



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00370

(22) Data de depozit: 16/05/2014

(41) Data publicării cererii:  
27/11/2015 BOPI nr. 11/2015

(71) Solicitant:  
• FUNDATIA SAPIENȚIA - UNIVERSITATEA  
SAPIENȚIA, STR.MATEI CORVIN NR.4,  
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-  
FARMACEUTICĂ - ICCF BUCUREȘTI,  
CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• ABRAHAM BEATA,  
STR. MIHAI EMINESCU NR. 1, SC.A, AP.22,  
MIERCUREA CIUC, HR, RO;

• MOSCOVICI MIȘU, STR. JEAN STERIADI  
NR.7, BL.I 22, SC.B, ET.2, AP.16,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• IONESCU CORINA, STR.LEREȘTI NR.1,  
BL.A 2, SC.4, ET.2, AP.54, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• SZABOLCS LANYI ȘTEFAN, STR. MIKO  
NR.21, MIERCUREA CIUC, HR, RO;  
• TROFOSILA CĂTĂLINA FLORENTINA,  
ALEEA LUNGULETU NR. 6, BL. D14, SC. 3,  
ET. 10, AP. 129, SECTOR 2, BUCUREȘTI,  
B, RO;  
• MARINESCU MIHAELA CLAUDIA,  
DRUMUL TABEREI NR.15, BL.A 1, SC.2,  
ET.6, AP.72, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) PROCEDEU DE OBTINERE A BIOETANOLULUI DIN  
DEȘEURI VEGETALE AMIDONOASE CU CONSORȚII  
MICROBIENE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a bioetanolului din deșeuri vegetale amidonoase. Procedeu conform invenției constă în hidroliza amidonului din deșeuri amidonoase, până la unități de glucoză, cu un complex enzimatic care conține  $\alpha$ -amilază, glucoamil-

ază și pullulanază, biosintetizat de mutanți recombinanți ai speciei *Pichia pastoris*.

Revendicări: 4



## Procedeu de obținere a bioetanolului din deșeuri vegetale amidonoase cu consoții microbiene

Prezenta invenție se referă la un procedeu biotehologic de obținere a bioetanolului din deșeuri vegetale amidonoase în care hidroliza amidonului este realizată într-o singură fază cu un complex enzimatic produs de un consoțiu de microorganisme.

Există o cerere crescândă pe plan mondial pentru suplimentarea combustibilului clasic (benzina) cu alți contributori energetici, care dacă nu vor înlocui total benzina, cel puțin o vor reduce prin suplimentare.

În unele țări bioetanolul a devenit un aditiv în unele produse pe baza de benzină (1). Deasemenea, utilizarea bioetanolului reduce emisiile de dioxid de carbon cu efect de seră.

Deșeurile vegetale amidonoase, între care cojile de cartof ce se pot acumula în cantități uriașe, pot constitui o bază de materie primă importantă în producerea de bioetanol. Etanolul obținut din tratarea deșeurilor de cartof are o structură cu ramificații și sunt necesare mai multe enzime pentru desfacerea lui în unitați de glucoză. Acestea sunt:  $\alpha$ -amilază, glucoamilază, pullulanază. Altă sursă de deșeuri amidonoase accesibile o constituie deșeurile de la procesarea porumbului și vorbim aici de mălai grosier, uruială, spărturi de boabe de porumb. Amidonul obținut din procesarea deșeurilor de porumb are o structură liniară, fiind necesare doar  $\alpha$  amilază și glucoamilază pentru hidroliza la unitați de glucoză. Se adaugă drojdia alcooligenă, iar procesul coninuă în condiții anaerobe până la consumul total al sursei de carbon (sub 1% zahăr reducător) (2).

Cererea crescândă de etanol are în vedere și alte scopuri industriale ca industria solvenților, agenți de curățare și conservare, suplimentând astfel sinteza chimică a substraturilor petrochimice.

Astfel, scăderea resurselor de petrol duce la necesitatea găsirii unor alte resurse de energie regenerabile prin utilizarea produselor reziduale din agricultură, industria alimentară, sau biodiesel.(3).

Se comunică (4) procesarea cartofilor și a subproduselor acestora prin lichefiere și zaharificare folosind trei produse comerciale enzimaticice, procese urmate de fermentarea cu drojdie alcooligenă.

Prezenta invenție valorifică cunoașterea amănunțită a caracteristicilor microorganismului *Pichia pastoris* (Guilliermond) Phaff (1956) care fermentează glucoza și asimilează etanol și glicerol (5), fiind în special puternic metilotrofă.



Acest microorganism a devenit de un considerabil interes pentru biotehnologie datorită capacității sistemului său genetic de a produce o gamă largă de proteine cu importanță medicală și industrială. Deasemenea, *Pichia pastoris* poate fi în mod stabil o gazdă pentru gene heterologe.

Procedeul conform invenției folosește trei tulpini de *Pichia pastoris*, mutații recombinanți obținuți de către Catedra de Științe Tehnice și Științe ale Naturii – Universitatea Sapiientia Miercurea Ciuc. Acestea sunt purtatoare de gene heterologe astfel:

- pentru  $\alpha$ -amilază YPD + zeacin cu indicativul pPICZ  $\alpha$ -amyl;
- pentru glucoamilază YPD + zeacin cu indicativul pPICZA  $\alpha$ -glu;
- pentru pullulanază *Pichia pastoris* III cu indicativul pPICZ  $\alpha$ + GA;

Aceste tulpini de *Pichia pastoris* vor realiza biosinteza de  $\alpha$ -amilază, glucoamilază și pullulanază raspunzătoare de etapele de dextrinizare și zaharificare din procesul producerii de etanol din deșeuri amidonoase.

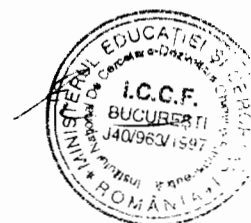
Procedeul conform invenției utilizează un consorțiu de trei microorganisme recombinante ale speciei *Pichia pastoris* ce produc un complex de enzime ( $\alpha$ -amilază, glucoamilază, pullulanază) prin cultivare pe un mediu de inocul conținând: glicerină, extract de porumb,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , yeast extract,  $\text{MgSO}_4$  și un mediu de biosinteză conținând: cartofi, mălai+uruială,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl, acid citric,  $\text{MgSO}_4$ , oligoelemente, MeOH. Complexul enzimatic obținut este adăugat mediului de fermentație, realizând hidroliza amidonului, după care are loc fermentația anaerobă producătoare de etanol cu un consorțiu de trei microorganisme din genul *Saccharomyces*.

Ca microorganisme alcooligene se utilizează 3 tulpini de *Saccharomyces cerevisiae*: ICCF 310, ICCF 312, ICCF 386, provenite din colecția de microorganisme de interes industrial a ICCF.

Procedeul conform invenției aduce ca noutate în procesul de valorificare a deșeurilor amidonoase următoarele avantaje:

- nu se folosesc enzime comerciale, ci un complex de enzime produs într-un singur bioproces;
- întregul proces tehnologic se bazează pe consorții microbiene, atât în etapa de obținere a enzimelor necesare accesibilizării substratului de bioconversie, precum și în etapa principală de sinteza a etanolului;

În detaliu, procedeul conform invenției conține următoarele etape:



*Pichia pastoris* I (pentru  $\alpha$ -amilază), *Pichia pastoris* II (pentru glucoamilază) și *Pichia pastoris* III (pentru pullulanază) sunt întreținute în condiții de laborator (+4 °C) pe un mediu nutritiv agarizat ce conține %(g/v): yeast extract 1 ; bactopectonă 2; glucoză 2; agar-agar 2; pH 6,5. Aceste culturi reprezintă cultura stoc dar și preinoculul pentru inițierea unui proces fermentativ sau orice altă acțiune de selecție sau conservare.

Faza de inocul este faza de cultură lichidă în care microorganismele se înmulțesc rapid și pot fi preluate pentru faza următoare de bioproces. Mediul de inocul lichid a fost conceput pe baza caracterelor de specie descrise mai sus și anume: o sursă rapid asimilabilă de carbon o constituie glicerolul. Astfel, acest mediu conține %(g/v): glicerol 2; extract de porumb 1,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5; yeast extract 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05, pH 6,3-6,5, 100 ml mediu/flacon Erlenmayer de 750 ml. Incubare 20 h la 28 °C cu agitare rotativă continuă.

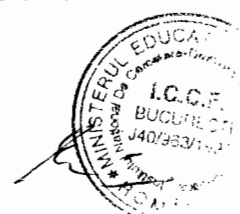
Din această cultură se inoculează mediul de bioproces 7% (v/v) în faza următoare pentru sinteza de enzime. Mediul de bioproces a fost conceput să fie asimilabil și să inducă biosinteza de enzime ( $\alpha$ -amilază, glucoamilază și pullulanază) prin acțiunea genelor heterologe pe care le poartă acești mutați recombinanți. Acest mediu conține %(g/v): cartof 7; mălai 1 + spărtură de porumb 1; extract de porumb 5,5; acid citric 0,1; NaCl 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05;  $\text{CaCl}_2$  0,02 + săruri minerale:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,001 ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,001 ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,0005 ; metanol 0,4 la 0 h și la 24 ore.

Inoculele lichide reunite de *Pichia* I, II și III în fază optimă de dezvoltare (agitare rotativă 20 h la 28°C) este trecut în mediul de bioproces descris mai sus și se stabilesc parametri de agitare, aerație, astfel încât nivelul oxigenului dizolvat în mediu să nu scadă sub 20 %. Procesul durează 72 ore iar mediul final de fermentație conține complexul enzimatic nou biosintetizat  $\alpha$ -amilază și glucoamilază și pullulanază.

Mediul final de biosinteză conține o concentrație de  $\alpha$ -amilază, glucoamilază respectiv pullulanază exprimată în unități/ml (U/ml) de activitate enzimatică (AE) proteină (P) exprimată în mg/ml și activitate specifică (AS) în U/mg proteină.

Determinarea activității enzimactice se realizează folosind ca substrat amidonul.

Mediul final este prelucrat prin filtrare pe celită și concentrare prin ultrafiltrare pe membrane cu limita de separare 10 kDa și 5 kDa. Volumul concentrat este păstrat prin congelare.



Faza alcooligenă urmează etapele următoare: deșeurile amidonoase sunt prelucrate mecanic (mărunțite) și fierte aproximativ 10 minute. Se adaugă cantitatea necesară de complex enzimatic astfel:

- pentru deșeurile de cartofi se utilizează un complex enzimatic alcătuit din α-amilază, glucoamilază, pullulanază;
- pentru deșeurile din prelucrarea porumbului (uruială + spărtură de boabe) se utilizează un complex enzimatic ce cuprinde α-amilază și glucoamilază.

Parametrii de lucru sunt astfel:

- 0-4 ore agitare continuă la 30°C, pH 6;
- 4-8 ore agitare continuă la 40°C, pH 5;
- 8-24 ore agitare continuă la 50°C, pH 5.

Se adaugă săruri minerale %(g/v):

- sulfat de amoniu 0,07;
- sulfat monopotasnic 0,07;
- sulfat de magneziu 0,035.

Se corectează pH-ul la 4,5 – 5; sterilizare 30 minute la 110 ° C;

Se realizează incubarea cu un consorțiu de *Saccharomyces cerevisiae* și *Saccharomyces carlsbergensis* obținut pe un mediu lichid de inocul ce conține %(g/v): glucoză 4 și peptonă 1, pH 6,7. Dezvoltarea se face cu incubare la 30°C, cu agitare coninuă 18-20 ore. De menționat că se cultivă separat fiecare tulpină de *Saccharomices*, iar inocularea în faza următoare se face cu un inocul reunit în procent total de 7 %(v/v). Utilizarea celor trei tulpini de *Saccharomyces* are rolul de potențare microbiană a consumului de zahăr reducător.

Procesul fermentativ este total anaerob având următorii parametrii:

- 0-2 ore agitare continuă pentru stimularea populației de drojdii la trecerea de la inocul la procesul de biosinteză;
- 2-30 ore agitare intermitentă, câte 5 minute la 4 ore.

Temperaturile de lucru sunt: 28°C pentru deșeuri amidonoase rezultate din prelucrarea porumbului și 30°C pentru deșeuri amidonoase din cartofi.

Se dozează periodic consumul de zahăr reducător (comparativ cu valoarea inițială) și dozarea de etanol produs pe seama biotransformării zahărului reducător rezultat din procesarea deșeurilor de cartof.

Se dau următoarele exemple:



Exemplul 1

Procedeeul conform invenției cultivă *Pichia I* și *Pichia II* mutanți recombinanți pe un mediu de întreținere nutritivă agarizat ce conține %(g/v): yeast extract 1; peptonă 2; glucoză 2; agar-agar 2; pH 6,5, sterilizare la 110 ° C, 30 minute. Incubare statică la 30°C, timp de 48 ore. Are loc dezvoltarea în plajă.

Se incubează mediile lichide nutritive cu suspensii din culturile de mai sus în raport de 10 %. Mediul de inocul lichid conține %(g/v): glicerină 2; extract de porumb 1,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5; yeast extract 0,5; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,05. Incubare 18-20 h cu agitare coninuă la 28-30 ° C.

Se dezvoltă o cultură lichidă de *Pichia I* și respectiv *Pichia II* cu următoarele determinări finale: glicerină 0,3 mg/100 ml; biomasă ca densitate optică (DO) la 570 nm (1:50) 27; pH 5,87.

Aceste culturi lichide *Pichia I* și *Pichia II* se inoculează în raport de 7 %(v/v) în mediul specific pentru biosinteza de  $\alpha$  amilază și glucoamilază (% g/v):

Cartof procesat prin maruntire și fierbere 7,5

Faină de mălai 2,5

Extract de porumb 6

Acid citric 0,1

NaCl 0,5

CaCl<sub>2</sub> 0,02

Oligolemente :

FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O – 0,001

ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O – 0,001

CuSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O – 0,005

Metanol 1,2 %(v/v) (se adaugă inițial, 24, 48 ore câte 0,4 %(v/v) deoarece este consumat în totalitate în perioada respectivă).

Parametrii de lucru sunt: 100 ml mediu/flacon de 750 ml; agitare permanentă 250 rpm; temperatură 28-30°C; durata 72 ore.

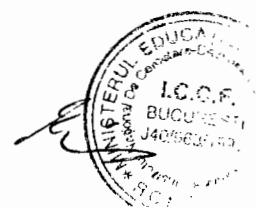
Mediul final de biosinteză a  $\alpha$ -amilazei și glucoamilazei are următoarele caracteristici:

- AE  $\alpha$ -amilază 2,09 U/ml

-AE glucoamilază 0,71 U/ml

- pH 6,98

- DO 24,3



Complexul enzimatic obținut în urma biosintezei este izolat și concentrat prin filtrare și ultrafiltrare. Mediile de biosinteză din 50 de flacoane sunt reunite rezultând un volum de 5 l ce este filtrat pe un strat adjuvant de celită, filtratul obținut (4,4 l) fiind concentrat prin ultrafiltrare pe un modul Millipore (cu membrană de celuloză PLCGC- Pellicon având limita de excludere de 10 kDa și o suprafață de filtrare de 0.5 m<sup>2</sup>)

Se obțin două faze: concentrat I (0,5 l) și filtrat (3,9 l). Activitățile enzimatică în concentrat I, sunt:  $\alpha$ -amilază 3,8 U/ml, glucoamilază 1,6 U/ml. Deoarece o parte din enzimă a trecut și în filtrat, acesta se concentrează prin ultrafiltrare pe membrană PESU (polyethersulfone), având limita de excludere de 5 kDa și o suprafață de filtrare de 0.5 m<sup>2</sup> (Biomax Membrane). Se obține un concentrat enzimatic II (0,4 l) cu următoarele activităților enzimatică:  $\alpha$ -amilază 3,9 U/ml și glucoamilază 1,8 U/ml. Cele două concentrate I și II se reunesc (complex enzimatic I) și se utilizează în etapa următoare de hidroliză a deșeurilor amidonoase din porumb (uruială și spărtură de boabe) pentru obținerea de bioetanol.

### Exemplul 2

Se procedează conform exemplului 1, cultivând cele trei microorganisme producătoare de enzime: *Pichia I* (mutant pentru producerea de  $\alpha$ -amilază), *Pichia II* (mutant pentru producerea de glucoamilază) și *Pichia III* (mutant pentru producerea de pullulanază)

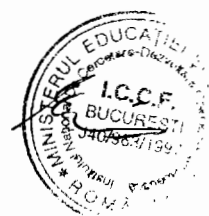
Mediul final de biosinteză are următoarele caracteristici:

AE  $\alpha$ -amilază 2.19 U/ml

AE glucoamilază 0,81 U/ml

AE pullulanază 0.35 U/ml

Complexul enzimatic obținut în urma biosintezei (6 l) este izolat și concentrat prin filtrare și ultrafiltrare conform exemplului 1. În urma concentrării activitățile enzimatică finale sunt: pentru concentrat I (0.94 l):  $\alpha$ -amilază 3.7 U/ml, glucoamilază 1.7 U/ml, pullulanază 2.7 U/ml, iar pentru concentrat II (0.36 l) sunt  $\alpha$ -amilază 3.9 U/ml, glucoamilază 1.9 U/ml, pullulanază 2.91. Cele două concentrate I și II se reunesc (complex enzimatic II) și se utilizează în etapa următoare de hidroliză a deșeurilor amidonoase din cartofi (coji de cartofi) pentru obținerea de bioetanol.



### Exemplul 3

Procedeele conform invenției utilizează deșeuri vegetale amidonoase din mălai (spărturi de boabe și uruială).

*Pichia* I și *Pichia* II sunt cultivate conform exemplului 1. Fazele de lucru sunt următoarele:

- 25g deșeuri amidonoase din mălai (spărtură și uruială) + 35 ml apă se fierb aproximativ 3-5 minute.

- Se adaugă un complex enzimatic I (65 ml) alcătuit din  $\alpha$ -amilază și glucoamilază. Procesul de hidroliză enzimatică a amidonului are loc în primele 4 ore la 30°C, pH 6, pentru acțiunea  $\alpha$ -amilazei iar între 4-24 ore la 50°C, pH 5, pentru a permite glucoamilazei să continue hidroliza amidonului pentru microorganismele alcooligene prin biotransformarea acestuia în zahăr reducător, ca substrat pentru microorganismele alcooligene.

Pentru realizarea fazei alcooligene alături de sursele de carbon se adaugă săruri minerale astfel (% g/v):

- sulfat de amoniu 0,07;
- sulfat monopotasic 0,07;
- sulfat de magneziu 0,035.

Se corectează pH-ul la 4.5-4.7, se sterilizează 30 minute la 110°C.

Pentru faza alcooligenă se inoculează mediul preparat mai sus cu un consorțiu de microorganisme *Saccharomyces cerevisiae* 1, *Saccharomyces cerevisiae* 2, *Saccharomyces carlsbergensis* în raport de 7% (v/v).

Acestea sunt cultivate separat în faza de preinocul și inocul, iar inocularea în faza următoare se face cu un inocul reunit în procent total de 7%(v/v). Procedeele fermentative durează 48 ore și se realizează cu următorii parametri:

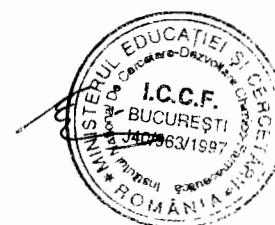
0-2 ore aerajie (agitare continuă a flaconului) 28°C;

2-24 ore fara agitare, anaerobioza, 28°C.

Indicatorii biochimici sunt următorii:

-Concentrație inițială de glucoză 9%(g/v). Randamentul bioconversiei amidonului la glucoză este de 62%.

-Bioetanol produs (dozare prin gaz-cromatografie) 4.76%. Randamentul fermentației alcoolice este de 52,88%.





#### Exemplul 4

Procedeul conform invenției utilizează deșeurile amidonoase din deșeuri agroalimentare (coji de cartofi).

*Pichia* I, *Pichia* II și *Pichia* III sunt cultivate conform exemplului 2. Fazele de lucru sunt următoarele:

3 kg deșeuri amidonoase din cartofi (coji de cartofi) + 1090 ml apă se fierb aproximativ 3-5 minute.

Se adaugă un complex enzimatic (1700 ml) alcătuit din  $\alpha$ -amilază + glucoamilază + pullulanază. Procesul de hidroliză enzimatică a amidonului are loc în primele 4 ore la 30°C, pH 6, pentru a acționa  $\alpha$ -amilaza, între 4-8 ore la 40°C, pH 5, pentru acțiunea pullulanazei, iar între 8-24 ore la 50°C, pH 5, pentru ca glucoamilaza să continue hidroliza amidonului prin bioconversia acestuia în zahăr reducător.

În continuare, se adaugă sărurile minerale și se procedează conform exemplului 3.

Indicatorii biochimici sunt următorii:

-Concentrație glucoză inițial 6,7%(g/v). Randamentul bioconversiei amidonului la glucoză este de 51,53%.

-Bioetanol produs (dozare prin gaz-cromatografie) 3,31 %(g/v). Randamentul fermentației alcoolice este de 49,40%.



### Revendicări

1. Procedeu conform invenției constând în aceea că enzimele necesare hidrolizei amidonului din deșeuri amidonoase până la unități de glucoză se obțin sub formă de complex enzimatic ( $\alpha$ -amilază, glucoamilază și pullulanază), într-un singur bioproces cu un consorțiu de microorganisme mutanți recombinanți ai speciei *Pichia pastoris*.
2. Procedeu conform revendicării 1 prin care, *Pichia I*, *Pichia II* și *Pichia III* sunt cultivate separat pe un mediu de inocul ce conține % (g/v): glicerină 2; extract de porumb 1,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5; yeast extract 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05.
3. Procedeu conform revendicărilor 1 și 2 prin care *Pichia I* și *Pichia II* sau *Pichia I*, *Pichia II* și *Pichia III* dezvoltate în faza de inocul sunt trecute în faza de biosinteză enzimatică ce conține % (g/v): cartof procesat prin marunțire și fierbere 7,5; făină de mălai 2,5; extract de porumb 6; acid citric 0,1;  $\text{NaCl}$  0,5;  $\text{CaCl}_2$  0,02; oligoelemente  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 1mg/100ml;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 1mg/100ml;  $\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,5mg/100ml, MeOH 4 (% v/v).
4. Procedeu conform revendicării 1, 2 și 3 prin care se obține bioetanol din:
  - deșeuri amidonoase din porumb (spărtură și uruială) cu un complex enzimatic ce conține  $\alpha$ -amilază și glucoamilază, rezultat în urma biosintezei cu *Pichia I* și *Pichia II* mutanți recombinanți;
  - deșeuri amidonoase din cartofi (coji de cartofi) cu un complex enzimatic ce conține  $\alpha$ -amilază, glucoamilază și pullulanază biosintetizat de mutanți recombinanți *Pichia I*, *Pichia II* și *Pichia III*.

