

ZORAN J. BEBIĆ¹
JOVAN B. JAKOVLJEVIĆ²
JOSIP BARAS³

¹IHS biotehnologija, Beograd

²Tehnološki fakultet, Novi Sad

³Tehnološko-metalurški fakultet,
Beograd

NAUČNI RAD

664.663.4:66.093.547.262.002.2

HIDROLIZATI KUKURUZNOG SKROBA KAO FERMENTACIONI SUPSTRATI ZA PROIZVODNJU ETANOLA

*Hidrolizati kukuruznog skroba korišćeni su kao izvor ugljenika u podlogama za alkoholnu fermentaciju sa *Saccharomyces cerevisiae* u šaržnom reaktoru sa kontinualnim mešanjem. Skrobni hidrolizati su dobijeni dvojno-enzimskom hidrolizom nativnog kukuruznog skroba (DE=92–94). Ispitivana je: početna specifična produktivnost v_0 (g_p/g_xh), početna brzina potrošnje substrata r_{s0} (g_s/g_xh), početna specifična brzina rasta μ_0 (h^{-1}) kao i prinos produkta, odnosno iskorišćenje: produkt/substrat, $Y_{p/s}$ (g_p/g_s). Dobijeni rezultati ukazuju da su skrobni hidrolizati, kao podloge za alkoholnu fermentaciju, dobar izvor ugljenika, u kojima nema inhibitorских substanci za rast kvasca ali nema dovoljno ostalih potrebnih sadržaja za rast kvasca.*

Alkoholna fermentacija se uobičajeno odvija fermentacionim mikroorganizmima na podlogama koje su smeša ugljenih hidrata kao što su: voćni ekstrakti (glukoza i fruktoza), melasa iz šećerne repe i trske (saharoza i drugi mono i disaharidi) i skrobni hidrolizati (glukoza, maltoza i maltotrioza) [1–3].

Skrobni materijali imaju sve značajniju ulogu u proizvodnji alkohola jer je proizvodnja pšenice, a naročito kukuruza, kao vodećih poljoprivrednih kultura, u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju u stalnom porastu [4]. Kod razmatranja pšenice i kukuruza kao sirovina za proizvodnju etil alkohola mora se imati u vidu njegova, relativno konstantna, svetska cena, nove integralne tehnologije u preradi žita, nove tehnologije u enzimskoj hidrolizi skroba, visoke nutritivne i tržišne vrednosti nusproizvoda, a samim tim i niža cena hidrolizata kao substrata za fermentaciju [5,6].

Hidrolizati kukuruznog skroba, iz novih integralnih tehnologija, kao supstrat u alkoholnoj fermentaciji nemaju, za razliku od melase šećerne repe, prateća, a samo fermentaciji nepotrebna, opterećujuća i često inhibirajuća jedinjenja [7].

Kukuruzni skrob u vidu nerafinisanog skrobnog mleka kao međufaza u procesu mokrog mlevenja može se, uz blage biokatalitičke uslove i skroman utrošak energije, dvojno enzimskom hidrolizom prevesti u koncentrovane rastvore mono i disaharida [8–13].

Ovako dobijeni hidrolizati kukuruznog skroba u ovim ispitivanjima su poslužili kao podloge za alkoholne fermentacije sa *Saccharomyces cerevisiae*. Ispitivanja su vršena sa različitim početnim koncentracijama hidrolizata sa i bez dodatka vode od močenja kukuruza (kukuruznog ekstrakta).

Cilj rada je bio definisanje parametara fermentacije skrobnog hidrolizata iz dvojno enzimске hidrolize skroba, kao novog substrata za alkoholnu fermentaciju u industrijskim uslovima.

MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

Mikroorganizam

Kultura *Saccharomyces cerevisiae*, rasa X, iz kolekcije Industrije alkohola "Panon" Crvenka, bila je održavana na kosoj agar-malt podlozi. Čista kultura umnožavana je aerobno na 30°C u erlenmajerima na rotirajućoj mućkalici sa 3s⁻¹, a nakon 48 časova, izdvojena je taloženjem. Čelije kvasca za inokulum su centrifugirane na laboratorijskoj centrifugi i resuspendovane u mediju do guste suspenzije.

Fermentacione podloge

Hidrolizati kukuruznog skroba dobijeni su dvojno-enzimskom hidrolizom skrobne suspenzije sa 40–41% suve materije i sadržajem ukupnih proteina u skrobu manjem od 0,50% računato na suhu materiju.

Utečnjavanje i dekstrinizacija nativnog kukuruznog skroba, sa termo-stabilnom α amilazom (Termamil 120 L Novo-Nordisk), vršeno je na kontinualnom mlaznom kupaču u industrijskim uslovima (pH 6,5; temperatura 105–110°C) do dekstroznog ekvivalenta (DE) hidrolizata od 15–18. Hidroliza skroba (oštećenje) do DE vrednosti od 92–94, nastavljena je, delovanjem smeše enzima *amiloglukozidaze/pululanaze* (AMG 150 L; *Pullulanase*; Novo Nordisk) (pH = 4,8; temperatura substrata 65°C) [14, 15]. Hemijski sastav pripremljenog skrobnog hidrolizata dat je u tabeli 1 (podloga a).

Hidrolizat dobijen direktnom dvojno enzimskom hidrolizom nerafinisanog skrobnog mleka siromašan je u ostalim nutrijentima te je obogaćen dodatkom uparenog

Adresa autora: Z. Bebić, IHS biotehnologija, Beograd-Zemun

Rad primljen: Juli 27, 1999.

Rad prihvaćen: Decembar 29, 1999.

Tabela 1. Sastav hidrolizata kukuruznog skroba
Table 1. Corn starch hydrolysate composition

Sastav	Sadržaj	
	a) Bez dodatka CSL	b) Sa dodatkom CSL
Suve materije, %	36,7	33,51
Ugljenih hidrata, %		
Glikoze, %	91,2	91,2
Maltoze, %	4	4
Trisaharida, %	1	1
Oligosaharida, %	2	2
Proteina (N x 6,25), %	0,5	1,24
Soli, %	0,14	2,06
Boja na 2 Be'	0,2	0,2

kukuruznog ekstrakta (CSL). Skrobni hidrolizat uz dodatak vode do močenja (podloga b) prikazana je, takođe, u tabeli 1. CSL kao nusproizvod mokre skrobarske prerade, sterilisana je na 100°C i nakon toga dodavana u substrat. U prethodnim istraživanjima utvrđene su količine: 6% suve materije vode do močenja na 100 g suve materije hidrolizata.

Radi ocene skrobnih hidrolizata kao podloga za alkoholnu fermentaciju pripremljena je sintetska podloga [16] koja je imala sledeći sastav:

glukoze	100	g/dm ³
KH ₂ PO ₄	6	g/dm ³
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	g/dm ³
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3	g/dm ³
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1	g/dm ³

pH sa citratnim puferom 5

Substrati koji su pripremljeni za fermentacije dobijeni su razređenjem skrobnog hidrolizata sa vodom do programirane koncentracije glukoze $C_{s0} = 85; 130; 190; 250$ itd. tako da je u svaki dm³ podloge dodata još i količina soli: 4 g KH₂PO₄, 2g (NH₄)₂SO₄ i 0,4 g MgSO₄ · 7 H₂O.

Eksperimentalna oprema i uslovi rada

Svi eksperimenti obavljani su na šaržnom fermentatoru radne zapremine od 10 litara tipa PEC Chemap, mešalicom (5s⁻¹), stalnim praćenjem i regulisanjem temperature, pH, i visine pene.

Sve fermentacije su obavljene sa inokulumom od 1,35 g/l *Saccharomyces cerevisiae*. Temperatura je odr-

žavana na 30 ± 0,5°C, pri pH = 5,0 ± 0,1 preko odgovarajućih kontrolnih modula.

Test standardne specifične alkoholne produktivnosti

Ćelije kvasca *Saccharomyces cerevisiae* nakon centrifugiranja prenose se u fermentor sa svežom podlogom za alkoholnu fermentaciju u određenoj koncentraciji $C_{x0} = 1,35$ g/l. Uzorak se uzima u vremenskim intervalima od: 1, 2, 4, 8 časova. Određivanje rastuće koncentracije alkohola uz istovremeno određivanje koncentracije ćelija kvasca daje elemente za izračunavanje početne specifične produktivnosti [17].

Merenje i analitičke metode

Koncentracija ćelija kvasca u supstratu je određivana filtriranjem poznate zapremine kroz filter od 0,450 µm. Nakon filtracije filter je sušen na 105°C do konstantne težine [18].

Sadržaj glukoze, maltoze i drugih ugljenih hidrata određivan je hromatografijom pod visokim pritiskom sa RI (indeks refleksije) detektorom osetljivosti 5 ppm u koloni Microbondapack NH₂, sa mobilnom fazom acetonitril-voda 70:30, i protokom od 1,2 cm³/min [19, 20].

Sirovi proteini su određivani standardnom metodom (Kjeldahl [18]), a boja je određivana standardnom spektrofotometrijskom metodom [20]. Sadržaj soli određivan je standardnim metodama spaljivanjem sa sumpornom kiselinom i žarenjem na temperaturi od 525°C [18].

Koncentracija etanola određivana je gasnom hromatografijom sa detektorom toplotne provodljivosti. Uzorak je ubrizgavan u kolonu Poropack QS (80/100) dužine 6 stopa na temperaturi od 110°C [21].

Fermentacije su rađene u serijama od po tri za istu koncentraciju, a rezultati su prikazani kao prosečne vrednosti.

REZULTATI I DISKUSIJA

U serijama šaržnih fermentacija ispitivane su dve podloge, sa rastućim početnim koncentracijama skrobnog hidrolizata a) razblaženjem hidrolizata (sastav u tabeli 1) dobile su se početne koncentracije substrata. $C_{s0} = 85, 130, 190, 250$ g/dm³, i b) skrobni hidrolizat u koji je dodata voda od močenja (sastav u tabeli 1), čija je početna koncentracija iznosila: $C_{s0} = 80, 120, 200, 250$ g/dm³.

U ispitivanjima je korištena i sintetička podloga koja je imala stalnu početnu koncentraciju $C_{s0} = 100$ g/dm³ i služila kao osnova u oceni vrednosti ispitivanih substrata u alkoholnoj fermentaciji.

U ispitivanjima više autora [10, 11, 16] konstatovano je da su substrati sa početnom koncentracijom preko

Tabela 2. Rezultati šaržne fermentacije skrobnog hidrolizata
Table 2. Results of Batch Fermentation of Starch Hydrolysate

	Početna koncentracija substrata, g/dm ³								
	Bez dodatka vode od močenja (a)				Sa dodatkom vodom od močenja (b)				G100
C _{so} , (g/dm ³)	85	130	190	250	80	120	200	250	100
v ₀ (g _p /g _x h)	0,9	0,7	0,6	0,5	1,2	1,1	0,9	0,5	1,1
r _{so} (g _s /g _x h)	2,1	1,8	1,4	1,1	2,3	2,2	1,9	1,3	2,3
μ ₀ (h ⁻¹)	0,20	0,18	0,12	0,05	0,23	0,22	0,20	0,05	0,23
Y _p /s	0,41	0,38	0,35	0,32	0,48	0,47	0,42	0,39	0,48

v₀ (g_p/g_xh): početna specifična produktivnost; r_{so} (g_s/g_xh): početna brzina potrošnje substrata; C_{so} (g_s/dm³): početna koncentracija substrata; μ₀ (h⁻¹): početna specifična brzina rasta; Y_p/s: iskorišćenje produkt/substrat.

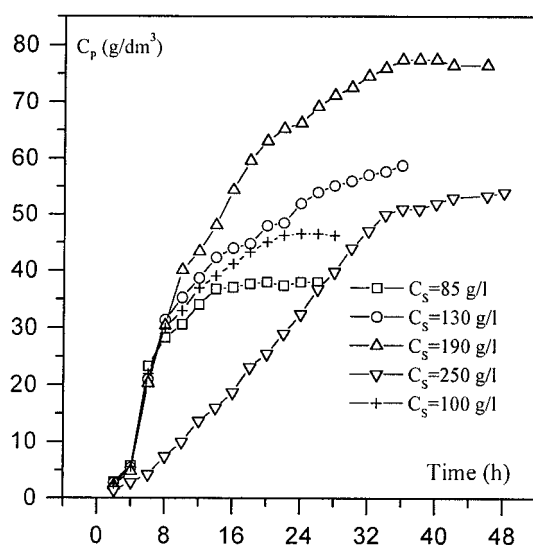
vrednosti C_{so} ≥ 150 g_s/dm³ imali izraženi inhibitorski efekt na fermentaciju. I u ispitivanjima sa skrobnim hidrolizatom, povećana koncentracija substrata pokazala se kao inhibitorna na tok alkoholne fermentacije. U svim koncentracijama substrata koje su bile veće od C_{so} ≥ 150 g_s/dm³, bile su niže vrednosti za: početne specifične produktivnosti v₀ (g_p/g_xh), početne brzine potrošnje substrata r_{so} (g_s/g_xh) i početne brzine rasta μ₀ (h⁻¹). Ispitivanje efekata inhibicije fermentacije substratom, u odsutnosti uticaja produkata fermentacije na istu, obavljeno je u prvih 2–8 časova, kada je uticaj produkata bio beznačajan.

U tabeli 2 prikazani su rezultati šaržnih fermentacija na skrobnom hidrolizatu kao substratu, sa početnom koncentracijom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (C_{x0} = 1,35 g_x/dm³).

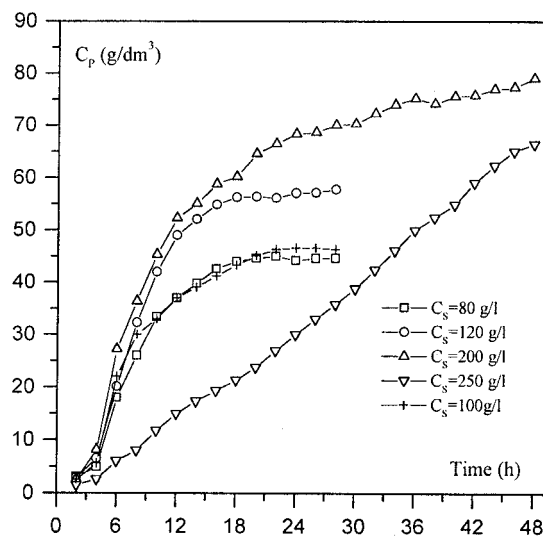
Na podlogama koje su čist skrobni hidrolizat (a), dobijene su niže vrednosti i u početnoj specifičnoj produktivnosti v₀ (g_p/g_xh), početnoj brzini potrošnje sub-

strata r_{so} (g_s/g_xh), početnoj specifičnoj brzini rasta μ₀ (h⁻¹), kao i u prinosu produkta, odnosno iskorišćenju produkt/substrat Y_p/s (g_p/g_s) u odnosu na podlogu (b) i sintetsku podlogu G100. U primeni istih uslova eksperimenta i istog radnog organizma dobijeni su skoro identični rezultati za sintetsku podlogu, G100 i za skrobni hidrolizat sa dodatkom CSL, za koncentracije C_{so} = 80 i 120 g/dm³.

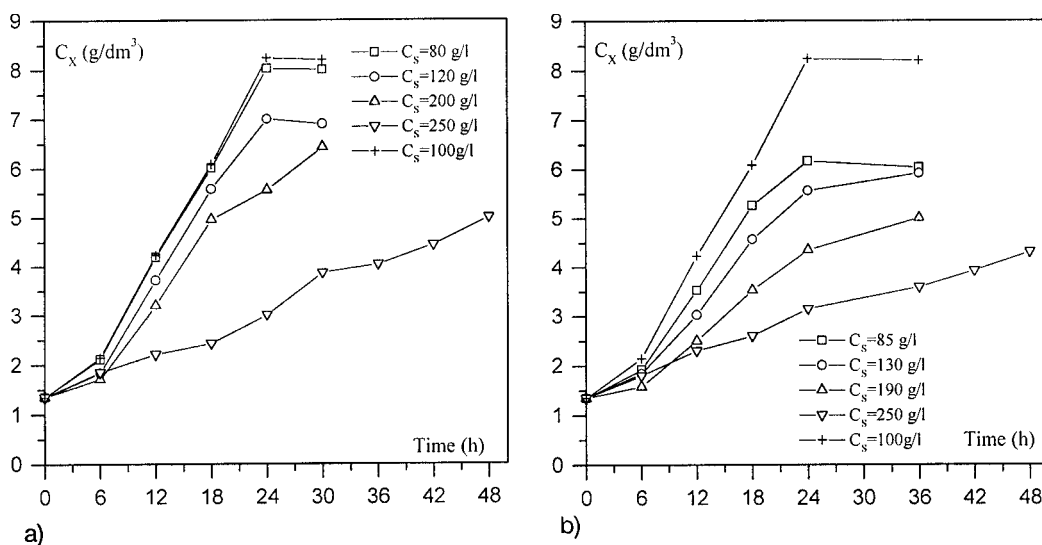
Rezultati šaržne fermentacije prikazani su na slikama 1 i 2. Poredeći krive prinosa etanola na različitim podlogama a, b i G100 može se zapaziti da u logaritamskoj početnoj fazi fermentacije u prvih 8 časova, nema značajnih razlika u uticaju sastava i koncentracije podloge, sem za ekstremno visoki sadržaj šećera u podlogama S_{co} = 250 g/dm³. Sve krive prinosa produkta u zavisnosti od koncentracije substrata imaju skoro isti eksponencijalni deo, a razlike se javljaju nakon toga, u zoni koja se približava stacionarnoj fazi prinosa etanola.



Slika 1. Koncentracija produkta šaržne fermentacije na skrobnom hidrolizatu
Figure 1. Product concentration of batch fermentation of corn starch hydrolysate



Slika 2. Koncentracija produkta šaržne fermentacije na skrobnom hidrolizatu sa dodatkom vode od močenja
Figure 2. Product concentration of batch fermentation of corn starch hydrolysate with corn step liquor



Slika 3. Rast *Saccharomyces cerevisiae* u šaržnoj fermentaciji na skrobnom hidrolizatu; a) sa vodom od močenja i b) bez vode od močenja

Figure 3. Grow of *Saccharomyces cerevisiae* in batch fermentation on starch hydrolysate; a) with CSL and b) without CSL

Po dobijenim rezultatima alkoholnih fermentacija za čist skrobni hidrolizat a (slika 1), može se zaključiti da je podloga za rad i aktivnost *S. cerevisiae* osiromašena i da tek dodatak CSL daje rezultate koji su identični sintetičkoj podlozi koja zadovoljava potrebe metabolizma kvasca.

Na slici 3 prikazani su prinosi biomase kvasca u funkciji vremena za korištene podloge tokom trajanja fermentacije.

Dobijeni rezultati ukazuju da je skrobni hidrolizat, bez dodatka CSL, osiromašena podloga za sadržaj biološki vrednih sastojaka – faktora rasta. Pod istim uslovima, eksperimenti sa istim radnim mikroorganizmom i istim početnim koncentracijama, na podlogama bez dodatka CSL prirast biomase bio je niži. Tako je maksimalni prinos biomase kvasca, sa početnim koncentracijama $C_{s0} = 80$ i 120 g/dm³ u koji je dodata voda od močenja iznosi 8,03, odnosno 7,0, da bi u hidrolizatu bez CSL bio za 25% odnosno 24% manji (6,16 odnosno 5,56% g/dm³).

Ocenjujući skrobni hidrolizat sa dodatkom CSL kao substrat za alkoholnu fermentaciju po najbitnijim parametrima (iskorišćenje podloge, maksimalna koncentracija etanola nakon fermentacije i vreme potrebno za postizanje maksimalnog prinosa etanola), može se konstatovati da je ovakav substrat pokazao dobre tehnološke osobine u procesu. Naime, ispitivani skrobni hidrolizat je imao veću produktivnost u odnosu na druge sirovine kao što su melasa, zbog faktora rasta iz vode od močenja, sa jedne strane i istovremenog odsustva visokomolekularnih jedinjenja prisutnih u melasi kao inhibitora fermentacije. Dobojeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora [22–24].

ZAKLJUČAK

Skrobni hidrolizat, sa dodatkom vodom od močenja (CSL), kao substrat za alkoholnu fermentaciju po osnovnim parametrima (iskorišćenje podloge, maksimalna koncentracija etanola nakon fermentacije i vreme potrebno za postizanje maksimalnog prinosa etanola) pokazuje dobre tehnološke osobine.

Na substratnim podlogama kao što je skrobni hidrolizat bez dodatka vode od močenja (CSL) dobijene su niže vrednosti i u specifičnoj produktivnosti v_0 (g_p/g_xh), početnoj brzini potrošnje substrata r_{s0} (g_s/g_xh), početnoj specifičnoj brzini rasta μ_0 (h⁻¹), kao i u prinosu produkta, odnosno iskorišćenju substrata, $Y_{p/s}$ (g_p/g_s), što ukazuje na nedostatak veoma važnih biogenih sadržaja u podlozi koju nosi voda od močenja kukuruza.

Simultano inhibitorno delovanje koncentracija substrata i produkta na prinos biomase tokom šaržne alkoholne fermentacije na skrobnim hidrolizatima kao substratu, isto je kao i kod substrata sa drugačijim ugljenohidratnim sastavom (saharoza, melasa).

LITERATURA

- [1] Parisi, F., Del Borghi, M., and Ferraiolo, G.: In "Alcohol, Industry and Research", O. Forsander, K. Eriksson, P. Jounela-Eriksson (Editor), Research Laboratories of the Finnish State Alcohol Monopoly (Alko) 1977, part 163, 245–246.
- [2] Harison, J.S.: Yeast as a Source of Biochemicals, *Process Biochem.* **3** (1968) 59–62.
- [3] Carmo-Sousa, L. Do. Distribution of Yeast in Nature. in "The Yeast", Vol. 1, A.H. Rose, and J.S. Harisson (Editor), Academic Press, London, 1969.
- [4] Jenkns, M.D.: Gasohol: Outlook for Production. *Cereal Foods World*, **26** (1981) 612.
- [5] Alard, G.: The Beginning of a New Era for Distilling. *Biotimes*, **9** (1994) No. 2, 6.

- [6] Child, S.N.: Corn Wet-milling in the USA versus Starch Production in Europe. *International Sugar Journal* **94** (1992), No. 1127, 268.
- [7] Bronn, W.: Moeglichkeiten der Substitution von Melasse durch andere Rohstoffe fuer die Backhefeherstellung, *Branntweinwirtschaft*, **125** (1985) 228.
- [8] Barfoed, C.H.: Enzymes in Starch Processing, *Cereal Foods World*, **21** (1976) 588.

SUMMARY

THE CORN STARCH HYDROLYSATE AS A FERMENTATION SUBSTRATES FOR ETHANOL PRODUCTION

(Scientific paper)

Zoran J. Bebić¹, Jovan B. Jakovljević², Josip Baras³

¹HIS biotehnologija, Beograd, ²Faculty of Technology, Novi Sad,

³Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrad, Beograd

Corn starch hydrolysate has been used as a carbon source in substrates for alcohol fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* in a batch stirred reactor. The starch hydrolysate was prepared by the double enzyme hydrolysis of native corn starch. The liquefaction and dextrinization of starch were carried out in a continuous process with heat stable alfa-amylase and saccharification with amyloglucosidase and pululanase under optimal conditions. The DE values were 92-94. The influence of the initial specific productivity v_0 (g_p/g_xh), initial substrate consumption rate r_{s0} (g_s/g_xh), initial specific growth rate μ_0 (h⁻¹), product yield and product/substrate ratio $Y_{p/s}$ (g_p/g_s), on the corn starch hydrolysate as the substrate, were studied.

The obtained results demonstrate that starch hydrolysate, used as a substrate for alcohol fermentation, is a good source of carbon. It contains neither substances which are growth factors for the yeast, nor any inhibiting substances.

Key words: Corn starch • starch hydrolysate • EtOH –fermentation • kinetics of fermentation.

Ključne reči: kukuruzni skrob • hidrolizat • etanol • fermentacija • kinetika fermentacije.

