

## BIOGORIVO IZ KUKURUZOVINE

*Ljiljanka Tomerlin*

Izvorni znanstveni članak  
Original scientific paper

### SAŽETAK

*U ovom je redu prikazana proizvodnja etilnog alkohola (biogoriva) iz kiselinskih hidrolizata kukuruzovine, odnosno kukuruzovine, djelovanjem kvasaca *Pichia stipitis* y-7124 i *Pachysolen tannophilus* y-2460 i *Candida shehatae* y-12856. Vlažna kukuruzovina (hibrid OSSK 619) sklona je raspadanju djelovanjem filosferne ili epifitne mikroflora. Da bi se zaštitila (konzervirala), poprskana je pojedinačno mikrobicidima: Busanom-90, Izosanom-G te formalinom i u obliku prizmatičnih bala držana je na otvorenom prostoru tijekom 6 mjeseci (listopad-ožujak). Na početku pokusa te nakon 6 mjeseci provedena je mikrobiološka kontrola. Jedna nepoprskana (kontrola) i tri bale kukuruzovine, koje su bile poprskane mikrobicidima nakon 6 mjeseci, pojedinačno su usitnjene i kuhane s razrijeđenom sumpornom kiselinom. Dobivena četiri kiselinska hidrolizata tih kukuruzovina su kompleksni supstrati, osim šećera (oko 11 g dm<sup>-3</sup> pentoze i oko 5,4 g dm<sup>-3</sup> heksoza), sadrže i teško razgradive sastojke kao lignin, karamelne šećere i uronske kiseline. Provjerom aktivnosti navedenih kvasaca, utvrđeno je da kvasac *Pichia stipitis* y-7124 pokazuje najbolju sposobnost proizvodnje etilnog alkohola iz kiselinskih hidrolizata kukuruzovina od 0,23 vol. % do 0,49 vol. %.*

**Ključne riječi:** kvasac, kiselinski hidrolizat kukuruzovine, etilni alkohol

### UVOD

Današnji se svijet sve više suočava s energetsom krizom. Kako svake godine nastaju velike količine poljodjelskih otpadaka, koji su zapravo izvor ugljikohidrata (Taherzadeh, 1999.; Riley, 2002.) te se u svijetu nastoje iskorištavati za proizvodnju biogoriva. Posljednjih godina porastao je interes da se iz kukuruzovine, ili slame, proizvede biogorivo (Domac, 1998.). Kukuruzovina je najvažniji, najobilniji i uz to obnovljivi poljodjelski proizvod (Gagro, 1997.; Gong, 1999.).

Vlažna kukuruzovina sklona je brzom raspadanju, čemu je uzrok prisutna filosferna<sup>1</sup> ili epifitna mikroflora<sup>2</sup> koja se nalazi na cijeloj njenoj površini, tj. na stabljici, listu i metlici (Dubovska, 1982.; Tomerlin, 1990.). Da bi se spriječio raspad kukuruzovine, moraju se koristiti kemijska sredstva (dezinficijensi) koja uništavaju mikrobe u različitim medijima ili na površinama. Dezinficijensi se međusobno razlikuju po kemijskom sastavu, načinu i učinku djelovanja, a ponekad i po načinu upotrebe (Gershenfeld, 1957.; Todar, 2000.). Gotovo da i nema novijih informacija o korištenju mikrobicida, poput Busana-90, Izosana-G i formalina u cilju konzerviranja kukuruzovine, odnosno u cilju sprečavanja njenog propadanja (Tomerlin, 1990.).

Osnovni kemijski sastav kukuruzovine je celuloza (50,3%), hemiceluloza (23,9%) lignin (18,6%), pektin (2,5%) i anorganska tvar (4,7%) (Gagro, 1997.; Aristidou, 2000.). Hemiceluloza (heksoze i pentoze) iz kukuruzovine relativno se lako hidrolizira razrijeđenom sumpornom kiselinom (Ghosh, 1993.; Aristidou; 2000.). Glavni produkt hidrolize je D-ksiloz, koje ima 80-90% od ukupno nastalih šećera u hidrolizatu, dok su ostali šećeri arabinoza, galaktoza i glukoza.

---

(1) Dr.sc. Ljiljanka Tomerlin, znan. savjetnik, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno tehnološki fakultet Kuhačeva 18, 31000 Osijek

---

<sup>1</sup> filosfera = okoliš vezan uz listove biljaka u kojem određene vrste mikroorganizama nalaze svoje stanište (prema grčkoj riječi phyllon=list)

<sup>2</sup> mikrobicid = naziv sastavljen od imenice "mikrob" i glagola "occidere", što znači ubiti

Dugo se smatralo da kvasci ne mogu razgraditi ksilozu kiselinskog hidrolizata kukuruzovine do etilnog alkohola (Bruinenberg, 1984.; Ligthelm, 1988.; Slininger, 1991.; Jeffries, 2000.). Međutim, istraživanja su pokazala da kvasci i plijesni razgrađuju D-ksilozu u D-ksilitol, koji oksidacijom prevode u D-ksilulozu. D-ksilulozu-5-P mnogi kvasci lako prevode u etilni alkohol. Bakterije prevode D-ksilozu izomerizacijom u D-ksilulozu-5-P. Iz literaturnih podataka uočava se da su najčešće istraživani kvasci *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* i *Candida shehatae* (Slininger, 1991.; Aristidou, 2000.; Govinden, 2001.).

Za dobar uzgoja kvasca ili bakterije u kiselinskom hidrolizatu kukuruzovine te proizvodnju etilnog alkohola potrebna je intenzivna aeracija, dobar izbor cjevica te optimalna temperatura, kao i pH-vrijednost (Ligthelm, 1988.).

Cilj je ovog rada bio iz kukuruzovine (hibrid OSSK 619), odnosno kiselinskog hidrolizata kukuruzovine, proizvesti etilni alkohol djelovanjem odabranog kvasca.

## MATERIJAL I METODE

### Kukuruzovina

Kukuruzovina (hibrid OSSK 619), uzgojena na seoskom gospodarstvu na području Tvrdavice Osijek, isječena je u pruće dugačko do 50 cm i složena u obliku prizmatičnih bala. Svaka bala pojedinačno je težila oko 30 kg, a stranice su iznosile 56x88x26 cm, odnosno zapremale su u prosjeku po 0,128 m<sup>3</sup>. Zbog zaštite od djelovanja native mikroflore vlažna je kukuruzovina prije oblikovanja bala pojedinačno poprskana mikrobicidima: Busanom-90 (2-bromo-4-hidroksiacetofenon, koncentracija 2 cm<sup>3</sup> dm<sup>-3</sup> destilirane vode, količina aktivnog sastojka 30%, pH-vrijednost 5), Izosanom-G (natrij-dikloro-izocijanurat, koncentracije 2 g dm<sup>-3</sup> destilirane vode, količina aktivnog sastojka 56%, pH-vrijednost 6) i formalinom (koncentracije 2 cm<sup>3</sup> dm<sup>-3</sup> destilirane vode, količina aktivnog sastojka 37%, pH-vrijednost 6,3). Jedna bala kukuruzovine korištena je kao kontrolna, odnosno nije bila poprskana mikrobicidom. Bale kukuruzovine držane su 6 mjeseci na otvorenom prostoru (od listopada do ožujka). Na početku i nakon pokusa provedena je mikrobiološka analiza (Tomerlin, 1991.).

### Kiselinski hidrolizat kukuruzovine

Uzorci kukuruzovina i to kukuruzovina koja nije poprskana mikrobicidom (K) te kukuruzovine poprskane mikrobicidima: Busanom-90 (K+M1), ili Izosanom-G (K+M2), ili formalinom (K+M3), pojedinačno su usitnjeni i podvrgnuti kiselinskoj hidrolizi (Ghosh, 1993.) sa 4,4 %-tnom sumpornom kiselinom u trajanju od 50 minuta, pri 100°C. pH-vrijednost kiselinskih hidrolizata podešena je pomoću čvrstog Ca(OH)<sub>2</sub> na pH 4,5. Sastav kiselinskog hidrolizata kukuruzovine prikazan je Tablicom 1.

**Tablica 1. Kemijski sastav kiselinskog hidrolizata kukuruzovine\***

Table 1. *The chemical components of acid hydrolysate of corn stover\**

Sastojci – <i>Components</i>	Masena koncentracija - <i>Mass concentration</i> γ /g dm <sup>-3</sup>
Organski sastojak - <i>Organic components</i>	21,00
Anorganski sastojak - <i>Inorganic components</i>	4,90
Suhi sastojak - <i>Dry components</i>	25,00
Reduktivni sastojak (RS) - <i>Reductive components (RC)</i>	17,90
KPK-vrijednost - <i>COD-value</i>	22,40
Hlapive kiseline - <i>Volatile acid</i>	1,70
Lignin - <i>Lygnine</i>	6,20
Fosfor - <i>Phosphorus</i>	0,04
Dušik - <i>Nitrogen</i>	0,54
pH-vrijednost - <i>pH-value**</i>	4,60

\* U kiselinski hidrolizat kukuruzovine dodane su sljedeće soli (g dm<sup>-3</sup>): 1,5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 0,2 Mg SO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - *In acid hydrolysate of corn stover are added the next salt (g dm<sup>-3</sup>): 1,5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1*

$(NH_4)_2SO_4$  i  $0,2 \text{ Mg } SO_4 \cdot 7H_2O$ ; \*\* pH-vrijednost je korigirana s  $2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$  i  $20 \text{ \%}$ -tnom  $H_2SO_4$  - *pH value was corrected with  $2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaOH}$  and  $20 \text{ \% } H_2SO_4$*

## Mikroorganizam

Za razgradnju ksiloze u kiselinskom hidrolizatu kukuruzovine korištena su tri soja kvasca: *Pichia stipitis* y-7124, *Pachysolen tannophilus* y-2460 i *Candida shehatae* y-12856, koji potječu iz Zbirke mikroorganizama Poljoprivrednog istraživačkog centra Peoria, Illinois, USA. Kvasci se čuvaju na kosom sladnom agaru pri  $+4^\circ\text{C}$ .

## Analitičke metode

Sve promjene u kiselinskom hidrolizatu kukuruzovine tijekom fermentacije određene su po APHA-standardu (APHA, 1992.).

Supstrati za uzgoj mikroorganizama, čvrsti i tekući, koji su u ovom radu korišteni, pripremljeni su po uputama za mikrobiološke metode (Collins, 1995.).

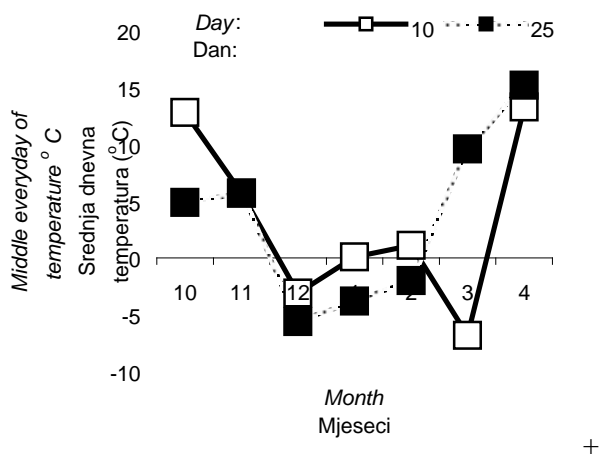
## Metode rada

S kosog sladnog agara kvasci su precijepljeni na sladni agar u Petrijevim zdjelicama, a zatim u sterilnu tekuću podlogu koja je sadržavala: glukozu (ili ksilozu)  $20 \text{ g dm}^{-3}$ ; Bacto pepton  $10 \text{ g dm}^{-3}$ ; kvaščev ekstrakt  $5 \text{ g dm}^{-3}$  i agar  $25 \text{ g dm}^{-3}$ . Vrijednost pH prilagođena je oko 4,5. Umnožena biomasa kvasca korištena je kao početno cjepivo, a sposobnost odabranih kvasaca da razgrađuju reduktivne sastojke kiselinskog hidrolizata kukuruzovine u etilni alkohol provedena je u Erlenmeyerovoj tikvici od  $0,5 \text{ dm}^{-3}$  i volumena kiselinskog hidrolizata  $0,2 \text{ dm}^{-3}$  i pH-vrijednost 4,5. Pojedinačne početne količine biomase kvasaca, kao cjepiva, iznosile su  $4,0 \text{ g dm}^{-3}$ , odnosno  $1,5 \text{ g dm}^{-3}$ . Uzorci su treseni na rotacijskoj tresilici ( $180\text{-}200$  okretaja  $\text{min}^{-1}$ ), pri temperaturi do  $30^\circ\text{C}$ .

## Rezultati i rasprava

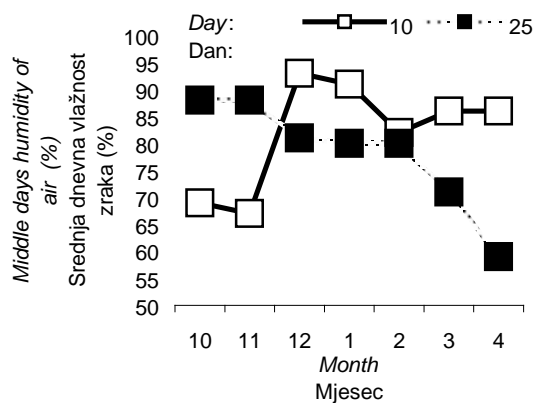
Sastav filofsferne mikroflore netom pobrane kukuruzovine (hibrid OSSK 619) podudara se s rezultatima sličnih istraživanja domaćih i stranih autora (Dubovska, 1982.; Tomerlin, 1990.). Uočeno je da se količina vode u sve četiri bale kukuruzovine, držane na otvorenom prostoru od mjeseca listopada do ožujka, od početnih 31% smanjila do 11% i pri tome je utjecaj imala promjena u temperaturi (Slika 1.), vlažnosti zraka (Slika 2.) i vjetar.

Mikrobiološkom kontrolom uočeno je smanjenje broja različitih vrsta mezofilnih fakultativnih mikroorganizama (bakterije, kvasci, plijesni), kojih je na početku bilo 36, i to samo na kukuruzovini koja je bila poprskana kemijskim mikrobicidima. Preživjelo je svega pet vrsta i to: 3 bakterije (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. i *Lactobacillus* sp), 1 kvasac (*Trichosporon* sp) i 1 plijesan (*Mucor* sp.) (Tomerlin, 1990.). U uzorku kukuruzovine koja je korištena kao kontrola određen je isti broj morfološki različitih vrsta bakterija (17), kvasaca (7) i plijesni (12), kao što je određeno na početku pokusa (Tomerlin<sup>1</sup>, 1991.).



**Slika 1. Srednja dnevna temperatura mjerena 10. i 25. dana u mjesecu tijekom čuvanja bala kukuruzovine na otvorenom prostoru od listopada do ožujka**

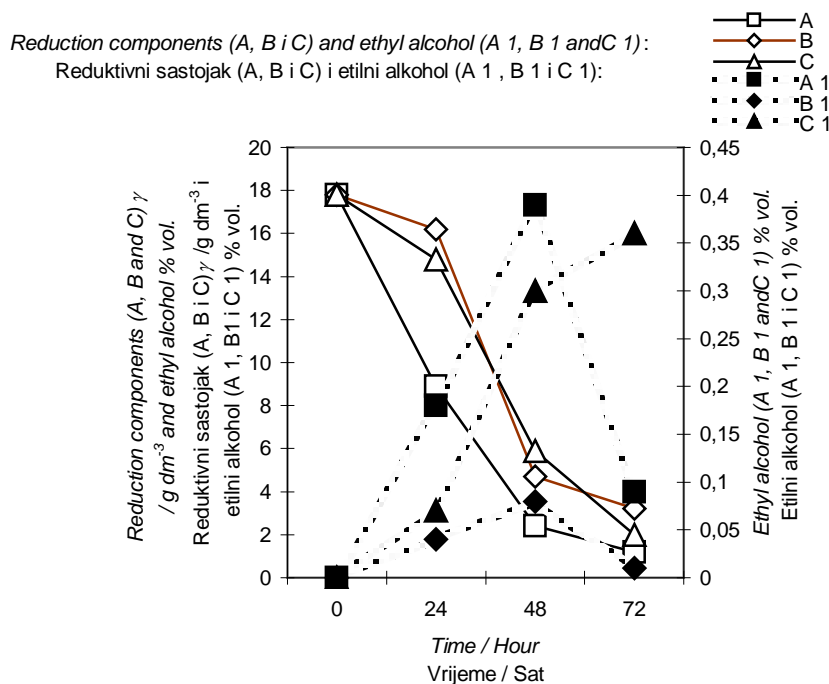
Figure 1. The average daily temperature measured on 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> day of month during keeping bals corn stover on opened space from October to March



**Slika 2. Srednja dnevna vlažnost zraka mjerena 10. i 25. dana u mjesecu tijekom čuvanja bala kukuruzovine na otvorenom prostoru od listopada do ožujka**

Figure 2. The average daily air moisture measured on 10<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> day in month during keeping bals corn stover on opened space from October to March

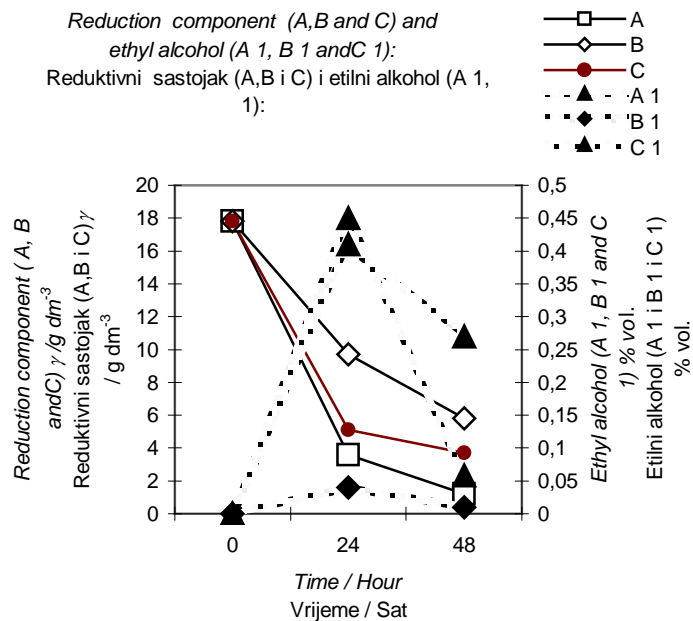
Za proizvodnju etilnog alkohola iz kiselinskog hidrolizata kukuruzovine ispitana su tri soja kvasca: *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* i *Candida shehatae*. Kao što rezultati pokazuju (Slike 3. i 4.), fermentacijska sposobnost triju kvasaca razlikuje se ne samo po količini, već i po vremenu proizvedenog etilnog alkohola



**Slika 3. Usporedba razgradnje reduktivnog sastojka (A, B i C) kiselinskog hidrolizata kukuruzovine (kontrola 1) i proizvodnja etilnog alkohola (A 1, B 2 i C 3) djelovanjem 4 g biomase kvasca *Pichia stipitis* (A 1) ili *Pachysolen tannophilus* (B 2) ili *Candida shehatae* (C 3) pri početnoj pH-vrijednosti 4,5 tijekom 72 sata**

Figure 3. The comparison of degradation reductive components (A, B and C) acid hydrolysate corn stover (control) and production ethyl alcohol (A 1, B 2 and C 3) by 4 g biomass yeasts *Pichia stipitis* (A 1) or *Pachysolen tannophilus* (B 2) or *Candida shehatae* (C 3) at initial pH value 4,5 during 72 hours

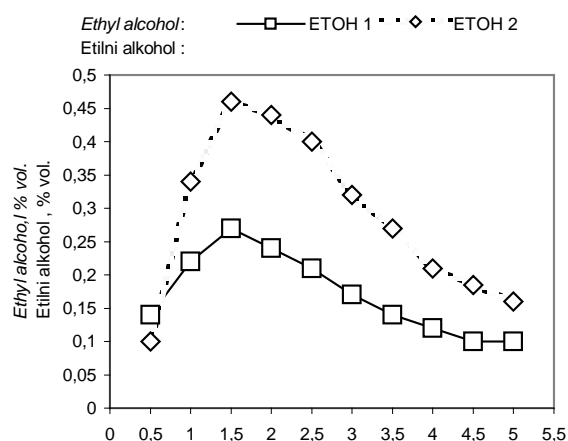
Kvasci *Pichia stipitis* i *Candida shehatae* proizvedu tijekom prvih 48 sati 0,39 vol. %, odnosno 0,30 vol. % etilnog alkohola, dok ga kvasac *Pachysolen tannophilus* istovremeno proizvede svega 0,08 vol. %. Nakon 72 sata od postavljanja pokusa najveću količinu etilnog alkohola proizveo je kvasac *Candida shehatae*, tj. 0,36 vol. %, dok kod kvasaca *Pichia stipitis* i *Pachysolen tannophilus* to iznosi 0,09 vol. % i 0,01 vol. %. Količina cjepiva u ovom pokusu (Slika 4.) iznosila je oko 4 g dm<sup>-3</sup> (cjepivo je potjecalo iz prethodnog pokusa), pretpostavljeno, a proizvedene količine etilnog alkohola mogu biti najveće. Da bismo provjerili dobivene rezultate (Slika 3.) u sljedećem pokusu (Slika 4.), količina cjepiva bila je smanjena na 1,5 g dm<sup>-3</sup>. Vrijeme razgradnje reduktivnog sastojka smanjilo se na 48 sati. Uočeno je da pri toj količini cjepiva ta tri kvasca nakon 24 sata ne nastavljaju proizvoditi etilni alkohol, unatoč tome što je još preostalo reduktivnog sastojka u kiselinskom hidrolizatu kukuruzovine (Slika 4.). Mjerenjem je uočeno smanjenje koncentracije etilnog alkohola. Prema literaturnim podacima, uzrok sprečavanja nastanka etilnog alkohola može biti u nakupljanju nekog produkta metabolizma tih kvasaca, kao ksilitola, odnosno inhibiciju mogu stvarati aromatski spojevi u području molekulskih masa 1500, 100-200 (Glancer, 1989.). Također se dalje navodi da uzrok tome može biti pomanjkanje nekih faktora rasta, izbor cjepiva, pH-vrijednost, volumen supstrata, ili temperatura pri kojoj se provodi fermentacija (Gong, 1983.).



**Slika 4. Usporedba razgradnje reduktivnog sastojka (A, B i C) kiselinskog hidrolizata kukuruzovine (kontrola 2) i proizvodnja etilnog alkohola (A 1, B 1 i C 1) djelovanjem 1,5 g biomase kvasca *Pichia stipitis* (A 1) ili *Pachysolen tannophilus* (B 2) ili *Candida shehatae* (C 3) pri početnoj pH-vrijednosti 4,5 tijekom 48 sati**

Figure 4. The comparison of reductive components degradation (A, B and C) of acid hydrolysate corn stover (control) and production of ethyl alcohol (A 1, B 1 and C 1) by 1,5 g of biomass *Pichia stipitis* (A 1) or *Pachysolen tannophilus* (B 2) or *Candida shehatae* (C 3) yeasts at initial pH value 4,5 during 48 hours

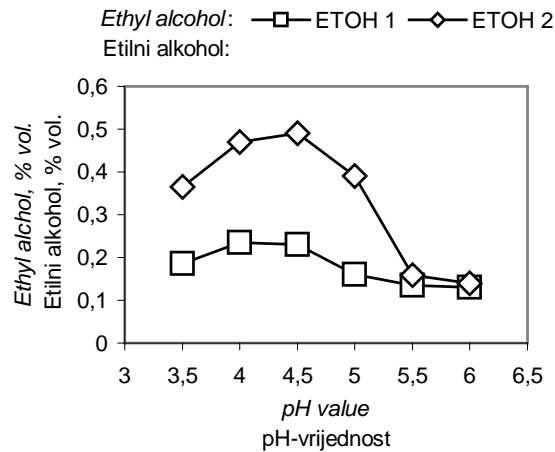
Najbolju proizvodnju etilnog alkohola iz kiselinskog hidrolizata pokazali su kvasci *Pichia stipitis* i *Candida shehatae*. Iako su sva tri kvasca pokazala dobru sposobnost proizvodnje etilnog alkohola, kvasac *Pichia stipitis* postigao je najbolje iskorištenje reduktivnog sastojka kiselog hidrolizata kukuruzovine. Sljedeći korak u tim ispitivanjima bio je ispitati utjecaj početne količine cjepiva kvasca *Pichia stipitis* (Slika 5.), početne pH-vrijednosti (Slika 6.) i volumena kiselinskog hidrolizata na proizvodnju etilnog alkohola (Slika 7.). Cjepivo za te pokuse uzeto je na početku logaritamske faze, tijekom logaritamske faze i stacionarne faze rasta kvasca (Slike 5. –7.).



**Slika 5. Usporedba proizvodnje etilnog alkohola (ETOH 1 i ETOH 2) tijekom 24 sata iz kiselinskog hidrolizata kukuruzovine (kontrolna) djelovanjem 1,5 g biomase kvasca *Pichia stipitis*, uzete iz različitih faza uzgoja**

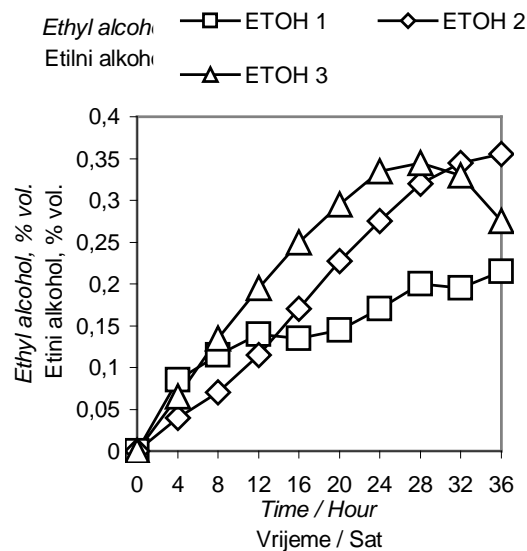
Figure 5. The comparison of ethyl alcohol production (ETOH 1 and ETOH 2) during 24 hours in corn stover acid hydrolysate (control) by 1,5 g of *Pichia stipitis* yeasts biomass taken from different growth stages

ETOH 1 je etilni alkohol proizveden djelovanjem biomase kvasca, koja je uzeta iz završne faze prethodnog pokusa, a ETOH 2 je etilni alkohol proizveden djelovanjem biomase kvasca, uzete u logaritamskoj fazi rasta.



**Slika 6. Usporedba proizvodnje etilnog alkohola (ETOH 1 i ETOH 2) tijekom 24 sata pri različitim početnim pH-vrijednostima iz kiselinskog hidrolizata kukuruzovine (kontrolne) djelovanjem 1,5 g dm<sup>-3</sup> biomase kvasca *Pichia stipitis*, uzete iz različitih faza uzgoja**

Figure 6. The comparison of ethyl alcohol production (ETOH 1 and ETOH 2) during 24 hours at different initial pH value from corn stover acid hydrolysate (control) by 1,5 g dm<sup>-3</sup> of *Pichia stipitis* yeasts biomass taken from different growth stages



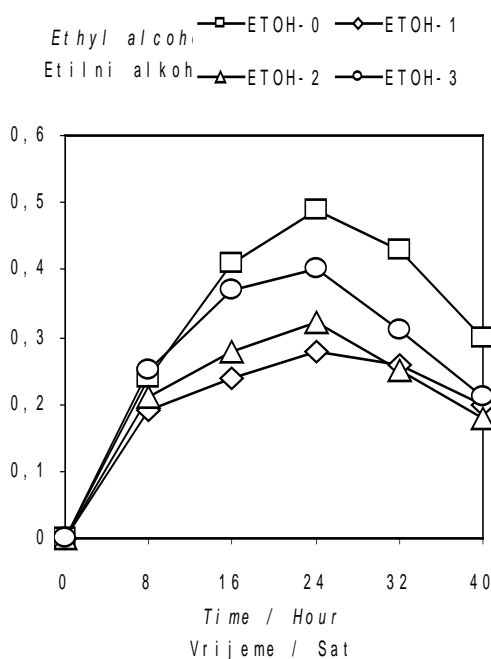
**Slika 7. Usporedba proizvodnje etilnog alkohola (ETOH 1, ETOH 2 i ETOH 3) tijekom 36 sati u volumenu 0,22 dm<sup>-3</sup> kiselinskog hidrolizata kukuruzovine (kontrolne) pri početnoj pH-vrijednosti 4,5 djelovanjem 1,5 g dm<sup>-3</sup> biomase\* kvasca *Pichia stipitis*, uzete iz različitih faza uzgoja**

Figure 7. The comparison of ethyl alcohol production (ETOH 1, ETOH 2 and ETOH 3) during 36 hours in volume of 0,22 dm<sup>-3</sup> of corn stover acid hydrolysate (control) at initial pH value of 4,5 by 1,5 g dm<sup>-3</sup> of *Pichia stipitis* yeasts biomass taken from different growth stages

ETOH-3 je etilni alkohol proizveden djelovanjem biomase kvasca, uzete iz stacionarne faze rasta.

Uočeno je da biomasa kvasca *Pichia stipitis* uzeta na početku logaritamske faze rasta proizvede veću količinu etilnog alkohola (ETOH 1) od onog uzetog tijekom logaritamske faze rasta (ETOH 2), ili iz stacionarne faze rasta (ETOH 3) (Slika 7.). Biomasa kvasca *Pichia stipitis*, uzeta iz logaritamske faze rasta pri početnoj pH-vrijednosti 4,5, i volumen hidrolizata od 0,22 dm<sup>3</sup>, proizvedu do 0,35 vol. % etilnog alkohola, na što upućuju i drugi istraživači (Slininger, 1991.; Jeffries, 1994.). Optimalni parametri za razgradnju su početna pH-vrijednost 4,5, volumen kiselinskog hidrolizata 0,22 dm<sup>3</sup> i izbor cjepiva.

Istim postupkom ispitana je sposobnost kvasca *Pichia stipitis* da proizvodi etilni alkohol iz kiselinskih hidrolizata kukuruzovina poprskanih mikrobicidima (Slika 8.). Količine proizvedenog etilnog alkohola iz tih supstrata (K+M1; K+M2 i K+M3), nakon 40 sati djelovanjem 1,5 g dm<sup>-3</sup> biomase kvasca *Pichia stipitis*, različite su. Adaptirani kvasac *Pichia stipitis* iz kiselinskih hidrolizata (K+M1, K+M2 i K+M3) tijekom prvih 24 sata proizvede različite količine etilnog alkohola od 0,28 do 0,40 vol. %, međutim, kao i u prethodnim pokusima, (Slika 3. i 4.), taj kvasac nakon 24 sata koristi proizvedeni etilni alkohol kao jednostavniji izvor ugljika.



**Slika 8. Usporedba proizvodnje etilnog alkohola (ETOH 0, ETOH 1, ETOH 2 i ETOH 3)\* iz kiselinskog hidrolizata kukuruzovine (kontrola) i kiselinskih hidrolizata kukuruzovina koje su poprskane mikrobicidima, a djelovanjem 1,5 g dm<sup>-3</sup> biomase kvasca *Pichia stipitis* pri početnoj pH-vrijednosti 4,5 i volumenu kiselinskog hidrolizata od 0,2 dm<sup>3</sup> tijekom 40 sati.**

Fig 8. The comparison of ethyl alcohol production (ETOH-0, ETOH-1, ETOH-2 and ETOH-3) from corn stover acid hydrolysate (control) and corn stover acid hydrolysate which are spattered with microbicides by 1,5 g dm<sup>-3</sup> of *Pichia stipitis* yeasts biomass at initial pH-value of 4.5 and acid hydrolysate volume of 0,2 dm<sup>3</sup> during at 40 hours

ETOH-0 je etilni alkohol proizveden iz kiselinskog hidrolizata kukuruzovine koja nije poprskana mikrobicidom (kontrola).

U literaturi se navodi da kvasac *Pichia stipitis* nakon 24 sata naglo počinje trošiti etilni alkohol kao jedini izvor ugljika te da nakon 72 sata potroši svu raspoloživu količinu (Malleszka i Schneider, 1982.). Kao moguće inhibitore tih procesa navode se lignin, uronske kiseline i karamelni šećeri (Jeffries, 1985.; Gong, 1999.). Ti spojevi, dodani pojedinačno u kiselinske hidrolizate kukuruzovine u količini od 0,05 dm<sup>3</sup>/0,2 dm<sup>3</sup>, nisu ometali metaboličke aktivnosti kvasca *Pichia stipitis* u proizvodnji



etilnog alkohola. Međutim, nema literaturnih informacija o ponašanju tog kvasca kada su korišteni mikrobicidi Busan-90, Izosan-G ili formalin.

## ZAKLJUČAK

Mikrobicidi Busan-90, Izosan-G i formalin štite vlažnu kukuruzovinu od propadanja tijekom šestomjesečnog stajanja u obliku prizmatičnih bala na otvorenom prostoru. Kiselinski hidrolizati kukuruzovina dobiveni iz njih prikladni su supstrati za proizvodnju etilnog alkohola s dobro prilagođenim kvascem *Pichia stipitis* y-7214. Postignuti rezultati ukazuju na mogućnost iskorištavanja kukuruzovine kao sekundarne sirovine, vrijednog obnovljivog lignoceluloznog materijala u proizvodnji etilnog alkohola, odnosno biogoriva.

## LITERATURA

1. Aristidou, A., Penttila, M., (2000): Current Opinion in Biotechnology. 11: 187-198.
2. Bruinenberg, Peter M., de Bot, Peter, H.M., van Dijken, Johanse, P., Scheffers, Alexander, W. (1984): NADH-linked aldolase reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose yeasts. Appl. Microbiol Biotechnol., 19:256-260.
3. Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M. (1995): Microbiological Methods. 7. izdanje, Butterworth-Heinemann Ltd.
4. Domac, J. (1998): Biofuels production possibilities in the Republic of Croatia. Nafta, 5 159-166.
5. Dubovska, A., Barnet, J. Horska, E. (1982): The phyllospheric microflora of maize. Microbiology X , 31-38.
6. Gagro, M. (1997.): Ratarstvo obiteljskog gospodarstva (žitarice i zrnate mahunarke). Hrvatsko Agronomsko društvo Zagreb.
7. Ghosh, P., Singh (1993): Physicochemical and Biological Treatment for Enzymatic/Microbial Conversion of Lignocellulosic Biomass, Advances in Applied Microbiology, 39:295-333.
8. Gong, C.S., Cao, N.J., Du, J.N., Tsao, G.T. (1999): Ethanol Production from Renewable Resource. Advance Biochem. Eng./Biotechnol. 65 207-241.
9. Gershenfeld, L., Iodine. In Reddish, G.F. (1957): Antiseptic, Desinfectants, Fungicides and Chemical and Physical Sterilization, Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA, 223-277.
10. Jelavić, V., Domac, J. (1999.): Biomasa-izvor energije za obuzdavanje emisije stakleničkih plinova. Energija, 1:35.-39.
11. Govinden, R., Pillay, B., van Zyl, W.H., Pillay, D. (2001): Xylitol production by recombinat *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* XYL1 genus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55:76-80.
12. Jeffries, T.W. (2000): Ethanol and Thermotolerance in the Bioconversion of Xylose bay Yeasts. Advances in Applied Microbiology 47: 222-268.
13. Ligthelm, M.E., Prior, B.A., du Preez, J.C. (1988): The oxygen requirements of yeasts for fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. Appl. Microbiol Biotechnol, 63-68.
14. Riley, C. (2002): AIChE Spring Conference.
15. Slininger, P.J., Branstrater, L.E., Bothast, R.J., Okos, M.R, Ladisch, M.R. (1991): Growth, Death and Oxygen Uptake Kinetics of *Pichia stipitis* of Xylose. Biotechnol. Bioeng. 37: 973-980.
16. Taherzadah, M.J. (1999): Ethanol from lignocellulose: Physiological Effects of Inhibitors and Fermentation Strategies. Department of Chemical Reaction Engineering, Göteborg, Sweden, 1-56.
17. Tomerlin, Lj., Glanser, M., Landeka, T. (1990.): Doprinis istraživanju fungalnih populacija kukuruzovine, Mikrobiologija, 27(2):129.-138.
18. Tomerlin, Lj. (1991): The investigation of the utilization of cornstover conserved by means of diferent microbicides as a secondary raw material of the biological production of ethanol. II. Jugoslovensko savjetovanje Zaštita životne sredine u procesnoj industriji, 39-47.
19. Todar, K. (2000): The control of Microbial growth. University of Wisconsin-Medison.
20. Glancer, M., Ban, S.N. (1989): Biodegradation of lignin from the Acid Hydrolysate of Cornstover by Selected Mixed Culture of Yeasts, Process Biochemistry,109-113.
21. *APHA-standardi*, American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Waste and Waste Water, APHA (1992).

## BIOFUEL FROM CORN STOVER

### SUMMARY

*This paper deals with production of ethyl alcohol (biofuel) from corn stover acid hydrolysate by yeasts, respectively at *Pichia stipitis* y-7124 and *Pachysolen tannophilus* y-2460 and *Candida shehatae* y-12856. Since moist corn stover (Hybrids 619) is proving to decomposition by phyllospheric microflora. It was (conserved) spattered individually by microbicides: Busan-90, Izosan-G and formalin. In form of prismatic bales, it was left in the open air during 6 months (October - March). At the beginning and after 6 months the microbiological control was carried out. The only one unspattered (control) and three stover corn bales being individually spattered by microbicides were fragmented and cooked with sulfur acid. The obtained four acid hydrolysates are complex substratums, containing, apart from the sugars (about  $11 \text{ g dm}^{-3}$  pentosa and about  $5.4 \text{ g dm}^{-3}$  hexose), decomposite components as lignin, caramel sugars and uronic acids. By controlling the activity of the mentioned yeasts it was confirmed that yeasts *Pichia stipitis* y-7124 obtained best capability of ethyl alcohol production from corn stover acid hydrolysate at 0.23 vol. % to 0.49 vol. %.*

*Key-words: yeasts, acid hydrolysate of corn stover, ethyl alcohol*

Zahvala

Izradba ovoga rada potpomognuta je sredstvima odobrenim od Ministarstva znanosti i tehnologije, SVIBOR - projekt pod brojem 4-07-108.

(Primljeno 7. veljače 2003.; prihvaćeno 2. rujna 2003 - Received on 7 February 2003; accepted on 2 September 2003)