

## PROIZVODNJA BIOETANOLA NA HIDROLIZATIMA KUKURUZNOG BRAŠNA

Svetlana Nikolić, Marica Rakin, Maja Vukasinović, Slavica Šiler-  
Marinković, Ljiljana Mojović  
Tehnološko metalurški fakultet, Beograd

### Izvod

U radu je ispitivan postupak dvojno enzimске hidrolize kukuruznog brašna pomoću komercijalnih enzima  $\alpha$ -amilaze (Termamyl 120L, Novozymes) i amiloglukozidaze (Supersan 240L, Novozymes) i fermentacija hidrolizata pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (iz kolekcije kultura BIB-TMF, Beograd). Uslovi hidrolize kao što su koncentracija supstrata i enzima i vreme dejstva pojedinih enzima su optimizovani sa aspekta oba procesa (i fermentacije i hidrolize).

Dobijeni hidrolizati kukuruznog brašna su se pokazali kao pogodni supstrati za alkoholnu fermentaciju pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, pri čemu je ostvaren prinos etanola od više od 80 % od teorijskog prinosa prinosa produkta po substratu  $Y_{P/S}$  (g /g) i zadovoljavajuća volumetrijska produktivnoost P (g /l ·h) U toku postupka uporednog odvijanja hidrolize i fermentacije nije primećen nedostatak fermentabilnih šećera u podlozi. Na ovaj način je moguće skratiti ukupno vreme procesa i ostvariti određene energetske uštede. Povećanje koncentracije inokuluma kvasca *Saccharomyces cerevisiae* sa 1 % do 2 % daje mogućnost da se skрати vreme fermentacije sa 48 na 32 sata, respektivno.

**Ključne reči:** Enzimска hidroliza, Skrob, Kukuruz, Alkoholna fermentacija.

## Uvod

Bioetanol proizveden iz obnovljivih poljoprivrednih sirovina predstavlja jedno od najznačajnijih savremenih alternativnih goriva. Danas se u Evropi i Americi on već uobičajeno koristi kao dodatak gorivima u koncentracijama koje mogu dostići i do 15 % [1-4]. Korišćenjem bioetanola kao goriva mogu se ostvariti znatno bolji efekti u očuvanju životne sredine u odnosu na korišćenje konvencionalnih goriva. Evropska unija je 2001. godine usvojila direktivu prema kojoj se zakonski reguliše upotreba bioetanola kao dodatka gorivima. U toku 2005. godine količina dodatog bioetanola treba da iznosi 2 % na ukupnu količinu goriva, s tim da se do 2010. godine poveća do 5.75 % [5]. Neke od zemalja članica Evropske unije kao na primer Finska, Švedska i Austrija su već ispunile ovaj zahtev [5].

Svetska proizvodnja etanola je u 2003-ćoj godini iznosila 32 Mm<sup>3</sup> [6]. Glavni svetski proizvođači su Brazil i US koji zajedno proizvode oko 80% ukupne svetske proizvodnje. Oko 60 % etanola se proizvodi fermentacionim postupcima [7]. Osnovne sirovine za proizvodnju bioetanola u svetu su šećerna trska (Brazil) i kukuruz (USA), mada se mogu koristiti i mnoge druge poljoprivredne sirovine bogate fermentabilnim šećerima, ili ugljenohidratnim jedinjenjima kao što su skrob, celuloza i drugim koja se mogu hidrolizovati do fermentabilnih šećera. U našoj zemlji su od posebnog interesa za proizvodnju etanola sirovine kao što su kukuruz, krompir, topinambur, sirak i tritikale, kao i lignocelulozna biomasa [8].

Prilikom izbora i razvoja tehnološkog postupka proizvodnje bioetanola jedan od najvažnijih faktora je ekonomika samog procesa. [9-11]. Danas se teži da se projektuju takvi postupci koji će sami sebe isplatiti ili tzv. "samoodrživi postupci". Naravno da je cena sirovine i njena raspoloživost jedan od osnovnih faktora u koncipiranju takvih tehnologija [12, 13]. Ekonomska evaluacija procesa proizvodnje bioetanola na bazi kukuruza se može izvesti poredjenjem energije koja se utroši u procesu proizvodnje i energije koja se može ostvariti proizvedenim bioetanolom. Na bazi takve jedne studije koja je uradjena u Americi početkom 1980-tih godina Pimentel [13] je zaključio da su energetske potrebe za proizvodnju etanola na bazi kukuruznog zrna bile veće od energetske sadržaja dobijenog etanola. Međutim, nedavno su Shapouri i saradnici [14] i Kim i Dale [1] procenili da energetska sadržaj proizvedenog etanola može biti veći od energije utrošene za njegovu proizvodnju. Smatra se da je ovo rezultat toga što je u poslednjoj deceniji ostvaren značajan tehnološki pomak u samom procesu, i zato što se danas u poljoprivrednoj proizvodnji kukuruza mogu ostvariti veći prinosi kukuruza uz manje korišćenja hemijskih sredstava.

Prva i veoma značajna faza u tehnološkom postupku proizvodnje bioetanola na kukuruzu je hidroliza kukuruznog skroba. Osnovni cilj u ovoj fazi je da se izvrši efikasna konverzija dve osnovne polimerne komponente skroba: amiloze, linearnog makromolekula na bazi glukoze vezane  $\alpha$ -D-(1-4) glukozidnim vezama, i amilopektina, razgranatog makromolekula sastavljenog iz glukoznih jedinica vezanih  $\alpha$ -D-(1-4) i  $\alpha$ -D-(1-6) vezama, do fermentabilnih šećera koji se zatim mogu fermentisati do etanola pomoću određenih vrsta kvasaca ili bakterija. U novije vreme razvijen je takozvani "dvostepeni hladni enzimski postupak" hidrolize skroba [7] u kome se u prvom stepenu primenjuje termostabilna  $\alpha$ -amilaza, enzim koji vrši likvefakciju skroba razgrađujući unutrašnje  $\alpha$ -D-(1-4)-glukozidne veze [15-18], a zatim se u drugom stepenu koristi glukoamilaza [19,20], enzim koji vrši dalju razgradnju skroba hidrolizom  $\alpha$ -D-(1-4) i  $\alpha$ -D-(1-6)-glukozidnih veza skroba počevši od neredukujućeg kraja makromolekula. Krajnji produkt hidrolize skroba je glukoza. Osnovne prednosti dvostepenog postupka su manja potrošnja energije i niži sadržaj neglukozidnih nečistoća.

Cilj ovog rada je bio da se eksperimentalno ispita dvojno enzimaska hidroliza kukuruznog brašna pomoću komercijalnih enzima, a zatim alkoholna fermentacija dobijenih hidrolizata sa različitim količinama inokuluma kvasca iz roda *Saccharomyces cerevisiae*. Takođe je bilo potrebno optimizovati koncentracije supstrata i enzima i vreme potrebno za dejstvo enzima uzimajući u obzir efekte i hidrolize i fermentacije.

## **Materijal i metode**

### **Kukuruzno brašno**

U radu je korišćeno kukuruzno brašno dobijeno postupkom suvog mlevenja kukuruza iz pogona skroba „Jabuka-Pančevo“. Brašno je sadržalo 90% čestica prosečne veličine između 0.5 i 1 mm i 10% čestica veličine manje od 0.5 mm.

### **Enzimi i mikroorganizmi**

Za utečnjavanje kukuruznog brašna korišćen je komercijalni preparat termosabilne  $\alpha$ -amilaze iz *Bacillus licheniformis*, Termamyl 120 L, aktivnosti 120 KNU/g (KNU=Kilo Novo Jedinica  $\alpha$ -amilaze. 1 KNU je količina enzima koja razgrađuje 5.26 g skroba u toku 1 časa prema Novozyme-ovoj standardnoj metodi za utvrđivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze). Za dalju saharifikaciju skroba korišćen je Supersan 240L, komercijalni preparat na bazi *Aspergillus niger*

glukoamilaze, deklarirane aktivnosti od 240 AGU/g (AGU je količina enzima koja hidrolizuje 1  $\mu$ mol maltoze po minuti pod specificiranim uslovima). Enzimi su dobijeni od Novozymes, Danska.

Za fermentaciju hidrolizata kukuruznog skroba korišćena je kultura *Saccharomyces cerevisiae* iz kolekcije BIB-TMF, Beograd, koja je održavana na kosom sladnom agaru. Ova hranjiva podloga je sadržala sladni ekstrakt (3 g/l), kvašćev ekstrakt (3 g/l), pepton (5 g/l), agar (20 g/l) i vodu (do 1 l). Da bi se umnožila dovoljna količina inokuluma za fermentaciju kvasac je sa kosog agara presejavan u balone (500 ml) sa tečnom podlogom gde je aerobno gajen u toku 48 časova na vodenom kupatilu sa mućkanjem na 32 °C, nakon čega je vršena separacija kulture pomoću laboratorijske centrifuge. Tečni medijum u kome je kultura gajena je sadržao kvašćev ekstrakt (3 g/l), pepton (3,5 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0 g/l),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (1,0 g/l),  $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$  (1,0 g/l), glukozu (10 g/l) i destilovanu vodu. Hidrolizati kukuruznog brašna su zasejavani sa različitim količinama inokuluma (1 %, 1,35 % i 2% težinskih).

### Izvodjenje hidrolize

Za ispitivanja su pripremane smeše kukuruznog brašna i vode u različitim odnosima (1:1,25; 1:3; 1:4; 1: 5; respektivno) i u smešu je dodavano 60 ppm  $\text{Ca}^{2+}$  jona (kao  $\text{CaCl}_2$ ) radi aktivacije enzima. Smeša je zatim tretirana enzimima u dva stepena. Prvi stepen, likvefakcija skroba kukuruznog brašna, je izvodjen na 85 °C pri pH=6.0 sa različitim koncentracijama Termamyl-a 120 L, a drugi, saharifikacija, je izvodjen na 55 °C i pH=5,0 sa različitim koncentracijama Supersan-a 240L. Hidroliza je izvodjena u balonima u termostatiranom vodenom kupatilu uz mešanje ( $v=150$  rpm).

### Alkoholna fermentacija hidrolizata kukuruznog brašna

Alkoholna fermentacija hidrolizata uzoraka kukuruznog brašna je izvodjena anaerobno sa *Saccharomyces cerevisiae* pri sledećim uslovima: pH=5,0;  $t=32$  °C; brzina mešanja,  $v=100$  rpm. Fermentacija sa različitim koncentracijama inokuluma je trajala do 48 časova. U toku fermentacije praćena je potrošnja supstrata (glukoze) i produkcija etanola.

### Analitičke metode

Sadržaj skroba je određivan polarimetrijskom metodom po Ewers-u [21]. Sadržaj vode u kukuruznom brašnu je određen standardnom metodom sušenja na 105 °C do konstantne mase. Sadržaj masti je određivan metodom

po Soxlet-u; sadržaj proteina metodom po Kjehladl-u, a sadržaj pepela metodom spaljivanja na 650 °C u toku 2 sata [22]. Koncentracija redukujućih šećera u toku hidrolize kukuruznog brašna je određivana metodom sa 3, 5-dinitrosalicilnom kiselinom [23] na bazi standardne kriva dobijene merenjem apsorbancije standardnih koncentracija rastvora glukoze na 570 nm. Koncentracija alkohola je određivana na bazi gustine alkoholnih destilata na 20 °C izražene u težinskim %. Prilikom analitičkih određivanja merenja su vršena u triplikatu i određivane su srednje vrednosti.

## Rezultati i diskusija rezultata

### Enzimaska hidroliza

U eksperimentima je korišćeno kukuruzno brašno dobijeno procesom suve meljave kukuruza bez prethodne separacije klice. Analizom je utvrđen sadržaj osnovnih komponenti kukuruznog brašna i prikazan u Tabeli 1.

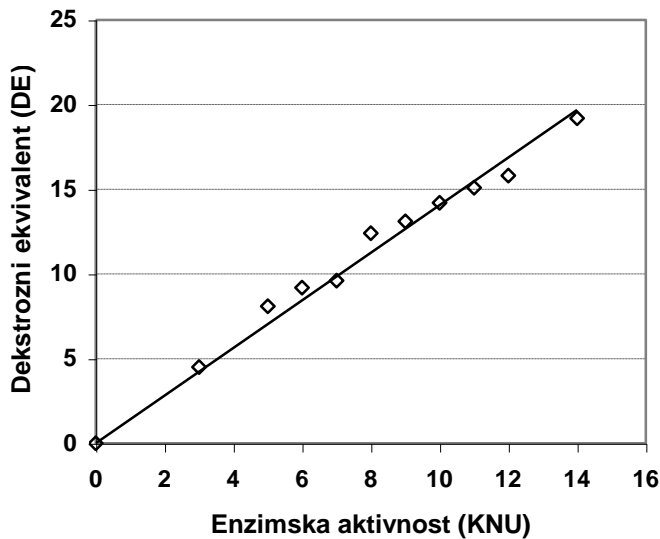
Tabela 1. Hemijski sastav kukuruznog brašna

Komponenta sastava	(%)
Skrob	70.82
Proteini	11.80
Masti	7.89
Pepeo	5.58
Voda	3.91

Na stepen hidrolize prirodnog skroba iz kukuruznog brašna mogu uticati sledeći faktori: koncentracija supstrata, vrsta i koncentracija primenjenih enzima i primenjeni uslovi sredine kao što su pH, temperatura i brzina mešanja. Prvi set eksperimenata u ovom radu je izveden u cilju definisanja uticaja koncentracije  $\alpha$ -amilaze (Termamyl-a) i vremena potrebnog za odgovarajuću likvefakciju kukuruznog skroba. Početna koncentracija supstrata u ovim eksperimentima, koja je definisana odnosom mase kukuruznog brašna i vode (tzv. hidromodulom) je iznosila 17,5% što odgovara odnosu mase kukuruznog brašna i vode od 1:3.

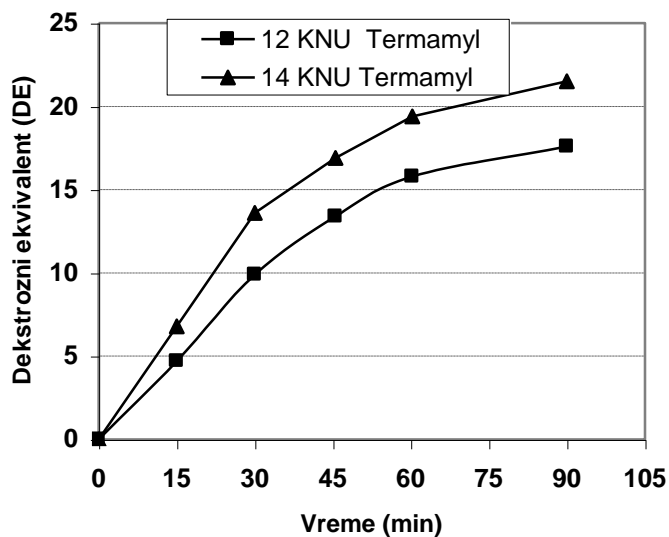
Na slici 1. je prikazan uticaj koncentracije Termamyl-a (izražene u jedinicama aktivnosti) na dekstrozni ekvivalent (DE) hidrolizata kukuruznog brašna. Sa slike je očigledno da je sadržaj glukoze u hidrolizatu direktno proporcionalan dodatnoj aktivnosti enzima u posmatranom vremenu. Kao što se vidi, nakon jednog sata dejstva 12 KNU Termamyl-a može se postići vrednost DE od 16, dok se povećanjem koncentracije enzima na 14 KNU dostiže

vrednost DE od 18. Ukoliko bi se u ovoj prvoj fazi hidrolize povećalo vreme dejstva enzima (Slika 2) mogle bi se ostvariti i veće vrednosti DE sa istim koncentracijama enzima, ili bi se pak primenom nižih koncentracija mogle postići gore navedene konverzije. Medjutim, mi smatramo da produžetak faze likvefakcije ne bi bio opravdan jer su u ovoj fazi primenjuju povišene temperature koje kasnije mogu deaktivisati enzim. Takodje, produžetak trajanja enzimskog dejstva u fazi likvefakcije iziskuje i veći energetska utrošak.

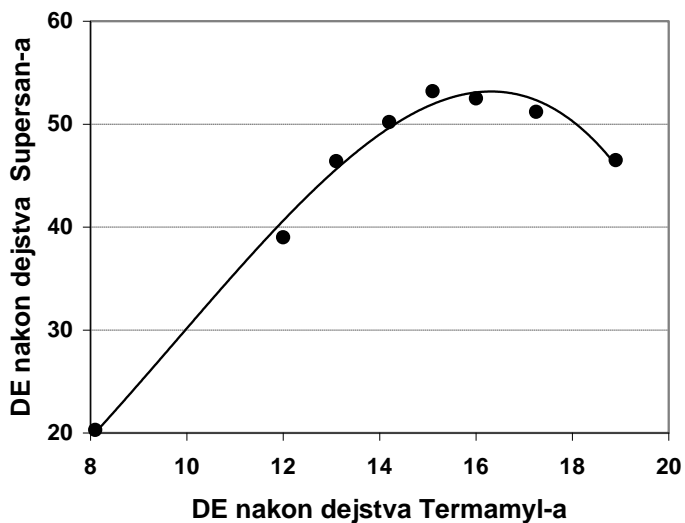


**Slika 1.** Uticaj dodate početne aktivnosti  $\alpha$ - amylase (Termamyl) na DE smeše kukuruznog brašna i vode. Uslovi reakcije: Hidromodul: 1:3;  $t = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6.0$ ;  $\tau = 1\text{ h}$ .

Sledeći cilj u našem radu je bio da se utvrdi optimalni stepen likvefakcije smeše kukuruznog brašna i vode koji je potreban da bi se ostvarili dobri efekti u sledećem stepenu hidrolize – saharifikaciji.. Zbog toga smo u daljem radu dobijene hidrolizate kukuruznog brašna sa različitom koncentracijom glukoze (DE) podvrgli dejstvu saharifikacionog enzima Supersan glukoamilaze. Rezultati su prikazani na Slici 3. Najveća vrednost DE nakon tretmana u oba stepena je postignuta kada je DE nakon tretmana u prvoj fazi sa Termamyl-om bio oko 16 (Slika 3). Slična vrednost DE nakon likvefakcije je objavljena i od strane drugih istraživača [7, 24].

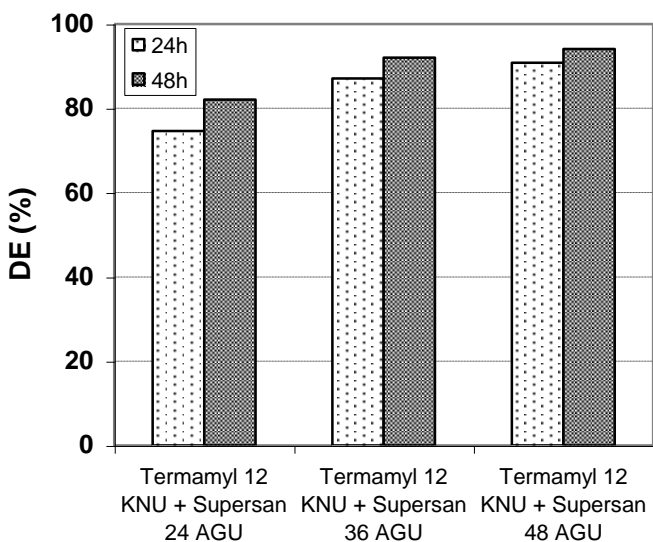


**Slika 2.** Kinetyka hidrolize kukuruznog brašna pomoću  $\alpha$ -amilaze (Termamyl). Uslovi reakcije: Hidromodul: 1:3;  $t = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6.0$ .



**Slika 3.** Uticaj DE vrednosti hidrolizata iz faze likvefakcije sa Termamyl-om na DE vrednost hidrolizata dobijenih dejstvom Supersan-a. Uslovi reakcije za Termamyl: Hidromodul: 1:3;  $t = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH} = 6.0$ ;  $\tau = 1\text{ h}$ . Uslovi reakcije za Supersan:  $t = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH} = 5.0$ ;  $A = 24\text{ AGU}$ ;  $\tau = 4\text{ h}$ .

Da bi utvrdili koja je optimalne koncentracija glukoamilaze, saharifikacionog enzima koji je neophodan za potpunu konverziju skroba do glukoze, hidrolizat kukuruznog brašna dobijen tretmanom sa 12 KNU Termamyl-a (DE=16) je zatim tretiran sa različitim koncentracijama Supersan glukoamilaze. Dobijeni rezultati sadržaja glukoze (DE) su prikazani na Slici 4. Sa slike se može videti da je najveća konverzija skroba iz kukuruznog brašna (DE=93.,8 %) postignuta kombinovanim dejstvom 12 KNU Termamyl-a i 48 AGU Supersan-a nakon 48 časova. Slične, prilično visoke konverzije skroba iz kukuruznog brašna (DE=92,1 %) su postignute dvojno enzimskom hidrolizom korišćenjem i manjih aktivnosti Supersana (36 AGU) što ukazuje da je moguće koristiti i manje količine ovog enzima. U svim eksperimentima je nakon 24 časa postignuto više od 90 % ukupne konverzije supstrata.



**Slika 4.** Uticaj dodate aktivnosti Supersan-a na DE vrednosti hidrolizata.

Uslovi reakcije za Termamyl: Hidromodul: 1:3;  $t = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=6.0$ ;  $\tau=1\text{ h}$ ;  $A= 12\text{ KNU}$ . Uslovi reakcije za Supersan:  $t = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=5,0$ ;  $A=24, 36\text{ ili }48\text{ AGU}$ ;  $\tau = 24\text{ i }48\text{ h}$ .

Kombinovanim dejstvom enzima koje smo koristili u našim ispitivanjima postignuta je visoka efikasnost konverzije kukuruznog skroba koja se može uporediti sa rezultatima drugih istraživača. Arasaratnam i saradnici [25] su korišćenjem slične kombinacije enzima amilaze i amilogluzidaze postigli niži sadržaj glukoze na kukuruznom brašnu od 76 %. Razlike u rezultatima se mogu pripisati razlikama u sastavu polaznih supstrata,



različitoj početnoj koncentraciji supstrata, kao i različitim pimenjenim eksperimentalnim uslovima. Dettori-Campus i saradnici [26] su ispitivali hidrolizu skrobnih granula iz različitih žitarica pomoću amilaze iz *Bacillus stearothermophilus* i ostvarili oko 80% konverzije za skrob iz ječma, kukuruza i pirinča, i nešto niže vrednosti za skrob iz krompira. Slične prinose, niže od 80%, su postigli u svojim radovima i Kimura i Robyt [27]. Leach i Schoch [28] su došli do zaključka da je sirovi skrob iz kukuruza podobniji za hidrolizu pomoću  $\alpha$ -amylase od kukuruznog skroba sa visokim udelom amilaze. Vrlo visoke prinose u konverziji skroba od oko 96 % nakon 24 časa su postigli Karakastanis and Liakopoulos-Kyriakidis [29] kombinovanim dejstvom  $\alpha$ -amilaze i glukoamilaze. Globalno posmatrano, u eksperimentalnim radovima je pokazano da je dvojni enzimski postupak efikasniji nego jednostepeni.

## **Alkoholna fermentacija hidrolizata kukuruznog brašna**

Uticaj početne koncentracije supstrata

U prvom setu eksperimenata je ispitivan uticaj početne koncentracije kukuruznog brašna na alkoholnu fermentaciju. Smeše sa različitim koncentracijama kukuruznog brašna i vode koje su odgovarale početnim koncentracijama skroba od  $C_0=11,5\%$ ;  $14\%$ ;  $17,5\%$  i  $20\%$  su prvo podvrgnute likvefakciji dejstvom Termamyl-a ( $\tau=1\text{h}$ ,  $t=85\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=6.0$ ,  $12\text{ KNU}$  na  $100\text{ g}$  of kukuruznog brašna), a zatim su ohladjene do  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , podešene na  $\text{pH}=5$  i tretirane sa Supersan-om ( $36\text{ AGU}$  na  $100\text{ g}$  kukuruznog brašna) u toku  $4\text{ časa}$ . Nakon toga hidrolizovane smeše su ohladjene do  $32\text{ }^\circ\text{C}$ , zasejane sa  $1\%$  težinskih *Saccharomyces cerevisiae* i podvrgnute alkoholnoj fermentaciji. Rezultati utvrdjenih parametara alkoholne fermentacije su prikazani u Tabeli 2.

Utvrđeno je da je početna koncentracija supstrata imala značajan uticaj i na efekte hidrolize i fermentacije. Da bi se postigao bolji prinos bilo u fazi hidrolize ili fermentacije podesno je koristiti niže početne koncentracije supstrata jer se tada ne javlja inhibicija supstratom. Arasaratnam i sar. [25] su objavili da su postigli slabiju hidrolizu skroba kukuruznog brašna na visokim početnim koncentracijama skroba. Tako napr. prilikom hidrolize  $16\%$ -tne suspenzije kukuruznog brašna postigli su prinos glukoze od  $76\%$ , a hidrolizom  $40\%$ -tne suspenzije ostvarili su svega  $50,2\%$  glukoze. Pored u hidrolizi, inhibicija supstratom se može javiti i u toku alkoholne fermentacije [30, 9]. Ona postaje naročito izražena pri koncentraciji supstrata iznad  $15\%$  [24]. Kao što se vidi iz rezultata prikazanih u Tabeli 2, maksimalna koncentracija etanola (%) i maksimalna vrednost prinosa produkta po supstratu ( $Y_{P/S}$ ) su postignuti korišćenjem najnižih početnih koncentracija kukuruznog skroba ( $11,5\%$ ).

Tabela 2. Rezultati šaržne fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna sa različitim početnim sadržajem supstrata

Hidro-modul	Početna koncentracija supstrata (% skroba)	DE nakon dejstva enzima <sup>1</sup>	Max. % etanola <sup>2</sup>	% od teorijskog prinosa etanola	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	P (g/l · h)
1:5	11,5	75,5	5,7	89,2	0,50	1,21
1:4	14,0	72,2	6,8	87,5	0,48	1,41
1:3	17,5	68,1	7,7	78,5	0,44	1,60
1:2,5	20	58,4	6,9	62,4	0,34	1,43

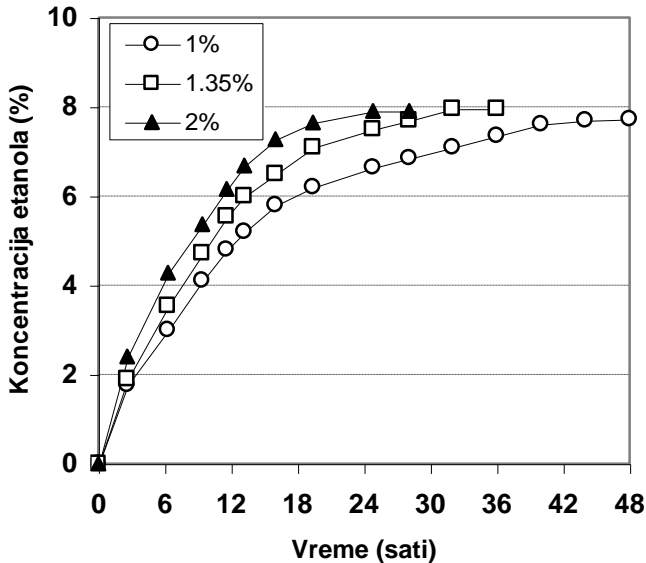
<sup>1</sup>Enzimski treatment: 12 KNU Termamyl-a; t= 85 °C; pH=6.0. τ= 1 h; 36 AGU Supersan-a; t= 55 °C; pH=5.0; τ= 4 h.

<sup>2</sup>Alkoholna fermentation: t= 32 °C; pH=5.0; τ= 48 h; 1% *Saccharomyces cerevisiae*.

Sa aspekta ekonomike procesa poželjno je da se ostvari što je moguće veća koncentracija etanola da bi se tako snizili troškovi destilacije etanola, koja predstavlja značajnu stavku u ekonomici celokupnog procesa [2,30]. Pored toga, sa ekonomskog aspekta je bolje koristiti veće početne koncentracije supstrata jer se time smanjuje reaktorska zapremina [7]. Na osnovu ostvarenih koncentracije etanola, prinosa produkta po supstratu (Y<sub>P/S</sub>) i zapreminske produktivnosti etanola (P) prikazanih u Tabeli 2 i izloženih ekonomskih razmatranja, može se sugerisati korišćenje početne koncentracije supstrata od 17,5 % koja odgovara hidromodulu od 1:3.

### Uticaj koncentracije inokuluma

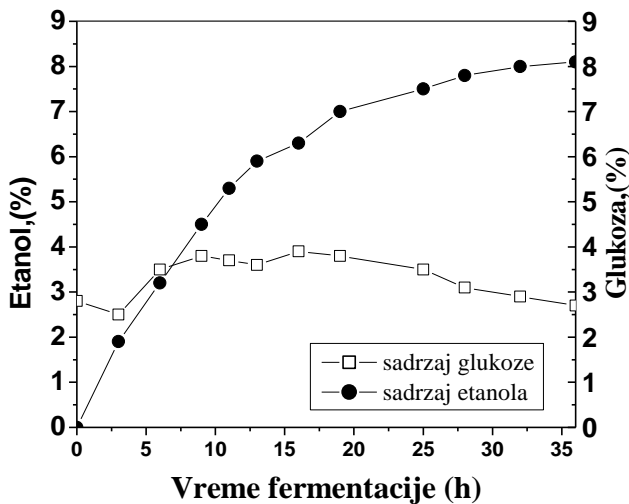
Ispitivana je alkoholna fermentacija hidrolizata skroba kukuruznog brašna sa različitim koncentracijama inokuluma *Saccharomyces cerevisiae* i rezultati su prikazani na Slici 5. Kao što se može videti, povećanje koncentracije inokuluma nije imalo značajnog efekta na ostvarenu koncentraciju etanola. Fermentacijom hidrolizata kukuruznog skroba sa 1 %; 1,35 %; i 2 % inokuluma je ostvaren prinos od 78,5; 80,1; i 81,6 % od teorijskog prinosa etanola, respektivno. Medjutim., može se primetiti da se sa povećanjem koncentracije inokuluma može smanjiti vreme fermentacije. Tako je fermentacija koja je bila zasejana sa 1% kvasca trajala 48 sati; sa 1,35 % kvasca 36 sati, dok je sa 2% kvasca trajala oko 32 sata (Slika 5).



**Slika 5.** Uticaj koncentracije inokuluma *Saccharomyces cerevisiae* na fermentaciju hidrolizata kukuruznog skroba. Uslovi enzimske reakcije: Hidromodul: 1:3; 12 KNU Termamyl-a na  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=6,0$ ;  $\tau=1\text{ h}$ ; 36 AGU Supersan-a na  $t=55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=5,0$ ;  $\tau=4\text{ h}$ . Uslovi fermentacije:  $\text{pH}=5,0$ ;  $t=32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; brzina mešanja  $v=100\text{ rpm}$ . Koncentracije inokuluma *Saccharomyces cerevisiae*: 1 %; 1,35 %; i 2 % .

#### Usporedna hidroliza i fermentacija

U cilju skraćenja procesa i u cilju smanjenja energije za proizvodnju etanola, ispitan je usporedni proces hidrolize (drugi stepen) i fermentacije hidrolizata kukuruznog brašna. Smeša kukuruznog brašna sa vodom (koncentracija skroba  $C_0=17,5\%$ ) je prvo utečnjena (12 KNU Termamyl-a na 100 g of kukuruznog brašna,  $\tau=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6$ ), zatim je smeša ohladjena do  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}$  je podešen do 5,0, i vršena je usporedna fermentacija sa *Saccharomyces cerevisiae* i hidroliza sa Supersan glukozidazom. Kinetika ovog procesa je prikazana na Slici 6.



**Slika 6.** Tok uporedne hidrolize i fermentacije

Uslovi prvog stepena enzimskog dejstva: Hidromodul: 1:3; 12 KNU Termamyl-a;  $t=85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $\text{pH}=6,0$ ;  $\tau=1\text{ h}$ . Uslovi alkoholne fermentacije:  $\text{pH}=5,0$ ;  $t=32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $v=100\text{ rpm}$ ; 1.35 % *Saccharomyces cerevisiae*. Drugi stepen enzimskog tretmana sa 36 AGU Supersan-a se odvijao uporedo sa fermentacijom.

U procesu kada su se uporedno odvijali fermentacija i drugi stepen enzimskog dejstva (Slika 6) je postignuta približno ista krajnja koncentracija alkohola kao i kada je fermentacija odvijana nakon dvostepenog enzimskog tretmana suspenzije kukuruznog brašna. Na osnovu toga se može zaključiti da proizveden etanol u toku fermentacije nije imao inhibitorno dejstvo na enzimsku hidrolizu. U literaturi je nedavno objavljeno da je dejstvo enzima koji hidrolizuju skrob čak stimulisano prisustvom etanola [31]. Apar i Ozbeck, 2005 [31] su zaključili da dodatak etanola u koncentracijama od 5-15 % povećava stepen hidrolize pomoću  $\alpha$ -amilaze. Ovaj stimulišući efekat je primećen u prisustvu skroba kao supstrata, dok je u njegovom odsustvu preostala enzimska aktivnost smanjena. Kao što se može videti sa Slike 6, koncentracija glukoze je bila konstantno na niskom nivou u toku fermentacije pošto su kvasci proizvedenu glukozu simultano trošili i konvertovali u alkohol. Na osnovu toka ove fermentacije (Slika 6) očigledno je da je proizvodnja fermentabilnih šećera iz skroba bila uskladjena sa njihovom potrošnjom od strane kvasca. Takodje se na osnovu konstantnog porasta koncentracije etanola u toku vremena može zaključiti da je bilo ostvareno zadovoljavajuće snabdevanje fermentacione podloge u fermentabilnim šećerima.

## Zaključak

U radu je ispitivana dvostepena enzimaska hidroliza kukuruznog brašna pomoću komercijalnih enzima kao i fermentacija nastalih hidrolizata pomoću *Saccharomyces cerevisiae* (BIB-TMF) u cilju proizvodnje bioetanola. Uslovi hidrolize kao što su koncentracija supstrata i enzima i vreme dejstva pojedinih enzima su optimizovani sa aspekta oba ova procesa

Utvrđeno je da je optimalna vrednost DE koju je potrebno postići u prvom stepenu enzimskog dejstva oko 16. Dalja saharifikacija u drugom stepenu je uspešno izvedena korišćenjem 36 AGU Supersan glukoamilaze na sto grama kukuruznog brašna pri početnoj koncentraciji supstrata od 17,5 % skroba (1:3 hidromodul). Pri ovim uslovima ostvaren je prinos etanola koji je iznosio više od 80 % od teorijskog prinosa..

Povećanjem koncentracije nokuluma *Saccharomyces cerevisiae* od 1 % do 2 % može se skratiti vreme potrebno za fermentaciju sa 48 na 32 časa, respektivno.

Fermentacija i hidroliza se mogu odvijati uporedo i u tom slučaju nije primećen nedostatak fermentabilnih šećera. Na ovaj način, moguće je skratiti celokupni proces i ostvariti uštedu u energiji za proizvodnju bioetanola.

## Napomena

Ovaj rad je finansiran od strane Ministarstva nauke i životne sredine Srbije:TD 7042B.

## Literatura

1. S. Kim, B.E. Dale. Allocation procedure in ethanol production system from corn grain I. System expansion, International Journal of Life Cycle Assessment, 7 (2002) 237–243.
2. S. Kim, B.E. Dale. Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions. Biomass and Bioenergy, **28** (2005) 475-489.
3. J.M.Henke, G. Klepper, N.Schmitz. Tax exemption for biofuels in Germany: Is bio-ethanol really an option for climate policy? Energy, **30** (2005) 2617-2635.

4. E.Burnes, D. Wichelns, J.W.Hagen. Economic and policy implications of public support for ethanol production in California's San Joaquin Valley. *Energy Policy*, **33** (2005) 1155-1167.
5. G.Berna. Integrated biomass system. Office for official publications of the EC, Luxembourg, 1998, p 27.
6. C.Berg. World fuel ethanol analysis and outlook. The online distillery network for distilleries & fuel ethanol plants worldwide, 2004 (available at: <http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html>).
7. J.Baras, S. Gaćeša , D. Pejin , Ethanol is a strategic raw material. *Chem.Ind.* **56** (2002) 89-105.
8. S. Kim, B.E. Dale. Global potential bioethanol production from wasted crops and crops residues. *Biomass and Bioenergy*, **26** (2004) 361-375.
9. H. Shigechi, Y. Fujita, J.Koh, M.Ueda, H. Fukuda, A. Kondo. Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. *Biochemical Engineering Journal*, **18** (2004)149-153.
10. M.S. Krishnan, F. Taylor, B.H.Davison, N.P. Nghiem. Economic analysis of fuel ethanol production from corn starch using fluidized-bed bioreactors. *Bioresource Technology*, **75** (2000) 99-105.
11. R. Berthiaume, C. Bouchard, M.A. Rosen. Exergetic evaluation of the renewability of a biofuel. *Energy, An International Journal*, **1** (2001) 256-268.
12. A. Rosenberger, H.P. Kaul, T. Senn, W. Aufhammer. Improving the energy balance of bioethanol production from winter cereals: the effect of crop production intensity. *Applied Energy*, **68** (2001) 51-67.
13. D. Pimentel. Ethanol fuels energy security, economics, and the environment. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, **4** (1991) 1–13.
14. H. Shapouri, J.A. Duffield, M. Wang. The energy balance of corn ethanol: an update. *Agricultural Economic Report 813*, US Department of Agriculture, Washington, DC, USA, 2002.
15. Z. Konsula, M. Liakopoulou-Kyriades. Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, **39** (2004)1745-1749.

16. D.K. Apar, B. Ozbeck.  $\alpha$ -amylase inactivation during corn starch hydrolysis process. *Process Biochemistry*, **39** (2004)1877-1892.
17. P. Choteborska, S. Palmarola-Adrados, M. Galbe, G. Zacchi, K. Melzoch, M. Rychtera. Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering*, **61** (2004) 561-565.
18. L. Slominska, M. Klisowska, A. Grzeskowiak. Degradation of starch granules by amylases. *Electronic Journal of polish Agricultural Universities. Food Science and Technology*, 6 (2003) available at: <http://www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue2/food/art-15.html>).
19. T.A. Quigley, C.T. Kelly, E.M. Doyle, W.M. Fogarty. Patterns of raw starch digestion by the glucoamylase of *Cladosporium gossypiicola* ATCC 38026. *Process Biochemistry*, **35** (1998) 677-681.
20. A. Tanriseven, Y.B. Uludag, S. Dogan. A novel method for the immobilization of glucoamylase to produce glucose from maltodextrin. *Enzyme and Microbial Technology*, **30** (2002) 406-409.
21. International Standard: ISO 10520, Determination of starch content -- Ewers polarimetric method. 1997.
22. Herlich K. (ed), *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. AOAC, Arlington, VA, 1990, p. 70-84.
23. G.L. Miller. Use of dinitrosalicylic acid for determining reducing sugars. *Anal Chem.* **31**(1959) 426-428.
24. Z. Bebić, J. Jakovljević, J. Baras. The corn starch hydrolyzate as a fermentation substrates for ethanol production. *Hem.Ind.* **54** (2000) 5-9.
25. V. Arasaratnam, K. Balasubramaniam. Synergistic action of alpha-amylase and glycoamylase on raw corn. *Starch/Starke*, **45** (1993) 231-233.
26. B.G. Dettori-Campus, F.G. Priest, J.R. Stark. Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26. *Process Biochemistry*, **27** (1992) 17-21.
27. A.Kimura, J.F. Robyt. Reaction of enzymes with starch granules: kinetics and products of the reaction with glucoamylase. *Carbohydr.Res.* **277** (1995) 87-107.
28. H.W. Leach, T.J. Schoch. Structure of starch granule II. Action of various amylases on granule starches. *Cereal. Chem.* **38** (1961) 34-46.

29. M. Karakatsanis, M.Liakopoulus-Kyriakidis. Comparative study of hydrolysis of various starches by alpha amylase and glucoamylase in PEG-dextran and PEG-substrate aqueous two phase systems. *Starch/Starke* **50** (1998) 194-199.
30. R. Thatipamala, A.G. Hill, S. Rohani. On-line estimate and adaptive optimization using state equations for continuous production of bioethanol. *Journal of Biotechnology*, **48** (1996) 179-190.
31. D.K. Apar, B. Özbek.  $\alpha$ - Amylase inactivation during rice starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, **40** (2005) 1367-1379.

## SUMMARY

### PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM CORN MEAL HYDROLYZATES

**Svetlana Nikolić, Marica Rakin, Maja Vukasinović, Slavica Šiler-  
Marinković, Ljiljana Mojović**

Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade

Bioethanol produced from renewable agricultural resources is currently the most promising biofuel. In a lot of developed countries in Europe and in USA the use of bioethanol as an alternative fuel or a gasoline supplement in the amount of up to 15 % is highly recommended or even required as an ecologically favorable fuel oxygenate. Concerning EU, in November 2001 a new directive was accepted, that requires of members states to establish legislation about utilisation of fuels from renewable resources. In 2005. this utilisation should cover 2% of the total fuel consumption. This quota is expected to increase to 5.75% in 2010. and furthermore. In our country, one of the most suitable agricultural raw material for bioethanol production is corn.

Two-steps enzymatic hydrolysis of corn meal by commercially available  $\alpha$ -amylase (Termamyl 120 L, Novozymes) and amyloglycosidase (Supersan 240L, Novozymes) and ethanol fermentation of the hydrolyzates by *Saccharomyces cerevisiae* yeast (culture collection BIB-TMF, Belgrade) was studied in this paper. The conditions of starch hydrolysis such as substrate and enzyme concentration and the duration of time required for enzymatic action were optimized taking into account both the effects of hydrolysis and ethanol fermentation.



The results obtained showed that the corn meal hydrolyzates were good substrates for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. The yield of ethanol of more than 80% of theoretical was achieved with a satisfactory volumetric productivity  $P$  (g /l ·h). No shortage of fermentable sugars was observed during simultaneous hydrolysis and fermentation. On this way, the savings in time and energy could be realized. By increasing the inoculum size from 1 % to 2 % of *Saccharomyces cerevisiae* the fermentation time could be reduced from 48 to 32 hours, respectively.

**Key words:** Enzyme hydrolysis; Starch, Corn, Ethanol fermentation