuierlichen, biohorizontalen Reaktor mit 40L Fassungsvermögen [25]. Ihr Ziel war es, die anfängliche Wirkung der Feuchtigkeit und das Tempo des Mischens auf Ethanolproduktion lag. Einige Tests für Apfelpulpe wurden mit 77 und 85% Feuchtigkeit und einer Geschwindigkeit von 2, 20 und 40 U/min durchgeführt. Der verwendete Mikroorganismus, Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ATCC24702, wurde bei einer Temperatur von 30°C und einer Zeit von 72 Stunden gegoren. Die Ergebnisse zeigten, dass bei einer Feuchtigkeit von 85%, 19.26% Ethanol aus der trockenen Pulpe gewonnen wurde. Bei einer Feuchtigkeit von 77% wurden 18.1% Ethanol gewonnen. Die durchschnittliche Konzentration von Ethanol während der Gärung für die Dauer von 2 und 20 U/min betrug 10.78 und 10.27% der trockenen Pulpe und für 40 U/min, 9.3%.

5. Tiwari, Pathak, Gupta überprüften auch die Effizienz der Hefe, bei Hinzufügen verschiedener Quellen von Stickstoff und Phosphor, auf Alkoholproduktionsrate von Apfeltrester wie bei der Solid-State-Fermentationsmethode [30]. Für die Gärung wurden 50g Apfel in einem Kolben mit 250ml Fassungsvermögen gegeben und der pH-Wert auf 4.5 gesetzt. Der Inhalt des Kolbens wurde bei einer Temperatur von 115°C über 30 min lang sterilisiert. Nach der Zugabe von 10mL Impfkultur, wurde die Temperatur auf 28°C erhöht und der Inhalt 48 Stunden lang gegoren. Nach der Gärung wurde das Medium zur Bestimmung der Alkoholproduktion und des Zuckerrestes analysiert. Es wurden die Hefen *S. diastaticus*, *S. cerevisiae*, *Pichia Ferment*, *Candida utilis*, *C. nopicalis* getestet und ebenso ihre Wirkung auf alle Ressourcen wie Harnstoff-Stickstoff, Phosphor-, Pepton-, Nitratsodium, Ammoniumnitrat und Ammoniumdihydrogenphosphat untersucht. Auf der Grundlage dieser Forschungsergebnisse, bei 100g Apfelpulpe mit einem Zuckergehalt von 10%, wurden die Alkoholmengen gemessen:

| | |
|-----------------------|-------|
| <i>S. diastaticus</i> | 2.8 % |
| <i>Pichia Ferment</i> | 2.3 % |
| <i>C. tropicalis</i> | 1.0 % |
| <i>S. cerevisiae</i> | 2.6 % |
| <i>Candida utilis</i> | 2.1 % |

Höhe der Alkohole, die durch die Addition von verschiedenen Stickstoffquellen für *S. cerevisiae* produziert wurden:

| | |
|-------------------------------|-------|
| Urea | 4.3 % |
| Pepton | 4.0 % |
| Natriumnitrat | 4.5 % |
| Ammoniumnitrat | 4.7% |
| Natriumsulfat | 4.5% |
| Proben ohne Stickstoff-Quelle | 4.0 % |

Höhe der Alkohole, die durch Hinzufügen der verschiedenen Quellen von Phosphor für *S. cerevisiae* produziert wurden:

| | |
|------------------------------------|-------|
| Natriumhydrogen-Phosphat | 3.7 % |
| Di-Natriumhydrogenphosphat | 3.8 % |
| Kaliumdihydrogenphosphat | 4.0 % |
| DiKaliumhydrogenphosphat, | 4.6 % |
| Ammoniumdihydrogenphosphat | 5.4 % |
| Proben ohne hinzufügen eine Quelle | 3.4 % |

- Die Ethanolproduktion von Traubenabfällen wurde mit dem Solid-State-Fermentations-Verfahren untersucht. Es stellte sich heraus, dass der Trauben-Trester aus den Fabriken mit Hefe *Sacharomyces cerevisiae* etwa 25g Ethanol pro kg Traubentrester erzeugt. Etwa 90% des Zuckers wurde im Trester verbraucht. In dieser Studie wurden die wichtigsten Parameter für die Ethanolproduktion optimiert.

Auch die Ethanolproduktion aus Apfelabfällen mit der Solid-State-Fermentations-Methode wurde untersucht. 25g Ethanol kann pro kg Apfeltrester produziert werden [1].

3 MATERIALIEN & METHODEN

3.1. Materialien

3.2. Vorbereitungsmethoden

3.3. Messmethoden

3.1. Materialien

3.1.1. Mikroorganismen

Bei diesem Projekt wird für die Gärung die Hefe-Sorte *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Die Sammlungen der Hefestämme wurden vom Engineering Research Center of Biochemistry and Environmental Control Sharif University angelegt und nach dem Verstärken auf dem Agrarnährboden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.1.2. Chemische Materialien

Arten von Obst (Äpfel, Karotten, Trauben, Aprikose, Birne)

1 N HCl

Konzentrierte Schwefelsäure 98 %

Ethanol 99.5 %, zum Kalibrieren

Materialien, die zur Anreicherung verwendete Medium: Ammoniumsulfat, Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat

PDA

Pepton und Dextrose

Glucose für die Kalibrierung

Dinitrosalicylsäure, Natrium und Kaliumtartrate

Kaliumdichromat

Natriumcarbonat

$\text{CuSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

Wasser HPLC

Ammonium Molybdat

Na_2SO_4

3.1.3. Laborinstrumente

Erlenmeyerkolben Gärbehälter mit 250ml Fassungsvermögen

Zubehör Destillation (Kältemittel und die gemeinsame Schnittstelle Klayzn)

Pipetten (1, 2, 5 und 10 mL)

Milipore hoch für Mikroben aus der Flüssigkeit Umwelt isoliert

Sampler (Mikropipette) 250µL

3.1.4. erforderliche Apparate

- Ausstattung HPLC Wasser
- Digital Inkubator
- Spektrophotometer
- Avan
- Hood sterile Sterilbank
- Mikroskop
- Digitale Waage
- pH-Meter
- Autoklav
- Vakuumpumpe
- Wasserbad
- Heizrührer

3.2. Vorbereitungsmethoden

3.2.1.1. Fruchtzubereitungsmethode

Abfälle von Obst- und Gemüsemärkten wurden vorbereitet und in Formen mit einer durchschnittlichen Abmessung von 3 × 3 mm gebracht. Die Konzentration von

Fruchtzucker wurde mit der DNS- und HPLC-Methode vermessen und der pH-Wert der vorbehaltenen Früchte durch HCl (1 N) auf ungefähr 4.5 ermittelt. Dann wurden entsprechende Mengen an Proben in Plastiksäcken eingefroren aufbewahrt. Für spätere Tests wurden diese Proben bei 4°C im Kühlschrank wieder aufgetaut.

3.2.1.2. Methode der Zubereitung Slant Medium

Für den PDA-Bau des Pulvermediums wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 39 g/mL vorbereitet. Der pH-Wert ist bei 25°C 5.6. Nach dem Kochen und der Auflösung wurden einige mL Medium in jedes Glasröhrchen gegossen und bei einer Temperatur von 121°C 15 Minuten autoklaviert. Um schräge Medien vorzubereiten, wurden vor dem Abkühlen der Lösung die Reagenzgläser in die Diagonale gelegt. Nach dem Abkühlen wurde eine vollständige Loop auf die Mikroorganismen kultiviert. Die *Saccharomyces cerevisiae* Slant wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.1.3 Methode der Vorbereitung vor dem Einpflanzen

Vor dem Einpflanzen wurde eine Sabouraud-Dextrose-Agar-Lösung verwendet. Um diese Lösung zuzubereiten, wurden 40g Dextrose und 10 g Pepton zu 1L destilliertem Wasser zugegeben und vollständig gelöst. Dann wurde der pH-Wert mit Hilfe 1 M HCl auf 4.5 gesetzt. Das Medium wurde eine halbe Stunde lang bei 115°C sterilisiert und nach dem Abkühlen mit einer 24-Stunden-Hefe-Kultur geimpft. Ein Loop wurde bei 28°C für 24 Stunden in einem Inkubator gewonnen.

3.2.1.4. Methode der Zubereitung des Mediums

Es wurden 50g Obst in einen 250-ml-Erlenmeyer-Kolben gegossen und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 4.5 gesetzt. In dieser Phase wurden 3.5 mL Impfkultur (eine Konzentration von 3.5×10^6 Zellen/mL) in jede Flasche hinzugefügt. Um anaerobe Bedingungen zu schaffen, war der Mund des Erlenmeyer-Kolben mit Watte bedeckt. Bei einer Temperatur von 28°C \pm 2°C für 22 Stunden wurden sie ohne durchgerührt zu werden in Inkubatoren gegoren. Nach der Gärung wurden etwa 50 mL destilliertes Wasser zu der Mischung zugegeben und die Gärung bei einer Temperatur von 100°C in einem Vakuum-Destillation-Pot durchgeführt, bis sich das Ethanol von der Probe trennte. Das Ethanol wird vom Endprodukt aus dem Destillat und Restzucker des Zellstoffs bestimmt.

3.2.2. Messmethoden ^[5]

3.2.2.1 gemessene Feuchtigkeit in %

Das Feuchtigkeitsmessen durch hohe Temperatur wird für bestimmte Arten von Lebensmitteln verwendet, insofern sich die Qualität der Temperatur nicht ändert. Bei

dieser Methode wird in der Regel eine Temperatur zwischen 100 und 105°C verwendet. Eine chinesische Kapsel wird eine halbe Stunde bei einem 105°C heißen Ofen gegeben und nach dem Abkühlen und Wägen derer eine bestimmte Menge von Proben, komplett einheitlich, in den Gießofen zugegeben. Das Ende der Versuchszeit tritt dann ein, wenn zwei selbe Gewichte hintereinander folgen. Nach dem Abkühlen und Wägen der Probe wird die Feuchtigkeit in Prozent berechnet vermutlich aufgrund der Änderung der Temperatur im Obst. Der Test wurde mit einer Temperatur von 60 bis 70°C und in Vakuum wiederholt, doch die Auswertung der Ergebnisse war bei beiden Verfahren gleich.

3.2.2.2. Zuckermessung

Um die Menge der Kohlenhydrate zu messen, müssen sie erst aus der Obstmischung entnommen werden. Zu diesem Zweck wurden 5g der Mischung in 50 mL destillierter Wasserlösung gegeben und 20 Minuten lang auf eine Heizung mit Magnet gemischt und anschließend auf das Filterpapier übergeben. Die lösliche Oligosaccharide wurde aus der Obstmischung entnommen.

3.2.2.2.1. Messmethode Dinitrosalicylsäure Glucose

Mit dieser Methode wird der Zucker mit dem reduktivem Ende gemessen.

Hilfs- und Betriebsstoffe:

Die DNS besteht aus Na K Tartrat, Merck NaOH, Dinitrosalicylsäure, Glucose, Reagenzglas Pipetten und Spektrophotometer

1. Vorbereitung des Reagenz-Lösung

DNS - Zutaten: 100 ml Reagenz-Vorbereitung:

- Natrium und Kalium Tartrat: 30 g
- NaOH: 1.6 g
- Dinitrosalicylsäure: 1 g (25 g Pakete zum Verkauf)

In 100 ml Ballons José wurden 1.6g NaOH geleert und 20 mL Wasser hinzugefügt. Nach der Auflösung der NaOH, wurde 1g DNS aufgelöst. Dann wurden allmählich 30g, Natrium und Kalium Tartrat dazugemischt und aufgeheizt und mit destillierter Wasserlösung aufgelöst. Das Volumen von 100 mL verdoppelt sich fast.

2. Probenvorbereitung

Bei der Vorbereitung der Kalibration Standardlösung wird Glucose mit einer Konzentration zwischen 0.1 bis 5 g/L genutzt. Es ist besser die Probe auf diese Konzentration zu verdünnen.

3. Die Reaktion von Proben und Reagenzien

1 mL dieser Lösung wurde in ein 25 mL Reagenzglas gegossen und die vorbereiteten Proben mit Hilfe einer Mikropipette mit 250 μ L hinzugefügt. Das Reagenzglas sollte für 5 Minuten in kochendes Wasser gehalten werden. Dadurch wird die DNS-Reaktion mit dem reduktiven Ende abgeschlossen und erhält seine rote Farbe. Die Intensität der Farbe ist von der Glucosekonzentration abhängig. Nach 5 Minuten wird das Wasser im Reagenzglas sofort mit Eis vermischt, um andere Reaktionen zu stoppen. Dann werden 10 mL Wasser in das Reagenzglas hinzugegeben.

4. Ablesen der Absorption

Durch die DNS-Reaktion entsteht eine Absorption mit einer Wellenlänge von 540 nm. Das Spektrometer kann in dieser Wellenlänge aufsetzen. Aufgrund der farbigen Proben ist das Kalibrieren des Spektrometers notwendig. Dabei soll die verdünnte Probelösung ohne der DNS-Reaktion eingesetzt werden. Falls die Intensität über den Bereich der Absorptionsintensität der Kalibrierkurve ist, wird sie im angemessenen Verhältnis mit Wasser verdünnt, die Intensität der verdünnten Konzentration und Absorption wird aus der Kalibrierkurve gelesen. Diese wird anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

.5. Versorgung Kalibration Kurve

Zur Herstellung von Kalibrierkurven von fünf Glucose-Proben bereitete Merck in destillierter Wasserlösung verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0.1 bis 5g/mL vor. Er bereitete bei 100 ml eine Glucoselösung von 5g/L vor und verdünnte sie dann in den Verhältnissen: 1:2 1:5, 1:10, 1:20. Daraufhin wird der dritte und vierte Schritt wiederholt. Die abgelesenen Werte werden in eine Excel-Tabelle eingetragen. Die Daten müssen auf einer geraden Linie liegen. Eine Abweichung von der geraden Linie stellt einen Fehler dar.

6. berechnen der Konzentration von reduzierenden Zuckern in den Proben

Die umgekehrte erste Verdünnung \times was von der Kalibrierkurve abgelesen werden kann= die ursprüngliche Konzentration des Zuckers der Proben. Glucose, Fructose und Saccharose mit linearen Dextrinen haben ein reduzierendes Ende.

3.2.2.2.2. gemessen Zucker Somogy- Nelson-Methode

a) Die Materialien

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, konzentrierte Schwefelsäure, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, Tartrate: Doppel-Natrium und Kalium, Ammonium Molybdat, Na_2SO_4 .

b) Methoden

1-Vorbereitung Somogy Reagenz (Reagenz A)

Lösung 1: 70g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ und 40g Natrium- und Kalium-Tartrat in 700mL destillierter Wasserlösung auflösen und 100 mL NaOH 1 N wird hinzugefügt.

Lösung 2: bis zu 8g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 80mL destilliertem Wasser lösen.

Die Lösungen 1 und 2 sollen vermischt, verrührt und anschließend erhitzt werden. Danach werden 180g Na_2SO_4 zugegeben und die Mischung mit destilliertem Wasser auf das Gesamtvolumen von 1000 mL gebracht. Diese Lösung sollte in einem lichtundurchlässigen Glasbehälter aufbewahrt werden.

2-Vorbereitung der Nelson-Reagenz (Reagenz B)

50g Ammonium Molybdat in 900mL destillierte Wasserlösung und 21mL Schwefelsäure hinzufügen und rühren. Dann 60g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in 50 mL Wasserlösung und für jede der beiden Lösungen für 24 Stunden bei einer Ofentemperatur von 37°C erhitzen. Diese Lösung sollte ebenfalls in braunem Glas aufbewahrt werden.

3-Zuckerkonzentration in den Proben

Das Säurehydrolyseverfahren wurde für Saccharose verwendet. Zu diesem Zweck werden 2 mL HCL 1N zu einer unbekanntem Probe hinzugefügt und eine halbe Stunde in ein Wasserbad gesetzt, bis die reduktiven Disaccharide vollständig hydrolysiert wird. Nach dem Abkühlen werden 2 mL NaOH 1N hinzugefügt bis sie neutralisiert ist. Dann wird einer der oben gewonnenen Lösung 1 mL Reagenz A hinzugefügt und bleibt für 10 bis 15 Minuten im Wasserbad, um die Reaktion zu vollenden. Nach dem Abkühlen wird 1 mL Reagenz B und 12 mL destilliertes Wasser zugegeben und die entstehende Lösung verrührt, bis sie homogen wird. Dann werden anhand der Höhe der Absorptionswellenlänge von 540 nm alle Daten abgelesen.

4-Vorbereitung der Kalibration

Eine Standardlösung wird nach der DNS-Methode hergestellt und anschließend in Reagenz Absorption abgelesen. (Anhang 1) Der Zuckergehalt wird anhand einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie gemessen.

3.2.2.2.3.Zucker messen mit HPLC

a) Hilfs-und Betriebsstoffe

Glucose, Fructose und Saccharose für die Erstellung einer Standardkurve, Milipore.

b) Methoden

1-Probenvorbereitung

Die Proben zur HPLC-Messung müssen völlig glatt und transparent und frei von Mikroben sein. Aus diesem Grund werden nach den ersten Vorbereitungen die Proben filtriert.

2- Probeninjektionsgerät und alle Peaks

Säulentyp: Zucker Pack Wasser

Detektor: (RI) Brechungsindex

Pumpe: Model 515

Flüssige Phase: Wasser HPLC

Fördermenge: 0.4 mL/min

Temperatur: 70°C

Retentionszeiten:

- Saccharose in 9 Minuten
- Glucose in 11 Minuten
- Fructose in 14 Minuten

Am Ende wird die Fläche unter Peaks berechnet und die Menge von Zucker anhand der Kalibration in der Probe erhalten:

Umgekehrte erste Verdünnung \times Konzentration der Kalibrierkurve = Konzentration von Zucker in der ursprünglichen Probe

3-Vorbereitung der Kalibration

Zur Herstellung der Standardkurve von fünf Proben bereitete Merck Glucose, Fructose und Saccharose separat von Wasser in Konzentrationen von 0.1 bis 5 g/mL vor. Nach der Vorbereitung der Proben sind im Schritt 2 repliziert worden. Schließlich kann an Hand des folgenden Peaks und von den Standardkonzentrationen, die Standardkurve auf der Basisfläche unter den Peaks/Konzentrationen erstellt werden. Nach dem Zusammenschluss wurden drei unbekannte Zuckerkonzentrationen der Kurve hinzugefügt. (Anhang 1)

3.2.2.3 Ethanol messen

Bei diesem Projekt wird Ethanol mit Hilfe von Behältern Coway's spektrophotometrisch und mit der HPLC-Methode gemessen. In dieser Phase werden nach der Gärung zur Obstmischung ca. 50 mL Wasser zugegeben und nach vollständiger Vermischung die Fruchtmischungen bei einer Temperatur von 100°C destilliert. Dann wird der Alkoholgehalt der Proben gemessen.

3.2.2.3.1 Messen von Alkohol mit Cowaybehältern: spektrophotometrische Methode

a) Die Materialien

- Saure Lösung von Kaliumdichromat
- gesättigtes Kaliumcarbonat
- konzentrierte Schwefelsäure

4.9 g Kaliumdichromat wurden in 100 mL destilliertem Wasser gelöst und in ein Wasserbad (0 - 10°C) gesetzt, wobei 278 mL Schwefelsäure hinzugefügt den und das Ganze mit destilliertem Wasser verdünnt wurde.

Zur Vorbereitung der gesättigten Lösung von Kaliumcarbonat wurden 465g in 300 mL destilliertes Wasser mit Wärme gelöst.

b) Methoden

1-Probenvorbereitung

1 mL alkoholische Lösung (Präzision 0.1 %) wurde auf die Innenseite der Behälter gegossen. Dann wurde 1 mL gesättigte Carbonatlösung vorsichtig hinzugefügt. 1 mL saure Kaliumdichromatlösung wurde ebenfalls auf die Innenseite der Behälter gegossen. Die Behälter wurden mit einem Deckel, der mit fettigem Silikon abgedichtet ist, verschlossen, und anschließend geschwenkt, um den Inhalt vorsichtig zu vermengen. Nach 2 Stunden wurde eine Temperatur von 37°C erreicht. Anschließend wurde die Kappe entfernt und 1 mL der Lösung im mittleren Abschnitt sorgfältig herausgenommen und mit destilliertem Wasser auf 10 mL angereichert. Die Absorption der Probe wird bei 480 nm abgelesen. Bei dieser Methode wird eine alkoholische Lösung zu Kaliumdichromat absorbiert, oxidiert und wandelt sich zu Essigsäure und Chromicsäure um. Dadurch wird eine Farbänderung verursacht.

2- Vorbereitung der Kalibration

Reine Alkohollösung (99.5% Alkohol) wird mit destilliertem Wasser verdünnt: 0.1, 0.75, 0.05, 0.025. Alkoholproben werden wie bei Teil 1 in Cowaybehälter gegossen und die Absorption der Proben wird abgelesen und die Kalibration wird laut Konzentration und Absorption aus den Proben ermittelt. Der Prozentanteil von Alkohol wird von den unbekannt Proben aus dem Diagramm herausgelesen. (Anhang 1)

3.2.2.3.2. Messung von Ethanol mit der High-Performance Liquid Chromatography

a) Hilfs-und Betriebsstoffe

99.5%iges Ethanol für die Herstellung einer Standardkurve, Milipore

b) Methoden

1- Probenvorbereitung

Die Proben mit HPLC sollen für die Messung völlig glatt, transparent und frei von Mikroben sein. Aus diesem Grund werden die Proben nach der ersten Vorbereitung filtriert.

2- Probeninjektion und Peak:

Die Voraussetzungen des HPLC-Systems sind wie folgt:

Spalte Typ: Zucker Pac Wasser

Detektor: Brechungsindex-Detektor

Pumpe: Model 515

Flüssige Phase: Wasser HPLC

Fördermenge: 0.4 ml/min

Temperatur: 70°C

Nach dem Einstellen des Gerätes wird eine Probe in das Gerät injiziert. Ein Ethanol Peak war nach 17 Minuten zu sehen.

Zuletzt wird die Fläche nach dem Peak berechnet und der Ethanolwert wird mit Hilfe der Kalibration ermittelt:

Erste Verdünnung umkehren × gelesene Konzentration der Kalibrierkurve = ursprüngliche Ethanolkonzentration in den Proben.

3-Vorbereitung der Kalibration

Zur Vorbereitung der Standardkurve werden für die fünf Ethanolproben 99.5% reiner Alkohol in Wasser mit Konzentrationen von 1.25 bis 40 ml hergestellt. Nach der Vorbereitung der Proben kann Schritt 2 repliziert werden. Schließlich kann mit Hilfe der Fläche des Peaks und der Standardkonzentration die Standardkurve erstellt werden. Mit Hilfe dieser Kurve können unbekannte Zuckerkonzentrationen berechnet werden. (Anhang I)

3.2.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Nach der Vorbereitung der Vorkultur, der Impfung einer 24-stündigen Kultur auf Slant und nach 24 Stunden Wachstum des *Saccharomyces*, waren die Reagenzgläser mit 9mL Sabouraud-Dextrose-Agarlösung gefüllt. Anschließend wurde jedes der Rohre getestet. 0.5, 1, 1.2, 1.5, und 2mL Vorkultur mit Mikroben wurde zugegeben und die Absorption der Spectrophotometer-Einheit bei 25°C auf einer Wellenlänge von 600 nm abgelesen. Bei dieser Wellenlänge hat die Lösung mit einer Absorption von $0.5 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Schließlich wurden die Vorkulturen 1.2/9 verdünnt und für die Gärung im Erlenmeyerkolben zugegeben.

Ebenfalls völlig einheitlich ist das Rühr-Medium. Für die Zählung der Zellen (Lam Thoma), die völlig sauber und frei von Zellkörpern sind, wurde ein LAML gelegt und mit Hilfe Sterilpipette wurde ein Tropfen von Mikrobensuspension neben die Lamelle gelegt. Somit ist das Kulturvolumen zwischen Lam und LAML berechenbar. Anschließend wurden mit einem Mikroskop die Zellen bei 40-facher Vergrößerung gezählt.

4 ERGEBNISSE

**4.1. Die Wirkung verschiedener Parameter auf die Effizienz der
Produktion von Ethanol**

4.2. *Die Optimierung der Taguchi-Methode*

4.3. Datenanalyse

4.1.- Die Wirkung verschiedener Parameter auf die Effizienz der Produktion von Ethanol

Wir versuchen die Effizienz der Produktion von Ethanol aus Obstabfällen zu optimieren. Es kann aber sein, dass ein höheres Scale-up keine wirtschaftliche Rechtfertigung ist. Da die Frucht selbst aus verschiedenen Lebensmitteln besteht, kann sie auf Bereicherung ihres Substrates mit chemischen Verbindungen (unterschiedliche Quellen von Phosphor, Stickstoff und Spurenelementen) im industriellen Maßstab verzichten.

Bei dieser Studie wurden zwei Methoden zur Optimierung eingesetzt. Bei der ersten Methode, wo ein Faktor die Zeit ist, wurden die einzelnen Parameter auf die Ethanolproduktion untersucht. Bei dieser Methode werden die Werte für die Basen der Parameter anhand anderer Testergebnisse geschätzt. Dann werden einzelne Parameter nach ihren Umweltbedingungen und Wichtigkeit geändert. Nachdem jeder Parameter optimiert wurde, bleibt dieser während der nächsten Prüfungen im festen Zustand und die gewünschten optimalen Bedingungen werden erhalten. Weitere Informationen folgen später.

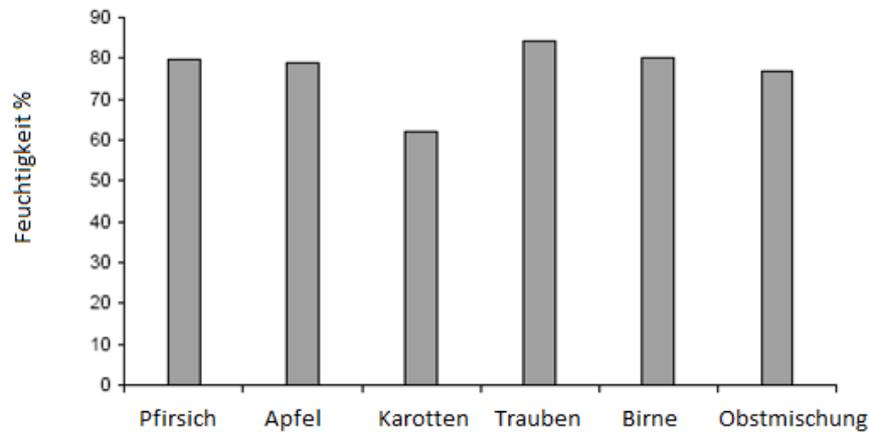
Bei der zweiten Methode wird die Taguchi-Methode verwendet. Bei dieser Methode gibt es 4 Parameter, jeder wurde auf drei Niveaus geprüft und durch 9 Experimente mit den Parametern erhalten wir optimierte Werte. Eine detailliertere Beschreibung dieser Methode folgt.

Auch chemische und physikalische Bedingungen bestimmter Bauteile werden optimiert. Wichtige Parameter hierfür sind: Feuchtigkeitsanteil, Menge geimpfter Hefe, Rohzuckermenge, Inkubationszeit, pH-Wert, P-, N-Quelle hinzufügen. Am Ende der optimalen Werte wurden der beiden Methoden verglichen.

4.1.1.- Einflüsse des Feuchtigkeitsanteils

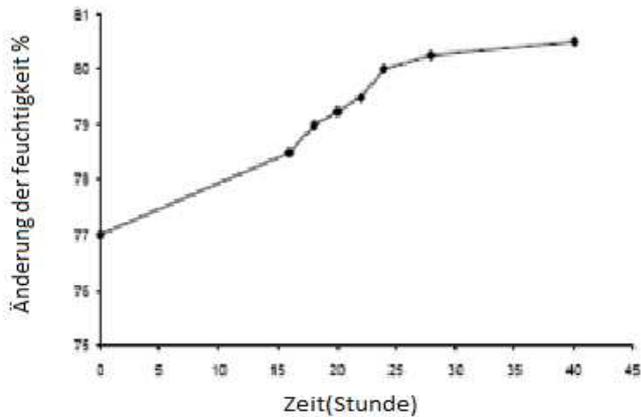
Die Zellwachstumsrate, der Verbrauch von Zucker, die Ethanolproduktion und die Änderungen im Feuchtigkeitsanteil sind abhängig vom anfänglichen Feuchtigkeitsgehalt des Substrats. Der beste Feuchtigkeitsgehalt der Ethanolproduktion beträgt 75%. Durch weniger Feuchtigkeit sinkt die Wasseraktivität und die biologische Aktivität wird beschränkt. Durch einen erhöhten Feuchtigkeitsgehalt wird der Platz zwischen den Partikeln geringer, wodurch der Gas- und Wärmeaustausch beschränkt wird.

Im folgenden Diagramm wird der Feuchtigkeitsgehalt in verschiedenen Obstsorten und einer Obstmischung gezeigt.



Diag 4.1.: Obstfeuchtigkeitsgehalt

Man bedenkt, dass der optimale Feuchtigkeitsgehalt bei 75% für die Ethanolproduktion liegt und die Feuchtigkeit der Obstmischung keinen großen Unterschied zum optimalen Feuchtigkeitsgehalt hat und auch aus wirtschaftlicher Hinsicht. Doch bei einer Pilotphase, der Änderung des Feuchtigkeitsgehalts, fielen hohe Kosten an, weshalb Experimente mit dem Feuchtigkeitsgehalt von Fruchtmischungen durchgeführt werden. Die Feuchtigkeit steigt während der Vergärung durch die Atmung der Mikroorganismen von 77% auf 80%, was auf dem Diagramm 4.2. zu sehen ist.

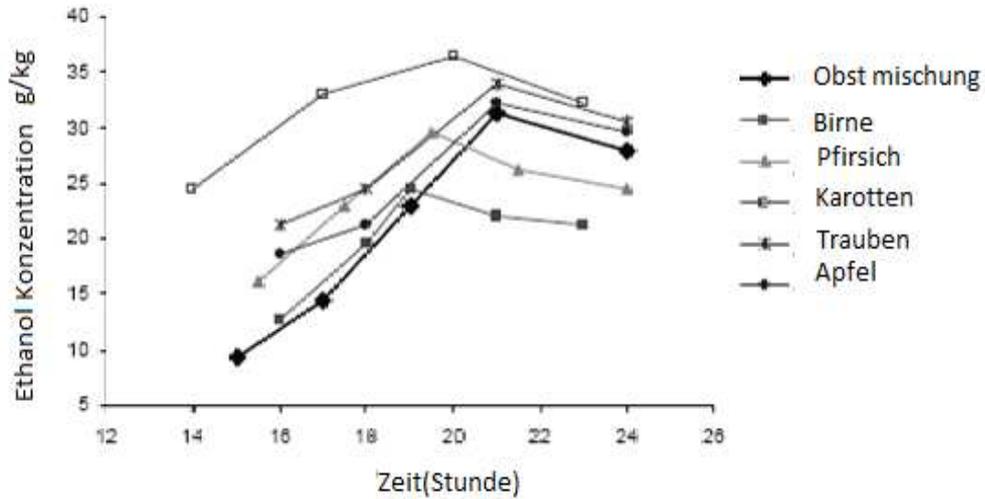


Diag 4.2.: Änderungen der Feuchtigkeit von Fruchtmischungen während der Vergärung

4.1.2. Einflüsse der Gärdauer

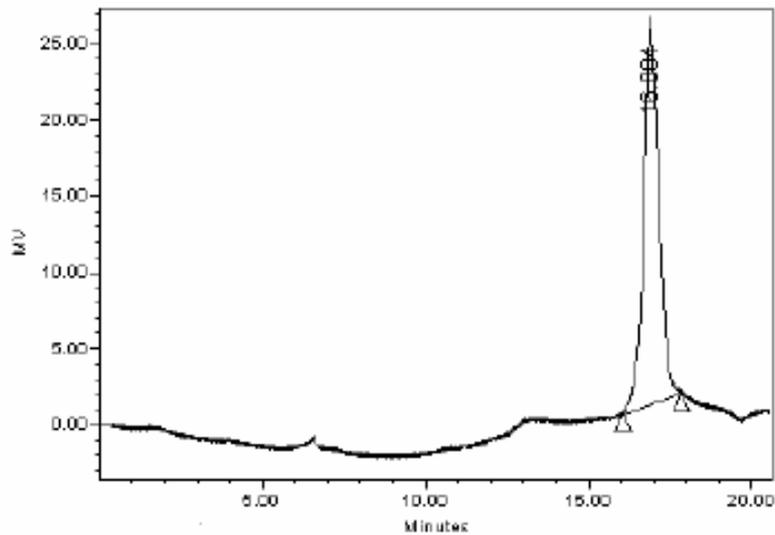
Wie das Diagramm 4.3. zeigt, hat die Gärdauer eine wichtige Wirkung auf die Produktion von Ethanol. Über 22 h nach der Impfung sind die maximale Konzentration von Ethanol, und die Höhe des Restzuckers zu diesem Zeitpunkt einem erheblichen Verlust ausgesetzt. Daher sollen nach 22 h aus mehrere Faktoren, wie der Mangel an verfügbarem Zucker und schließlich dem Energiemangel, Hefe aus der Oxidation von Ethanol und die Änderung zu Zitronensäure, die Energie, die zum Überleben benötigt wird, bereitgestellt werden.

Die Optimierung der Ergebnisse ist bei allen Fruchtarten verschieden. Der optimale Zeitpunkt liegt bei allen, wie auf folgender Abbildung zu sehen ist, bei etwa 19-22 h.

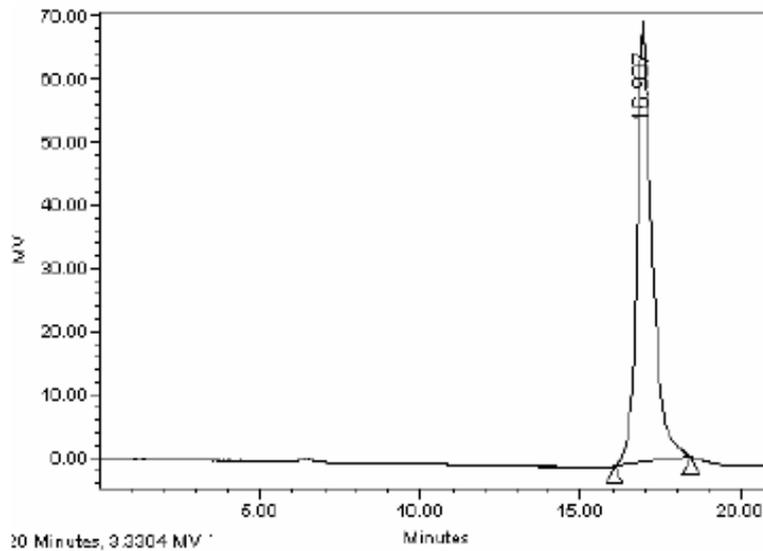


Diag 4.3.: Optimierung der Gärdauer für verschiedene Obstsorten und einer Obstmischung

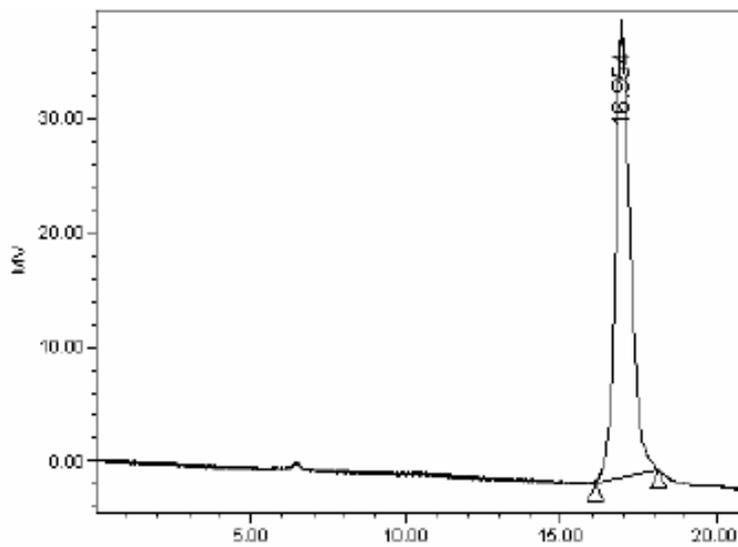
Die Ethanolproduktionsentwicklung bei Fruchtmischungen ist in den Diagrammen 4.4. A, B und C dargestellt:



Diag 4.4. A: Analyse der Proben mit Ethanol nach 16 Stunden



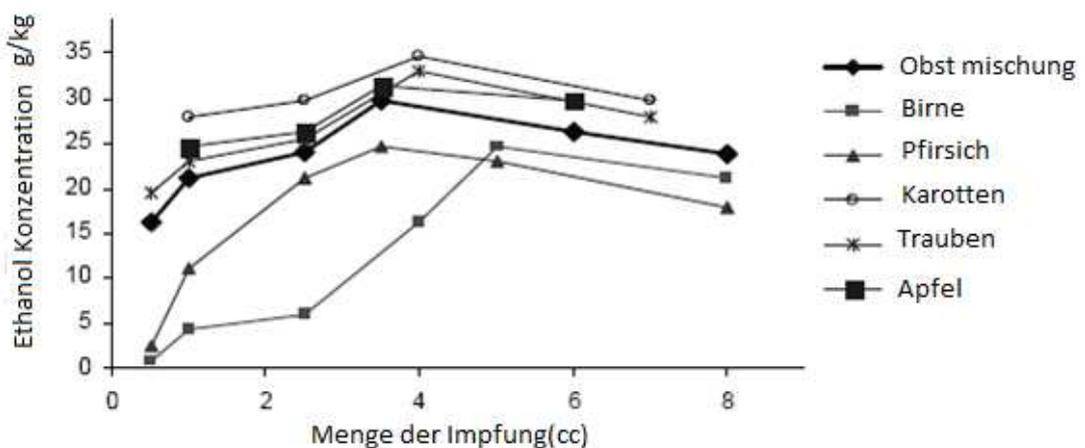
Diag 4.4. B: Analyse der Proben mit Ethanol nach 22 Stunden



Diag 4.4. C: Analyse der Proben mit Ethanol nach 40 Stunden

4.1.3. Einflüsse der Impfmenge

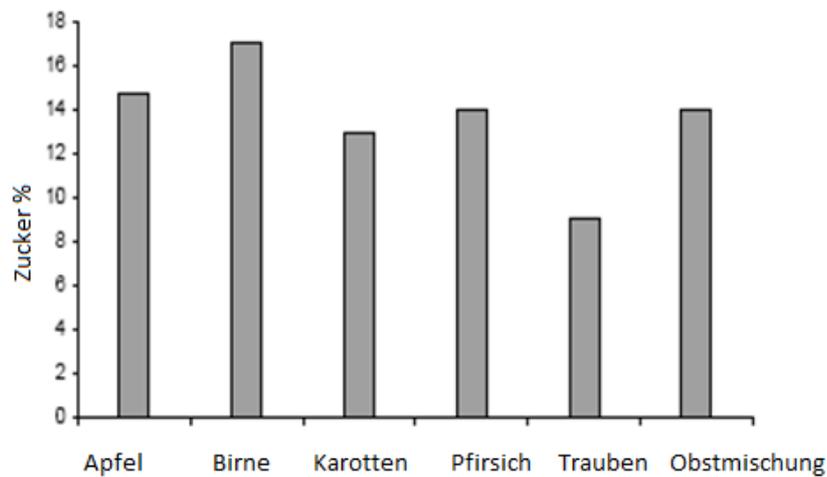
Um die Wirkung der Impfmenge herauszufinden, wurden aktive Hefezellen mit 50g Obstmischung oder verschiedene einzelne Obstsorten verwendet, bestimmte Werte der Hefezellen in der logarithmischen Phase vorbereitet und in dem Medium mit den selben Bedingungen gemischt. Nach Ablauf der Frist der optimalen Gärdauer wurde die Ethanolkonzentration gemessen. Limitierte Änderungen in der Konzentration der Hefe von 5×10^5 bis 8×10^6 Zellen pro 50g Substrat wurden festgestellt. Die optimale Impfmenge der Kultur bei durchschnittlicher Umgebung entspricht etwa $3.5 - 4 \times 10^6 = 3.5 - 4$ Zellen/50g Obstsorte. Der maximale Wert der Produkte liegt bei 6×10^5 für die Gärung von Obst (Äpfel, Trauben und Ananas) zu Ethanol. Aufgrund dieser Unterschiede kann von Mikroorganismen in Obstläsionen ausgegangen werden. Denn wenn Früchte gären und Abfälle ohne Erhöhung der Mikroben im räumlichen Zeitraum entstehen, riechen sie nach Essigsäure. Die Impfung wird auf etwa 4mL pro 50g Substrat der Ethanolproduktion erhöht, da zur selben Zeit mit der Erhöhung der Hefezellen, mehr Zucker verbraucht wird und mehr Ethanol produziert. Aber mit zunehmender Zahl der Hefezellen wird aufgrund der geringeren vorhandenen Zuckermenge die Ethanolproduktion je nach Impfmenge reduziert.



Diag 4.5.: Einfluss der Impfmenge auf die Konzentration der Ethanolproduktion nach der Gärdauer

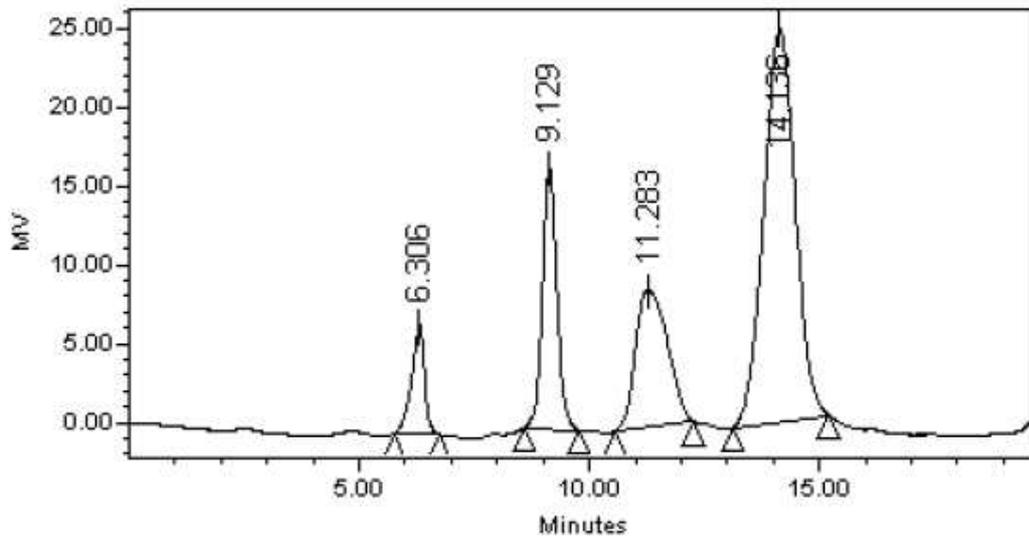
4.1.4. Einflüsse erste Zuckeranfangskonzentration

Der Prozentanteil des Zuckers in der Obstmischung wird in der nächsten Abbildung gezeigt. Der Prozentanteil von Zucker im Obst je nach Saison ist um 5 - 8% verringert. Beispielsweise wird der Zuckeranteil in Äpfeln vom ursprünglichen Wert (15%) in Abhängigkeit von der Erntezeit auf rund 8% herabgesetzt.



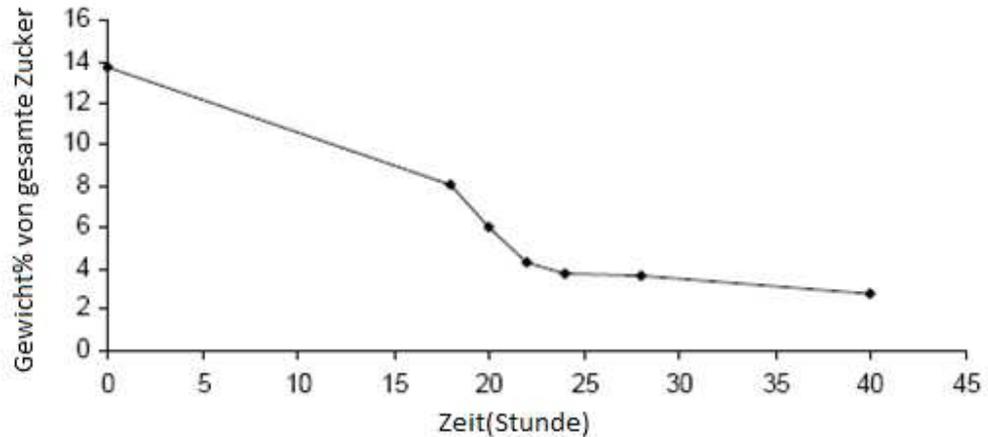
Diag 4.6.: Prozentanteil der vorhandenen Zucker in Obstsorten und einer Obstmischung

Zucker in den Früchten sind Glucose, Fructose und Saccharose. Die Analyse von Zucker in der Fruchtmischung wird in folgendem Diagramm angezeigt. In diesem Diagramm (4.7.) sind Peaks Saccharose, Glucose und Fructose, bei einer Dauer von 9, 11 und 14 min zu sehen.

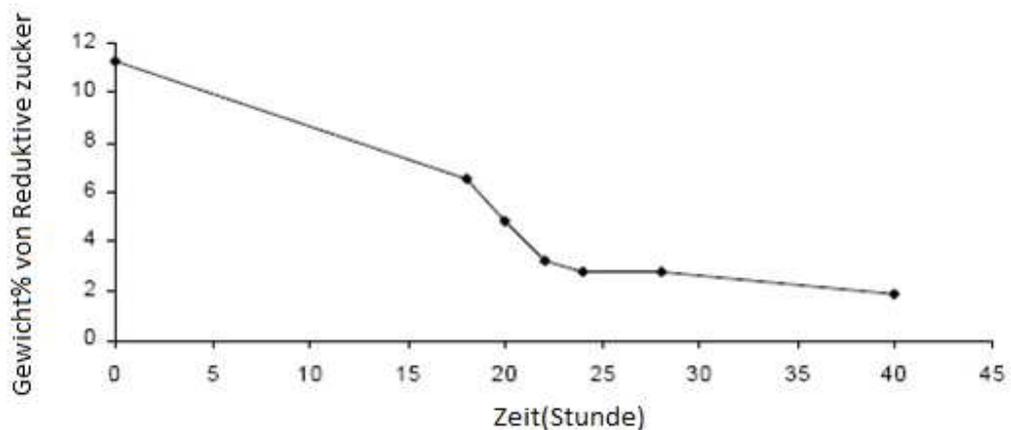


Diag 4.7.: Analyse von Zucker von Obstmischungen vor der Gärung

Am Anfang der Gärung (in den ersten 5 Stunden) wird die Glucosekonzentration der Proben erhöht. Das steht im Zusammenhang mit dem, dass das Enzym Saccharose in Glucose und Fructose in der Verzögerungsphase. Hydrolysiert. Wie sich die reduzierenden Zucker (Fructose und Glucose) ändern und der gesamte Zucker (Saccharose, Fructose und Glucose) sich in den Fruchtmischungen im Laufe der Zeit verhält, was von der HPLC-Methode gemessen wird, wird in den folgenden Diagrammen dargestellt.



Diag 4.8.: Die Änderungen des Gewichts des Gesamtzuckers in Prozent.

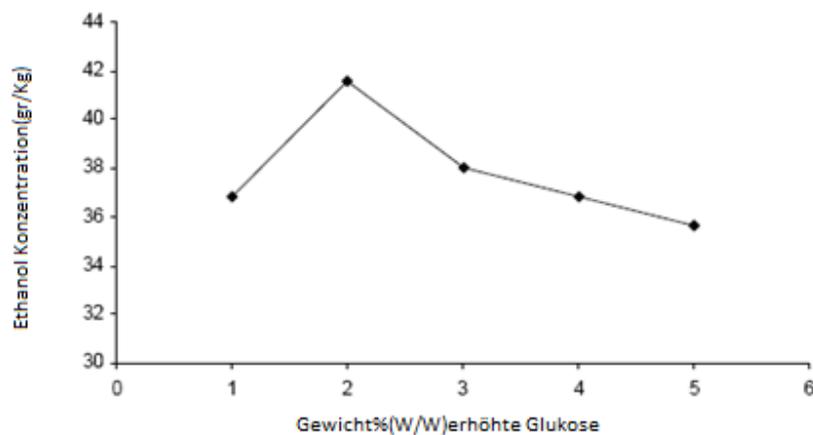


Diag 4.9.: Änderungen des Gewichts der reduktiven Zucker in Prozent

Die obige Tabelle zeigt, dass am Ende der Gärungszeit, die ca. 22 Stunden beträgt, 71% der gesamten Zucker und 74 % der reduktive Zucker verbraucht wurden. Diese erreichen nach 40 Stunden einen Wert von rund 82 und 85%. Es ist notwendig zu erwähnen, dass etwa 15% Restzucker in Mittel-Polymer-Verbindungen wie Pektin und Zellulose, die von

der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bezogen wird, nicht zu Ethanol abgebaut werden können.

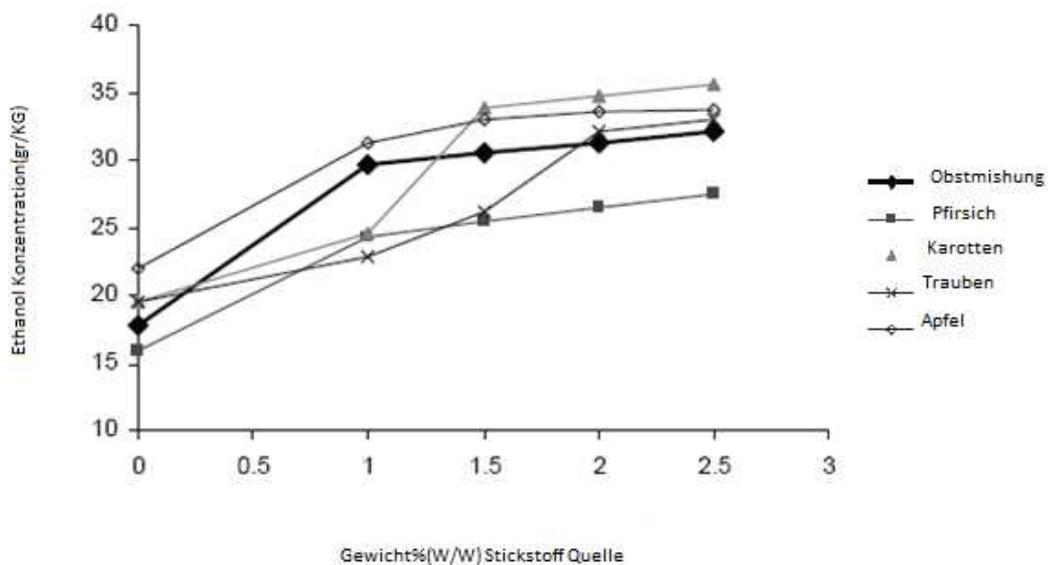
Mit der Zunahme der ursprünglichen Konzentration von Zucker steigt die Ethanolproduktion, da der Zucker des Substrates der Zellwachstums-Stimulator ist, und die Ethanolproduktion erhöht. In dieser Studie wurden den Fruchtmischungen mit einem Gewichtsanteil von 1 bis 5% dem Glucosemedium hinzugefügt. Wie im Diagramm 4.10. gezeigt wird, erhöht sich die Ethanolkonzentration auf etwa 16% des Gewichts und fällt anschließend drastisch. Wenn die Glucosekonzentration erhöht ist, ohne den Feuchtigkeitsprozentsatz zu kontrollieren, steigt der osmotische Druck. Dadurch wird der Zellstoffwechsel verhindert. Bei geringerer Glucosekonzentration ist der Gärungsfortschritt begrenzt.



Diag 4.10.: Auswirkungen der anfänglichen Zuckerkonzentration der Fruchtmischung für Ethanolkonzentrationen nach 22 h

4.1.5. Einflüsse der Stickstoff-Quelle

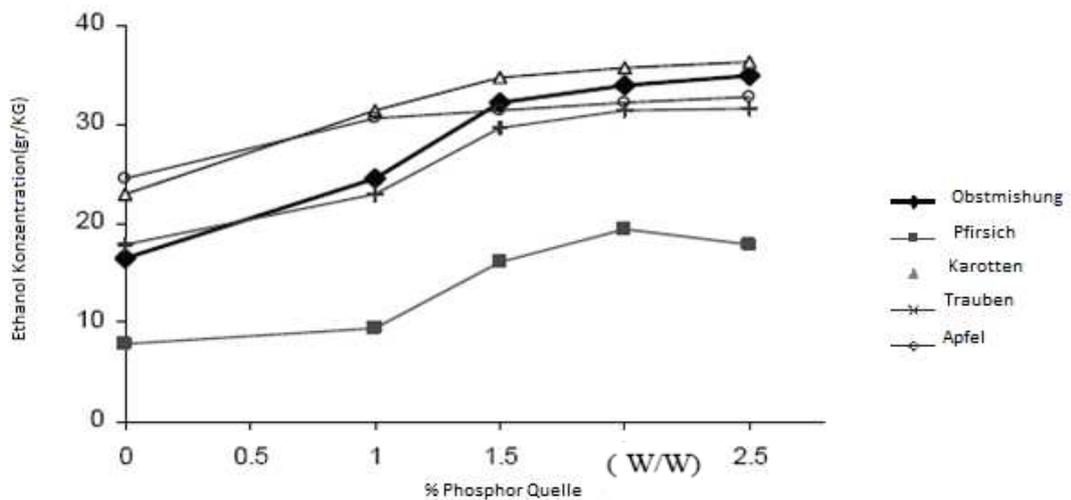
In dieser Studie über die Auswirkungen des Stickstoffs, wurde ein bestimmter Gewichtsprozentsatz von Ammoniumsulfat in den Erlenmeyer-Kolben gegeben. Die optimale Gär-Periode für jede Obstsorte und Obstmischung kann man in folgender Abbildung sehen. Mit der Erhöhung von Ammoniumsulfat wurde die Konzentration von Ethanol von 0% bis 1% für Äpfel, Pfirsiche und Obstmischungen stark erhöht, bei Karotten von 1 bis 1.5% und bei Trauben von 1.5 bis 2% am stärksten. Weil in der anderen Konzentration das erhöhte Ammoniumsulfat keine großen Einflüsse auf die Ethanolproduktion hat, wurde bei 1% Konzentration für die Obstmischung der Prozentsatz der optimalen Anreicherung ausgewählt.



Diag 4.11.: Die Wirkung von Ammoniumsulfat auf die Ethanolproduktion im Laufe der Zeit nach der optimalen Vergärung

4.1.6. Einflüsse der Phosphor-Quelle

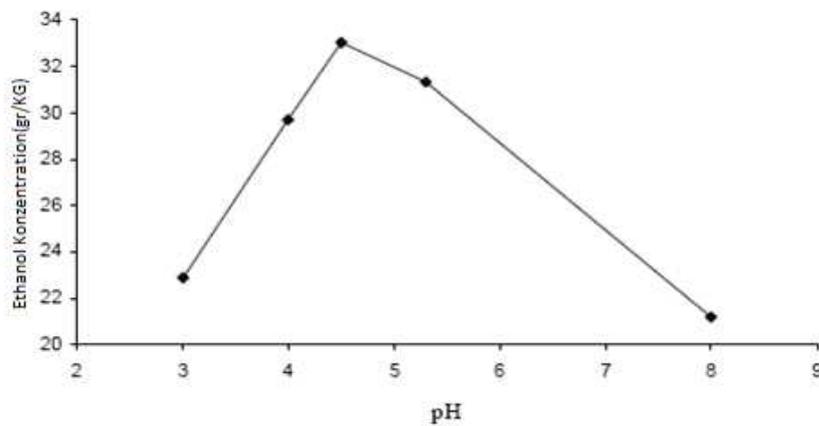
Einem bestimmten Gewichtsprozentsatz der Phosphor-Quelle wurde Kaliumdihydrogenphosphat in den Erlenmeyer-Kolben zugesetzt. Nach der Gärung wurde die optimale Ethanolkonzentration gemessen, deren Ergebnisse in folgender Abbildung zu sehen sind. Der optimale Prozentanteil für die Obstmischung, Karotten und Äpfel liegt bei etwa 1.5% des Gewichts, 1% bei den Trauben und bei den Pfirsichen bei 2% des Gewichts.



Diag 4.12.: Die Wirkung von Substratanreicherung mit Kaliumdihydrogenphosphat auf Ethanolkonzentrationen nach der Gärung

4.1.7. Die Einflüsse des pH-Wertes

Um die Auswirkung des pH-Wertes auf die Ethanolkonzentration der Fruchtemischung zu messen, wird der pH-Wert durch HCl und NaOH reguliert. Nach 22 Stunden werden die Ethanolkonzentrationen gemessen. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung zu sehen. Das pH-Optimum für das Wachstum von Hefe *Saccharomyces* beträgt ungefähr 4.5, was dieses Experiment zeigt.



Diag 4.13.: Wirkung des pH-Wertes auf Ethanolkonzentration innerhalb von 22 h nach der Fermentation der Fruchtmischung

4.2.- Die Optimierung der Taguchi-Methode

Die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnittes sind, dass die wachsende Quelle von Phosphor, Stickstoff und Impfung und die erste Zuckerkonzentration als Faktoren zu optimieren sind. Für die Untersuchung von Mischobst auf diese Faktoren auf drei Ebenen ist der L9 orthogonale Array geeignet.

Die Ergebnisse wurden in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 2 : Orthogonaler Array L9(3⁴)

| Glucose | Impfversuche | Stickstoff | Phosphor | Anzahl der Tests |
|---------|--------------|------------|----------|------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 3 | 3 | 3 | 1 | 3 |
| 3 | 2 | 1 | 2 | 4 |
| 1 | 3 | 2 | 2 | 5 |
| 2 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| 2 | 3 | 1 | 3 | 7 |
| 3 | 2 | 2 | 3 | 8 |
| 1 | 1 | 3 | 3 | 9 |

Tabelle (4-2): Experimental Design mit Arrays

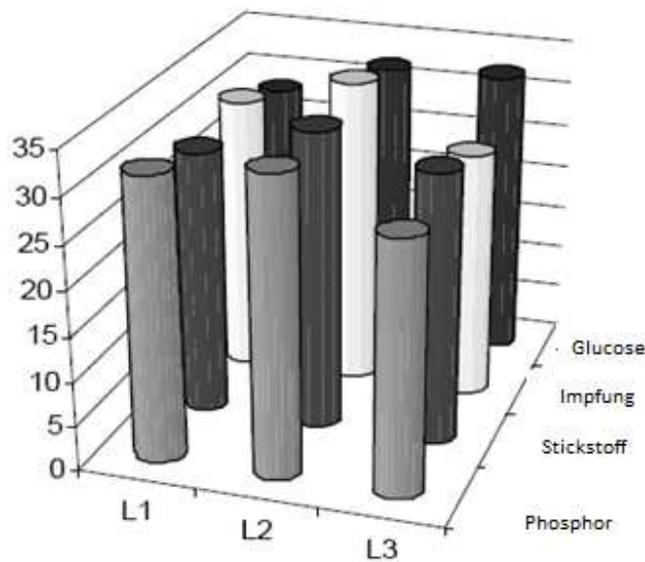
Die Menge an Glucose in der zweiten und dritten Ebene wies keinen signifikanten Unterschied auf:

| Ethanolkonzentrationen g/kg nach 22 h | Glucose %GEW | Impfung mL/50 g Obstabfälle | % N GEW | % P GEW | Anzahl der Tests |
|--|-------------------------|--|--------------------|--------------------|---------------------------------|
| 31.37 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| 35.52 | 2 | 4 | 1 | 1 | 2 |
| 28.83 | 3 | 5 | 1.5 | 1 | 3 |
| 33.06 | 3 | 4 | 0 | 1.5 | 4 |
| 29.67 | 1 | 5 | 1 | 1.5 | 5 |
| 37.30 | 2 | 2 | 1.5 | 1.5 | 6 |
| 24.59 | 2 | 5 | 0 | 2 | 7 |
| 39.60 | 3 | 4 | 1 | 2 | 8 |
| 24.58 | 1 | 2 | 1.5 | 2 | 9 |

Tabelle (4-3): Einflüsse von Faktoren in Orthogonal Array

| Ebene 3 | Ebene 2 | Ebene 1 | Faktor |
|---------|---------|---------|-------------------|
| 28.26 | 33.35 | 31.65 | Phosphor |
| 30.23 | 33.34 | 29.67 | Stickstoff |
| 27.69 | 34.47 | 31.09 | Impfung |
| 32.5 | 32.22 | 28.54 | Glucose |

(4-13) Auswirkungen von Faktoren für orthogonale Felder



Um die optimalen Werte zu erhalten, wurde mit Hilfe von Formeln ANOVA auf die Wirkung der Prozentanteile der einzelnen Faktoren in der Produktion von Ethanol untersucht. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle (4-4): ANOVA

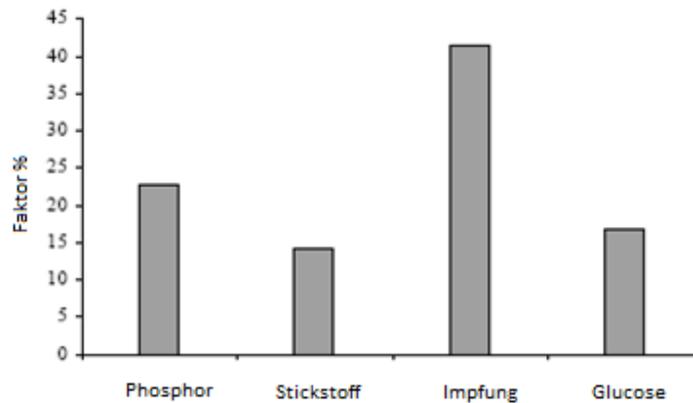
| % Anteil jedes Faktors | SS' | F | V | SS | Freiheits-grad | Faktor |
|------------------------|---------|--------|---------|--------|----------------|-------------------|
| 22.395 | 39.1335 | 21.939 | 20.1266 | 41.002 | 2 | Phosphor |
| 13.949 | 24.3740 | 14.042 | 11.7405 | 26.243 | 2 | Stickstoff |
| 40.765 | 71.2404 | 39.119 | 34.5028 | 73.109 | 2 | Impfung |
| 16.471 | 28.7827 | 16.401 | 14.6157 | 30.651 | 2 | Glucose |
| 5.405 | 9.344 | - | 0.93 | 1.87 | 2 | Fehler |

Folgende Werte wurden in der Tabelle für: Fischer für F, 90 und 95% Vertrauen und ein Fehler-Freiheitsgrad Konfident im Intervall von 2, erreicht:

$$F_{2, 2, / 1} = 9$$

$$F_{2, 2, 0.05} = 19$$

Daraus kann geschlossen werden, dass Phosphor und die Impfung bis zu 95% und Stickstoff und Glucose bis zu 90% zuverlässig sind, da alle oben genannten Faktoren eine wichtige Rolle im System haben und die Ergebnisse können sich ändern. Der Beitrag der einzelnen Faktoren ist im Diagramm 5.1. erkennbar.

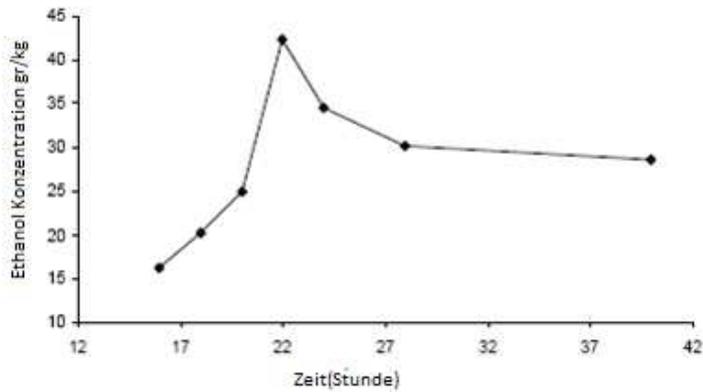


Diag(4-14): Wirkung % Ethanolproduktionsfaktoren, ohne die Fehler

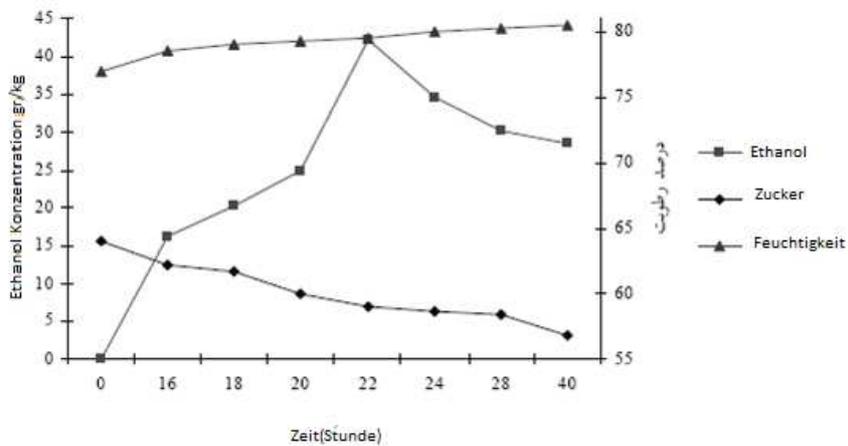
Die Konfidenzintervalle mit einer Wirkung von Phosphor und Impfung von 95% haben ein Signifikanzniveau von ± 3.71 . Für Stickstoff und Glucose mit 90% wurde ein Signifikanzniveau von ± 2.55 berechnet. Schließlich war es möglich anhand der verfügbaren Daten und der Taguchi-Methode die Berechnung der optimalen Menge an Alkohol theoretisch durchzuführen. Die optimale Menge an Ethanol ergab aus den statistischen Berechnungen 40.41g Ethanol/kg. Konfidenzintervalle mit 90% haben ein Signifikanzniveau, bei optimalen Bedingungen, von 2.55. Die endgültige Antwort erhält man durch folgende Theorie:

$$\text{Ethanolproduktionsrate} = 40/41 \pm 2.55 \text{g Ethanol/kg}$$

Die Tests wurden mit den optimalen Werten wiederholt. Das Chart unten zeigt die Testergebnisse. Das Chart zeigt die Effizienz von Ethanol, die bei 15g Ethanol/ kg Mischobst in 16 Stunden erreicht wird, bis zu 42.35 g/kg bei einer optimalen Gärungszeit von etwa 22 Stunden. Nach Ablauf dieser Frist von 28 Stunden bleibt die Ethanolkonzentration während des Verfahrens relativ konstant. Nach 40 Stunden ist aber eine relativ deutliche Verringerung der Effizienz der Ethanolproduktion bemerkbar. Das Diagramm zeigt gleichzeitig die Effizienz der Ethanolproduktion, den Verbrauch von Zucker, und die Änderungen des Feuchtigkeitsgehaltes.



Diag(4-15): Die Effizienz der Produktion von Ethanol nach 22 h Fermentation



Diag: Effizienz der Ethanolproduktion, Zuckerverbrauch, Feuchtigkeit% während der Garzeit

Die Ethanolproduktion, der Zuckerverbrauch, und die Änderung des Feuchtigkeitsgehalts während der Gärung sind in der optimierten Tabelle ersichtlich. Der theoretische und experimentelle Unterschied liegt bei etwa 0.5 %.

Tabelle (4-5): endgültigen Ergebnisse der Optimierung der Produktion von Ethanol

| Ethanol % Gewicht | Glucose % Gewicht | Impfung/ 50g Substrate | N % Gewicht | P % Gewicht | Parameter |
|------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 2/4 % | 2 % | $10^6 \times 4$ | 1 % | 1.5 % | optimierte Menge |

4-3- Datenanalyse

Die Ergebnisse: 4.2g Ethanol pro 100g gemischtes Obst bei optimaler Gärzeit. Bei 70% Rohzucker in der Obstmischung wurden 13.8g Ethanol pro 100g Mischobst verwendet. Daraus ergab sich folgende Beziehung:



Durch die Höhe des Zuckerverbrauchs sollten ca. 5g Ethanol (von allen verbrauchten Zuckern in der Probe sollen 7g Ethanol) produziert werden. Es kann eine Differenz von bis zu 16% zwischen den praktischen und theoretischen Ergebnissen entstehen, aufgrund folgender Faktoren:

Wie Sie in der obigen Reaktion sehen, wird bei der Ethanolproduktion Wärme freigegeben, aber wenn die Wärme während der Gärzeit nicht entweichen kann, verdampft das Ethanol. Auch nach der Destillation von Ethanol in der Vakuum-Destillations-Einheit, bleibt noch eine kleine Menge von Ethanol im Trester Destillat.

Vor der Ethanolmessung werden keine Mikroorganismen in der flüssigen Probe der Destillation gewonnen. Diese Mikroorganismen verwandeln Ethanol in der Luft in Essig. Während der Messung entweicht Ethanol aufgrund der Flüchtigkeit aus dem Container. Da CO_2 aus dem Medium nicht entweicht, entstehen ein Mangel an geeigneten anaeroben Bedingungen, und Prüf- und Messfehler.

Alle oben genannten Gründe verursachen, dass die gewünschte Konzentration von Ethanol nicht erreicht wird. Die oben genannten Bedingungen können kontrolliert werden, wenn die Ethanolherstellung von Zucker aus den derzeit 30% auf 36% erhöht wird. Falls unter idealen Bedingungen nach 22 h der Ethanolverbrauch verhindert wurde und die Mikroben zum Restzucker geleitet werden, erhöht sich die Ethanolproduktion auf rund 50%.

5 ERGEBNISSE & VORSCHLÄGE

5.1.-Ergebnisse

laut der Studie und den Experimenten die durchgeführt wurden, enthalten optimale Bedingungen für die Herstellung von Ethanol durch Hefe *Saccharomyces cerevisiae* von gemischten Früchten:

- Äpfel 35%
- Trauben 30%
- Karotten 20%
- Pfirsiche 10%
- Birnen 5%
- Feuchtigkeit 77%
- Temperatur $28 \pm 2^\circ\text{C}$
- pH 4.6
- Kalium dihydrogenphosphat 1.5%
- Ammoniumsulfat 1%
- Glucose 2%
- 4×10^6 Hefezellen in 50g Kultur
- Fermentationszeit von 21-22 h

Bei optimalen Bedingungen ist die maximale Produktionsrate von Ethanol von Fruchtmischungen mit 13.75 Gewichtsanteilen des Substrates 42.35g/ kg gemischte Früchte.

5.2.- Vorschläge

Um die Forschung der Ethanolproduktion aus Obstabfällen weiterhin zu verbessern, hier ein paar Vorschläge:

- 1) Die Ergebnisse bei Versuchen unter anaeroben Bedingungen müssen so eingestellt werden (z.B. Verschließen der Erlenmeyerkolben zusätzlich mit Parafilm), dass nach dem Verbrauch von Zucker eine erhöhte Ethanolkonzentration zu erwarten ist.
- 2) Es sollten auch andere Arten von Früchten, die die Fähigkeit haben Ethanol zu produzieren, ausgewertet werden.
- 3) Welche Mikrobenarten in Obstabfällen vorkommen sollte genauer erforscht werden.
- 4) Die Fähigkeit Ethanol aus Abfällen durch andere Mikroorganismen zu produzieren, insbesondere *Zymomonas mobilis*, sollte untersucht werden.
- 5) Für die Verwendung der Ergebnisse dieser Forschung in der Industrie bei Labor- und Pilotversuchen sollten im Bioreaktor die Solid-State-Fermentation fortgesetzt und die wirtschaftlichen Aspekte analysiert werden.

6 ANHANG

Anhang I

Anhang II

Anhang III

Anhang I:

1.1 Standardkurve gemessen Ethanol

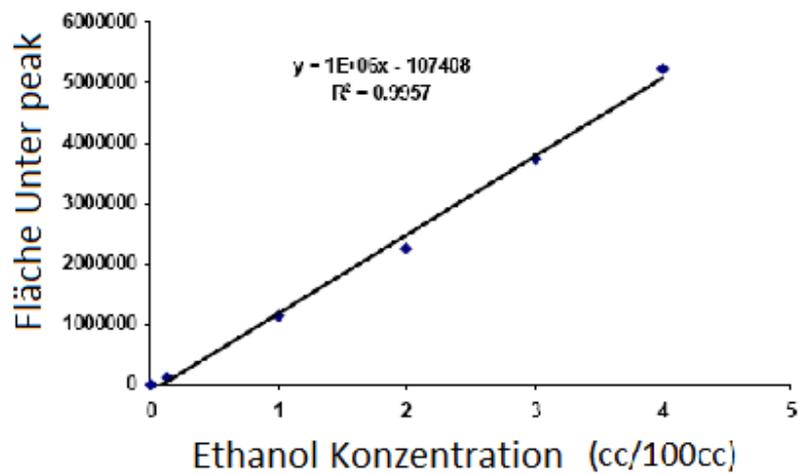


Abbildung 1/Anhang I: Kalibrationskurve für Ethanol HPLC

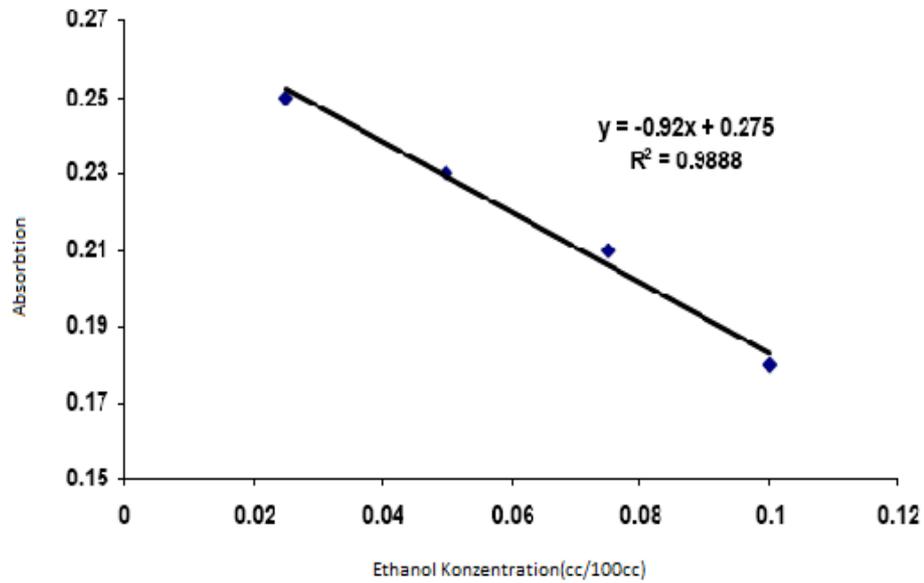


Abbildung 2/Anhang I: Kalibrationskurve für das Ethanol-Spektrometer

1.2. Standardkurve Zuckermessung

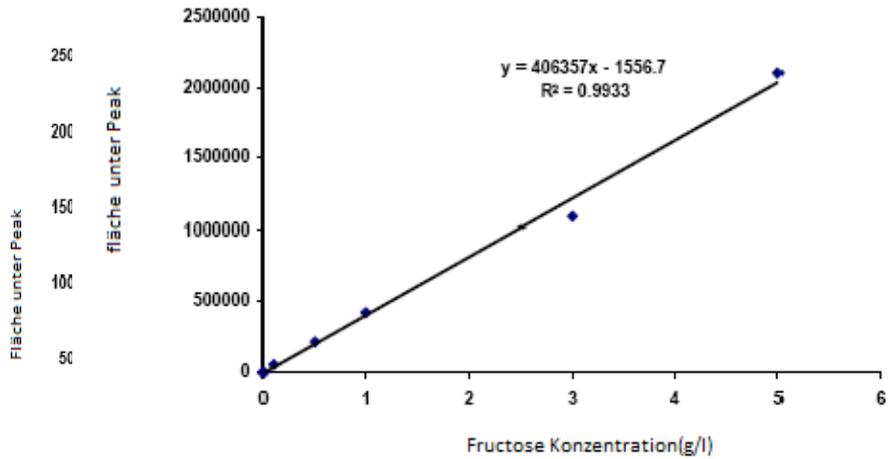


Abbildung 4/ Anhang I: Fructose-Standardkurve für die Kalibrierung des HPLC Systems

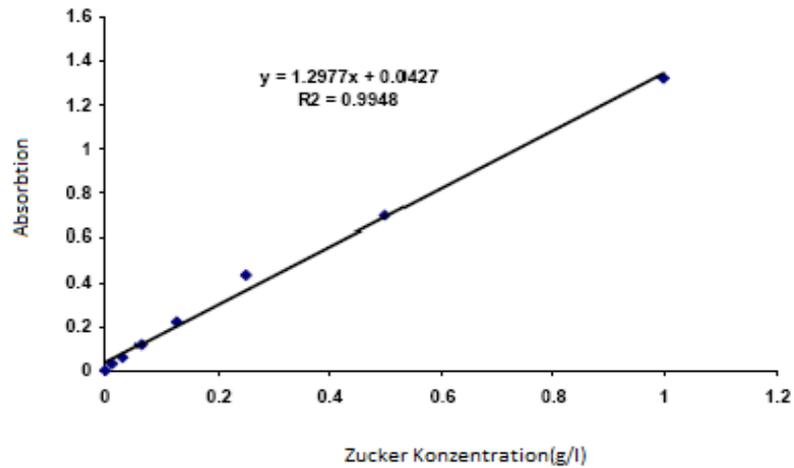


Abbildung 5/ Anhang I: Zucker Standardkurve; Methode für die Kalibrierung des Spektrofotometrie-Systems (Somogy Methode)

Anhang II:

Für den Vergleich von den Methoden zur Messung des Zuckers wurde Glucose auf drei Arten in diesem Projekt gemessen:

1. Dinitrosalicylsäure-Methode

2. Methode von Nelson Somogy

3. HPLC Methode

Die Ergebnisse dieser drei Methoden zur Messung der Zucker (Glucose und Fruktose) in Fruchtmischungen sind in den folgenden Abbildungen (1, 2 und 3) ersichtlich:

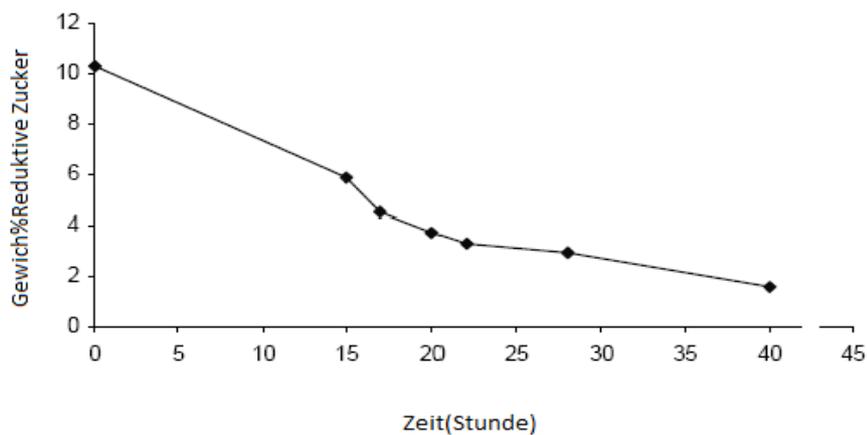


Abbildung 1/ Anhang II: Zuckermessung nach der Dinitrosalicylsäure-Methode

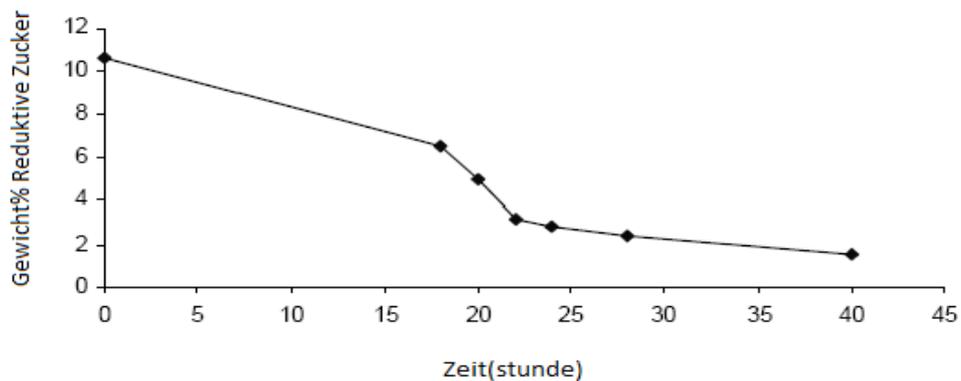


Abbildung 2/ Anhang II: Zuckermessung nach der Somogy Nelson-Methode

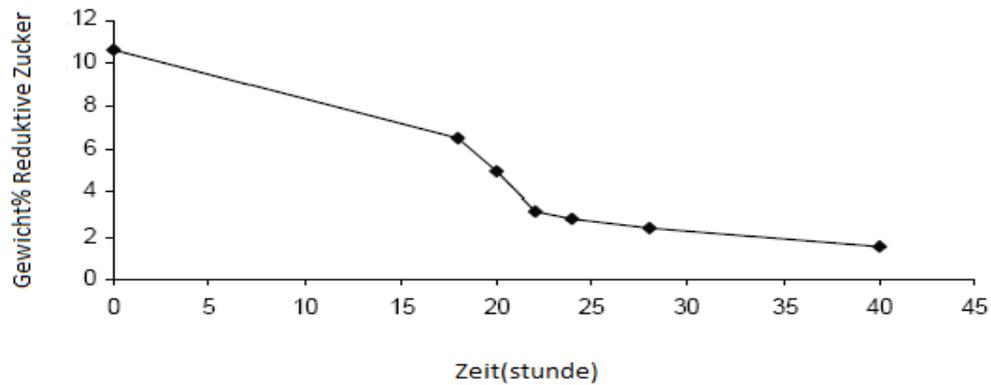


Abbildung 3/ Anhang II: Zuckermessung nach der HPLC-Methode

Tabelle 1: Vergleich der Messverfahren

| % Zuckerverbrauch | % Zuckerverbrauch | % Zucker am Anfang | Methode |
|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 86 | 70 | 10.28 | DNS |
| 87 | 72 | 10.64 | Nelson Somogy |
| 85 | 74 | 11.30 | HPLC |

In Anbetracht der oben genannten Ergebnisse scheint die HPLC-Methode genauer als die anderen Methoden zu sein.

Anhang III:

3.1. Methode eines Faktors in einer Zeit

Bei dieser Methode ist ein Faktor zu verändern, während andere Faktoren konstant gehalten werden. Dann gibt für jeden Faktor eine Variable den besten zu ermittelten Wert an. Anschließend wird diese Handlung für andere Faktoren wiederholt. Manchmal ist diese Methode effektiv, aber nie genau. Manchmal geben die Experimente nur eine Antwort. Bei einer Interaktion zwischen den Variablen ist die Möglichkeit die optimale Antwort zu erhalten gering.

Bei Abbildung 1 ist ein Abschnitt der Untersuchung der drei genannten Methoden zu sehen.

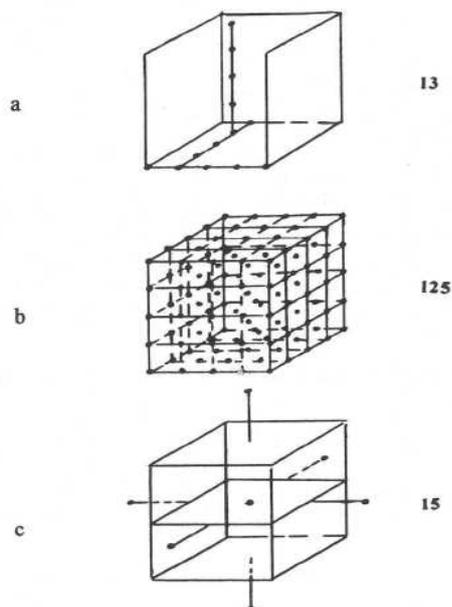


Abbildung 1: Abschnitt Untersuchung drei genannten Methoden zeigt

Die Methode eines Faktors in einer Zeit kann nicht auf alle möglichen Weisen bestimmt werden.

2.2. Vollfaktorielle Methode

Durch diese Methode wird viel Energie, Zeit und Kosten verbraucht, weshalb diese Methode nicht zu empfehlen ist. Die Genauigkeit dieser Methode kann nachlassen, wenn der Test lang ist und sich Faktoren ändern. Diese Methode nennt man Matrix.

2.3. Teilfaktorielle Methode

Dies ist eine statistische Methode. Hier kann aus einer Reihe von möglichen Kombinationen zwischen den Variablen ausgewählt und die statistische Auswertung der Antworten erhalten werden, wodurch die besten Bedingungen ermittelt werden können. Wenn die Faktoren und deren Zusammenhänge genau ermittelt werden, können optimale Werte erreicht werden. Einen Teil der Zusammenhänge der Variablen werden gelöscht, weil es notwendig ist diese Methoden zu vereinfachen. Darum kann man nicht davon ausgehen, dass diese Antwort die optimale ist, dennoch liegt sie immer sehr nahe am Optimum.

2.4. Vergleich der Methoden für die Gestaltung von Experimenten

Zum Vergleich: Stellen Sie sich ein Verfahren vor, bei dem sieben Variablen in ihrer besten Kombination, zur Erreichung der höchst möglichen Antworten, wie ein Faktor in einem Test verwendet werden. 14 Mal wird die Kombination in den Tests angezeigt (Tabelle 1). Bei der vollfaktoriellen Methode werden aber 128 Kombinationen in den Tests erreicht (Tabelle 2). So berechnen Sie die Anzahl der Versuche: $n = L^m$. Wobei gilt: n ist die Anzahl der Versuche, L die Anzahl der Ebenen und m ist die Anzahl der variablen Faktoren.

Tabelle 1: Methoden eines Faktors in einer Zeit für sieben Faktoren

Ein Faktor in Zeit für 7 Faktoren

| Ran | A | B | C | D | E | F | G |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 6 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 11 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 12 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 13 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 14 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |

Tabelle 2: Verfahren der sieben Faktoren vollständige faktorielle Methode

| Full Factorial Experiments | | | A ₁ | | | | A ₂ | | | | |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|
| | | | B ₁ | | B ₂ | | B ₁ | | B ₂ | | |
| | | | C ₁ | C ₂ | |
| D ₁ | E ₁ | F ₁ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | F ₁ | G ₂ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₂ | | | | | | | | |
| | E ₂ | F ₁ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | F ₁ | G ₂ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₂ | | | | | | | | |
| D ₂ | E ₁ | F ₁ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | F ₁ | G ₂ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₂ | | | | | | | | |
| | E ₂ | F ₁ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | F ₁ | G ₂ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₂ | | | | | | | | |

Wie aus Tabelle 3 abzulesen ist, wurde für einen Prozess mit dem 7-variablen Bruchteil der vollfaktoriellen Methode eine Reihe von möglichen Kombinationen zwischen den Variablen betrachtet und untersucht, wofür 8 Tests durchgeführt wurden. (ohne Berücksichtigung der Wechselwirkungen)

Methoden wie die Taguchi-Methode sollen als nächstes untersucht werden. Es gibt auch andere statistische Methoden, bei denen in erster Linie in einem ähnlichen Prozess eine höhere Anzahl von Tests durchgeführt werden als bei der Taguchi-Methode. Doch auch wenn aus diesem Grund manchmal die Genauigkeit dieser Methoden höher ist als bei der Taguchi-Methode, sollte diese Methode dennoch durchgeführt werden.

Tabelle 3: Verfahren für den Bruchteil einer vollständigen faktoriellen Methode für 7 Faktoren

| Full Factorial Experiments | | | | A ₁ | | | | A ₂ | | | |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | | | B ₁ | | B ₂ | | B ₁ | | B ₂ | |
| | | | | C ₁ | C ₂ |
| D ₁ | E ₁ | F ₁ | G ₁ | T-1 | | | | | | | |
| | | | G ₂ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | | G ₂ | | T-3 | | | | | | |
| | E ₂ | F ₁ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | | G ₂ | | | | T-5 | | | | |
| | | F ₂ | G ₁ | | | | | T-7 | | | |
| | | | G ₂ | | | | | | | | |
| D ₂ | E ₁ | F ₁ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | | G ₂ | | | | | T-8 | | | |
| | | F ₂ | G ₁ | | | | | T-6 | | | |
| | | | G ₂ | | | | | | | | |
| | E ₂ | F ₁ | G ₁ | | | T-4 | | | | | |
| | | | G ₂ | | | | | | | | |
| | | F ₂ | G ₁ | | | | | | | | |
| | | | G ₂ | T-2 | | | | | | | |

2.5.- Taguchi Methode

Die statistische Taguchi-Methode ist nur ein Bruchteil der gesamten Versuche, denn die Taguchi-Methode kann in mehrere Stufen unterteilt werden:

- a) Tiefendenken bestimmt die Qualität, um den Einfluss des Parameters zu bestimmen.
- b) Design und Experimente.
- c) Analyse der Ergebnisse um die optimalen Bedingungen zu ermitteln.
- d) Bestätigte Tests mit optimalen Bedingungen.

Bei Abbildung 2 wird die Taguchi-Methode mit der Methode eines Faktors zu einem Zeitpunkt verglichen. Ein weiterer Vorteil der Taguchi Methode ist, wie in Tabelle 4 sichtbar, die Möglichkeit von parallelen Experimenten.

Um die Kombination von Faktoren in einer Studie geltend zu machen, werden Tabellen mit dem orthogonalen Array (OA) vorbereitet. Es wird ein orthogonales Array für ein Experiment mit zwei Ebenen von sieben Parametern $L(2^7)_8$ angegeben.

Orthogonale Array gibt es für Experimente mit mehreren Faktoren und mehreren Ebenen. Wenn die Interaktionen der Auswirkungen betrachtet werden, sollten eine oder mehrere Spalten der orthogonalen Arrays für die Wechselwirkungen bereitgestellt werden. Zum Beispiel, wenn eine Interaktion von den Faktoren A und B auf zwei Ebenen ausgewertet wird, besäße die dritte Spalte keinen Faktor. Wenn für die Interaktion zwischen den Faktoren A und B, $B \times A$ angezeigt wird, kann die Auswahl der Spalte für die Wechselwirkung zwischen zwei Faktoren nicht einfach sein, weshalb sie mit Hilfe einer Dreieckstabelle statt findet.

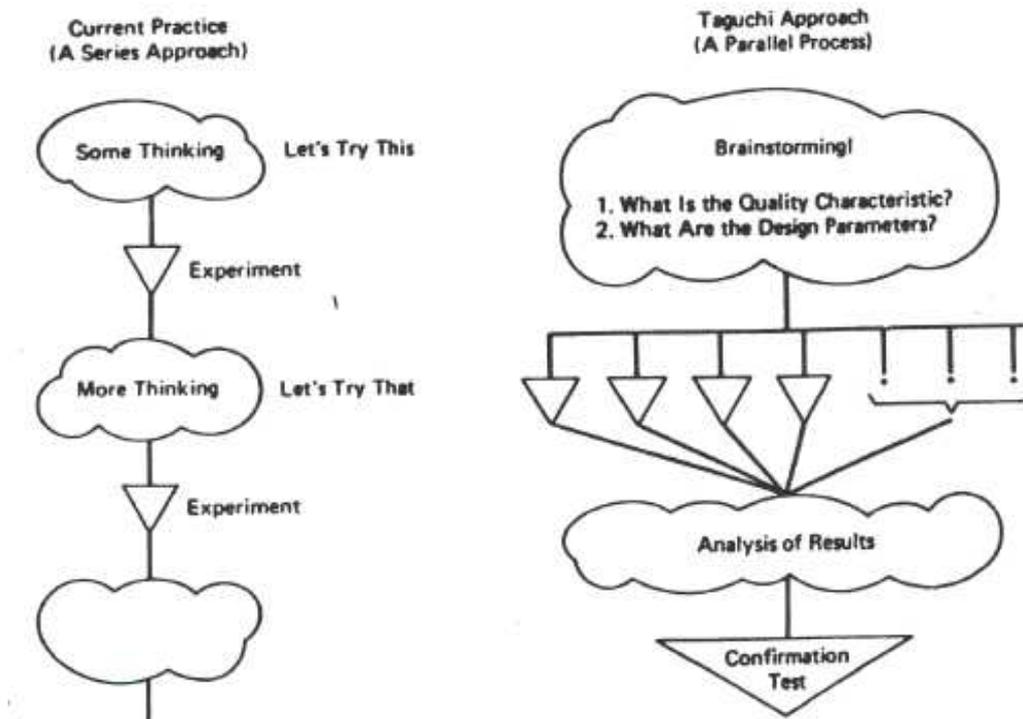


Abbildung 2/ Anhang III: Vergleich der Methode eines Faktors in einer Zeit und der Taguchi-Methode

Tabelle 4: orthogonal Array L8 (2⁷)

| Trial Number \ Column | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | D | E | F | G |
| T-1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| T-2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| T-3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| T-4 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| T-5 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| T-6 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| T-7 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| T-8 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |

Nach den orthogonalen Array-Experimenten sollten Analysen der Ergebnisse durchgeführt werden. Analysen, um eine oder mehrere der folgenden Ziele zu erreichen:

- a) die optimalen Voraussetzungen um eine optimale Maß an Qualität zu erreichen
- b) Schätzung des Anteils der einzelnen Faktor
- c) Schätzung die Antwort unter optimalen Bedingungen

Die optimale Bedingung wird mit den wichtigsten Auswirkungen der einzelnen Faktoren bestimmt. Die wichtigste Auswirkung wird durch eine einfache Rechnung, über welche Ebene die optimalen Faktoren besitzen, erhalten. Wenn die Wechselwirkung zwischen 2 Faktoren des orthogonalen Array-Designs in Ordnung ist, kann neben der Berechnung durch Zeichen festgestellt werden ob die Interaktion zwischen den Faktoren mangelnd ist oder überhaupt besteht. Effektiv wird zwischen den zwei Faktoren A und B und der Interaktion dieser beiden Faktoren bewertet, indem $B \times A$ und ein orthogonales Array mit L_4 verwendet wird. (Tabelle 5)

Tabelle 5: orthogonales Array L₄

| CONDITION \ COLUMN | L ₄ (2 ³) | | |
|--------------------|----------------------------------|---|---|
| | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 1 | 2 | 2 |
| 3 | 2 | 1 | 2 |
| 4 | 2 | 2 | 1 |

4 Versuche wurden durchgeführt und 4 Ergebnisse erhalten. Mit zwei Zuständen:

$B=B_1$ und $B=B_2$.

In Abbildung 3 wird eine Wechselwirkung zweier Faktoren dargestellt: Die Zwei Linien kreuzen sich. Wenn sie sich nicht kreuzen, existiert auf dieser Ebene zwischen diesen beiden Faktoren keine Wechselwirkung.

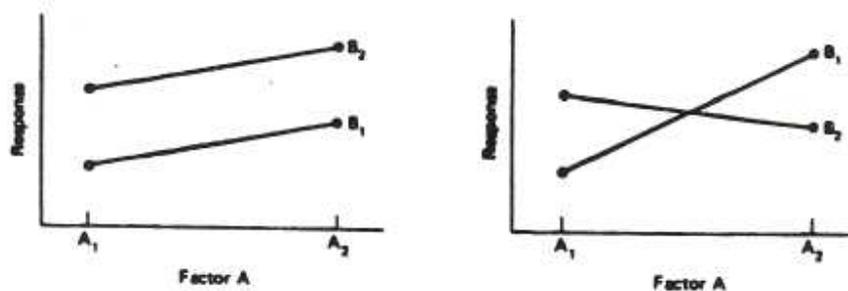


Abbildung 3/: Die wichtigsten Auswirkungen für die Bestimmung der Wechselwirkung zwischen zwei Faktoren

Mit dem Wissen über den Anteil der einzelnen Faktoren für die Antwort, können zur Kontrolle des Produktions-Prozesses allgemeinen vielen statistischen Ergebnisse verwendet werden. Zusätzlich zum Anteil der einzelnen Faktoren werden der Grad der Freiheit (f) und die Summe quadratischer (s^2) Parameter anhand der ANOVA-Tabelle berechnet. Die Parameter für die Berechnung der Fehler stehen mit den Faktoren in der Tabelle im Zusammenhang. Die Qualität des Ziels wird unter optimalen Bedingungen erhalten, was bisher weitgehend erfolgreich war. Die Analyse (ANOVA) ist eine statistische Operation.

5.2.1.- Analyse der Varianzberechnungen

Mit der Varianz der einzelnen Faktoren kann die Effektivität der Ergebnisse bestimmt werden. Der Varianzablauf ist wie folgt:

- Schritt 1: Ergebnissumme

$$T = \sum_{i=1}^9 y$$

In diesem Experiment ist y_i ist die Antwort jedes Tests.

- Schritt 2: Korrekturfaktor (C.F.)

$$C.F. = \frac{T^2}{N}$$

N ist die Anzahl der Tests.

- Schritt 3: Totale Quadrat Summe (SST)

$$SS_T = \sum_{i=1}^9 y_i^2 - C.F.$$

- Schritt 4: Quadrat Summe jedes Faktors

$$SS_A = \frac{A_1^2}{n_{A_1}} + \frac{A_2^2}{n_{A_2}} + \dots + C.F.$$

In der obigen Gleichung entspricht die Summe aller Antworten der Tests der Ebene A1.

- Schritt 5: Quadrat Summe für Fehler

$$SS_e = SS_T - (SS_A + SS_B + \dots)$$

- Schritt 6: Berechnung der Freiheitsgrade der einzelnen Faktoren und das gesamte Maß an Freiheit (DOF).

Anzahl der Versuche- 1 = Grad der totalen Freiheit

Anzahl der Faktor Ebene- 1 = Grad der Freiheit eines jeden Faktors

- Schritt 7: Berechnung der Varianz

$$V_A = \frac{SS_A}{f_A}$$

Grad der Freiheit jedes Faktors

- Schritt 8:

$$SS'_A = SS_A - V_e f_A$$

$$SS'_e = SS_e = V_e (f_A + f_B + \dots)$$

- Schritt 9: Anteil der Parameter der Ergebnisse (p)

$$P_A = \frac{SS'_A}{SS_T} \times 100$$

- Schritt 10: Verhältnis von Varianz

$$F_A = \frac{V_A}{V_c}$$

Dieser Faktor beinhaltet die Ergebnisse des Vertrauens, das für F auf verschiedene Ebenen in der Fisher-Tabelle entwickelt wurde. Wenn das F, das von F in der Fisher Tabelle erhalten wird, größer ist, kann daraus geschlossen werden, dass der maßgebliche Faktor bedeutsam war und dieser eine wichtige Rolle im System spielt.

- Schritt 11:

$$C.I. = \pm \sqrt{F(1, n_2) \times \frac{V_e}{N_e}}$$

Hier:

F (1,n2): die Größe des F ist wichtig, da das gewünschte Konfidenzniveau, der Grad der Freiheit 1 und eine gewisse Fehlerfreiheit (n2) im Nenner auftreten.

Ve: Varianzfehler

Ne: Anzahl der effektiven Antworten

$$N_e = \frac{\text{Ergebnissumme}}{\text{Freiheitsgrad von Faktoren die im Mittelwert Einflüsse haben} + \text{das Freiheitsgrad-Mittel (ist immer 1)}}$$

3.4. Die Rentabilität in optimalen Bedingung schätzen

$$y_{\text{opt}} = \bar{T} + (\bar{A} - \bar{T}) + (\bar{B} - \bar{T}) + (\bar{C} - \bar{T}) + (\bar{D} - \bar{T})$$

In dieser Gleichung ist \bar{T} gleich $\frac{T}{N}$. Die Bedingungen \bar{A} , \bar{B} , \bar{C} , \bar{D} haben die Faktoren, die eine höhere Effizienz als andere bedeuten.

3.5. Berechnung der Konfidenzintervalle in optimalen Bedingungen

$$C.I. = \pm \sqrt{F(1, n_2) \times \frac{V_e}{N_e}}$$

Die statistischen Analysen erfolgen mit dem Programmpaket R

7 REFERENZEN

Referenzen

- [1] خسروي، كيانوش. «توليد اتانول از ضايعات سيب به روش تخمير حالت جامد» پايان نامه [1] كارشناسي ارشد، دانشكده فني و مهندسي دانشگاه تربيت مدرس، 1375.
- [2] قضايي پور، محمد حسن. «توليد اتانول از ضايعات انگور به روش تخمير حالت جامد و غني سازي باقيمانده از پروتئين تك ياخته» پايان نامه كارشناس ارشد، دانشكده فني و مهندسي دانشگاه تربيت مدرس، 1374.
- [3] عزيزي، مجيد. «كاهش ضايعات محصولات باغي در دوره پس از برداشت»، پايان نامه كارشناسي ارشد گروه باغباني، دانشكده كشاورزي، دانشگاه فردوسي مشهد.
- [4] گروه پژوهش، اتانول مكمّل سوخت خودروها، www.shana.ir.1383
- مرکز بيوشيمي و كنترل محيط [5] مقصودي، ويدا. دستور كار آزمايشگاه كنترل كيفي مواد غذايي زيست دانشگاه صنعتي شريف.
- [6] M. Roehr, the Biotechnology of Ethanol-Classical and Future Application. New York: Wiley-VCh, 2001.
- [7] H.W. Doello, D.A. Michell, C.E. Rolz, "Solid Substrate Culitvation". Elsevier Science 1992.
- [8] Montgomery, Douglas, C. Design and Analysis of Experiments, 3rd Ed. New York: Vannostr and Reinhold, 1991
- [9] G.R. Nagodaw, T.W., Thana, Yeast Techology, 2nd Ed., New York: Vannostr and Reinhold, 1991.
- [10] Roy, R.K. Aprimer on the Taguchi Method, New York: Van Noster & Reinhold, 1990.
- [11] Morrison and Boyd, Organic Chemistry, 4th Ed., Vol. 1, Allyn and Bacon Inc, 1978.
- [12] Murray Moo-Young. Comprehensive Biotechnology, Vol.3, Pergamon Press, 1985.

[13] Maipella, Wilke, B.Ch.R, Blanch, H.W., "Alcohol Production and Recovery", Adv. Bichem. Eng, 20, 43-93.

[14] G. Laufenberg, B. Kunz, M. Nystroem, "Transformation of Vegetable Waste into Value Added Products: (A) The Upgrading Concept. (B) Practical Implementations" Bioresource Technology, 7, 2003, 167-198.

[15] Kumar,D., Hain, V.K., Shanker, G., Srivastava, A., Utilisation of Fruits Waste for Citric Acid Production By State Fermentation", Process Biochemistry, 38, 2003, 1725-1729.

[16] J.R., Mielenz," Ethanol Production from Biomass: Technology and Commercialization Status", Current Opinion in Microbiology, 4, 2001, 324-329

[17] Farooq Latif, Mohammad Ibrahim Rajoka, Production of Ethanol and Xylitol from Corn Cobs by Yeasts", Bioresource Technology, 77, 2001, 57-63.

[18]Thierry Montesinos, Jean-Marie Navarro, "Production of Alcohol from Raw Wheat Flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*", Enzyme and Microbial Technology, 27, 2000, pp 362-370.

[19]A. Pandey, C.R. Soccol, D. Mitchell, "New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products", Process Biochemistry, 35, 2000, 1153-1169.

[20] Nigam, J.N., "Continuous Ethanol Production from Pineapple Cannery waste Using Immobilized Yeast Cells", Journal of Biotechnology, 80, 2000, 189-193.

[21] Kenji Tanaka, Zakpaa D.Hilary and Ayaaki Ishizaki.

"Investigation of the Utility of Pineapple Juice and Pineapple Waste Material as Low-Cost Substrate for Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis*", J. of Bioscience and Bioengineering, 87/5, 1999, 642-646.

- [22] Nigam, J.N., "Continuous Ethanol Production from Pineapple Cannery Waste", J. of Biotechnology, 72, 1999, 197-202.
- [23] Seyed Abbas Shojaosadati, "Solid State Fermentation of Untreated Leached Beet Pulp with *Neurospora sitophila*", Biotechnology Group, Chemical Engineering Department, Tarbiat Modares University.
- [24] Murray Moo-Young, Yusuf Chisti, Dagmar Vlach, "Fermentation Conversion of Cellulose Substrate to Microbial Protein by *Neurospora sitophila*", J. Biotech. Lett., 14, No.9, Sept. 1992.
- [25] Ngadi, M.O., Correia, L.R., "Solid State Ethanol Fermentation of Apple Pomace as Affected by Moisture and Bioreactor Mixing Speed", J. Food Science, 57/3, 1992, 54-59.
- [26] Durand, A., Chereou, D., "A new pilot Reactor for Solid State Fermentation", Biotech Bioeng, 31, 1988, 476-486.
- [27] Hang Y. D., Lee C. Y., and Woodams, E.E, "A Solid- State Fermentation of Grape Pomace for Ethanol Production", J. Biotechnology, 8/1, 1986, 53-56.
- [28] Hang, Y.D., Lee, C.Y., and Woodams, E.E, "A Solid State Fermentation System for production of Ethanol from Apple Pomace", J. Food Sci., 1982, 1852-1856.
- [29] Rogers, P.L., Hill, K, J. Lee, M.E.D. Etride, "High Productivity Ethanol Fermentation with *Zymomonas mobilis*", Process Biochem, 1980, 15, 24-29.
- [30] Gupa, L.K., Phthak G. and Tiwari, R.P., "Effect of Nutrition Variables on Solid State Fermentation of Apple Pomace by Yeasts", J. Sci. Food Agric., 50, 1990, 55-62.