



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00674

(22) Data de depozit: 27/10/2020

(41) Data publicării cererii:
29/04/2022 BOPI nr. 4/2022

(71) Solicitant:
• INCDO-INOE 2000 INSTITUTUL DE
CERCETĂRI PENTRU INSTRUMENTAȚIE
ANALITICĂ ICIA CLUJ-NAPOCA,
STR.DONATH NR.67, CP 717, OP 5,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• SENILA LACRIMIOARA,
STR.GRIGORE ALEXANDRESCU NR. 38,
AP.27, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• VARATICEANU CERASEL,
STR. AVRAM IANCU NR. 10, TURDA, CJ,
RO;
• KOVACS ENIKO MARIA, NR.211,
COMUNA BACIU, CJ, RO;
• SCURTU DANIELA ALEXANDRA,
STR.OASULUI NR.89-90 BL.L2, SC.1,
AP.14, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ROMAN CECILIA, STR.PIAȚA ABATOR,
BL.B, AP.5, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

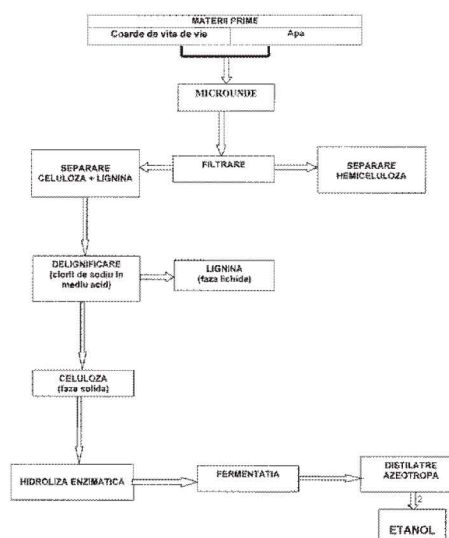
(54)

PROCEDEU DE OBTINERE BIOETANOL PRIN FERMENTAȚIA CARBOHIDRAȚILOR DIN COARDE DE VIȚĂ DE VIE PRIN METODA SHF DE SEPARARE A PROCESULUI DE HIDROLIZA DE PROCESUL DE FERMENTAȚIE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a bioetanolului prin fermentația carbohidraților din coarde de viță de vie prin metoda SHF de separare a procesului de hidroliză de procesul de fermentație. Procedeu conform invenției constă în prelucrarea unei cantități de 20 g coarde de viță de vie prin uscare și măcinare care se supun pretratamentului cu microunde în prezența apei la o temperatură cuprinsă între 150...180°C, pentru un timp de reacție cuprins între 5...10 minute, după care urmează delignificarea cu clorid de sodiu în acid acetic 10%, la o temperatură cuprinsă între 60...80°C cu un timp de reacție cuprins între 1...2 ore, urmată de hidroliza enzimatică în soluție de citrat de sodiu 0,05 M, după care se adaugă 10 FPU/g biomasă enzime *Trichoderma reesei* ATCC 26924 și 20U/g biomasă enzime β - glucozidaze la o temperatură cuprinsă între 37...55°C, cu timpul de hidroliză cuprins între 24...72 ore, urmată de fermentația cu drojdia de bere *S. cerevisiae* în mediu de inocul și nutrienți la o temperatură cuprinsă între 30...40°C, cu timpul de fermentație cuprins între 24...72 ore, urmată de distilare și anhidricare, rezultând o cantitate de 0,8...1,5 g bioetanol.

Revendicări: 1
Figuri: 1



Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



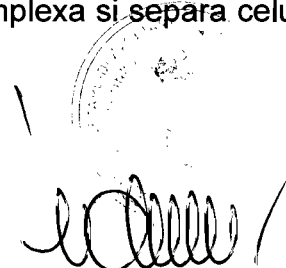
PROCEDEU DE OBTINERE BIOETANOL PRIN FERMENTATIA CARBOHIDRATILOR DIN COARDE DE VITA DE VIE PRIN METODA SHF DE SEPARARE A PROCESULUI DE HIDROLIZA DE PROCESUL DE FERMENTATIE

Inventia se refera la un procedeu de obtinere bioetanol prin fermentatia carbohidratilor din coarde de vita de vie prin metoda SHF de separare a procesului de hidroliza de procesul de fermentatie.

Principala sursa de biomasa rezultata in plantatiile viticole este alcatuita din coarde (in proportie de 90%) si lemn multianual (portiuni din trunchiul butucului sau brate). Coardele de vita de vie sunt reziduuri lignocelulozice care contin celuloza, lignina si hemiceluloze. In prezent, coardele de vita de vie sunt incorporate in sol sau sunt arse, ceea ce duce la cresterea emisiilor de gaze cu efect de sera. O solutie pentru protectia mediului este realizarea de noi metode de valorificare a acestor tipuri de deseuri cu producerea de compusi chimici valorosi, cum este bioetanolul [1].

Componentii majoritari ai coardelor de vita de vie pot fi transformati in bioetanol. Pentru conversia celulozei si hemicelulozelor din structura coardelor de vita de vie sunt necesare procese termochimice sau biochimice de separare a polimerilor (celuloza si hemiceluloza) si transformarea lor cu ajutorul organismelor fermentative la bioetanol (care poate fi utilizat ca biocarburant, inlocuitor al benzinei sau ca materie prima in industria chimica pentru obtinerea de compusi chimici valorosi) [2].

Procesul de productie a bioetanolului din biomasa celulozica se compune din mai multe etape: (1) pretratamentul biomasei pentru separarea componentelor sale de celuloza, hemiceluloze si lignina; (2) hidroliza celulozei in carbohidrati si (3) fermentatia - procesul biologic de transformare a carbohidratilor in etanol. Pretratamentul este etapa cea mai importanta din intreaga tehnologie de productie bioetanol. Majoritatea pretratamentelor folosite utilizeaza acizi anorganici, acizi organici, alcalii, solventi organici, etc. Dintre neajunsurile pretratamentului cu substante chimice se pot mentiona: metode neprietenoase mediului si consumul mare de reactivi chimici. Pentru eliminarea acestor neajunsuri se cauta elaborarea unor metode ecologice care pot separa componentele celulozice fara folosirea de substante chimice. Pretratamentul cu microunde este un proces fizico-chimic care presupune expunerea biomasei la radiatiile cu microunde pentru un timp de 5-20 minute. Pretratamentul cu microunde distruge structura complexa si separa celuloza de hemiceluloze si lignina [3, 4].



Hidroliza consta in scindare polizaharurilor in monozaharuri. Exista doua tipuri de procese de hidroliza: hidroliza chimica si hidroliza enzimatica. Majoritatea studiilor evidentiaza faptul ca hidroliza enzimatica este net superioara hidrolizei acide si este influentata de: temperatura de hidroliza, reactivitatea enzimei, compozitia mediului de hidroliza, tipul de pretratament folosit si raportul de biomasa/enzima. Fermentatia carbohidratilor poate avea loc prin trei tipuri diferite de procese: separarea procesului de hidroliza de procesul de fermentatie (SHF), hidroliza si fermentarea simultana si conversia microbiana directa care combina zaharificare simultana cu co-fermentarea (SSCF). Factorii care influenteaza fermentatia sunt: pH-ul, temperatura, compozitia mediului de fermentatie, concentratia initiala de carbohidrati si timpul de fermentatie. Temperatura prea ridicata este un stres pentru microorganisme, pH-ul trebuie sa fie aiba valori intre 4-5 iar timpul de fermentatie afecteaza cresterea microorganismelor [5].

In strainatate exista metode de obtinere bioetanolului, prezentate in brevetele EP2006354A9, CN11079150A, KR101605068B1,

Brevetul **EP2006354A9** descrie o metoda de producere biocombustibil lichid din biomasa celulozica prin urmatoarele etape: (1) pretratamentul biomasei cu microunde in prezenta unui catalizator de amoniac la frecventa de 300 MHz, intensitatea microundelor in domeniul de 0,1 -10 W pentru un timp de 1 -60 min; (2) hidroliza enzimatica a fractiei solide recuperare dupa pretratament la un amestec de monozaharide; (3) fermentatia monozaharidelor la bioetanol. Brevetul **CN11079150A** descrie o metoda rapida de pretratament al biomasei cu microunde in mediu alcalin pentru producerea de etanol. Conform inventiei, materiile prime sunt macinate la granulatia de 2-20 mm, amestecate cu solutie alcalina de soda caustica de concentratia 20-25% si supuse pretratamentului cu microunde la puterea radiatiilor de 50-100 W/kg biomasa umeda pentru un timp de 1 -10 min pana la evaporare completa a apei, dupa care puterea radiatiilor sunt reduse la 1-2 kW/kg biomasa pentru 10-1000 s. Biomasa pretratata este supusa in continuare hidrolizei si fermentarii simultane pentru producerea de etanol combustibil, butanol si acid succinic. In brevetul **KR101605068B1** se descrie un procedeu de extractie a polizahidelor din plante folosind tratamentul cu microunde in prezenta unui acid, precipitarea solutiei acide si separare polizaharidelor prin extractie cu alcool. Conform inventie s-a utilizat o presiune de 10-760 mmHg, o presiune de 1 KW/kg biomasa pentru 5-120 minute.

In tara exista cateva metode/procedee de producere bioetanol si utilizare acestuia in motoare cu ardere interna descrise de inventiile: MD3656F22008.07.31, RO126407, RO127297.

Brevetul **MD3656F22008.07.31** propune utilizarea etanolului combustibil in motoarele cu ardere interna fara necesitatea modificarii constructive a acestora.



Inventia nu prezinta modul de obtinere a bioetanolului. Conform inventiei, etanolul poate fi amestecat in proportie de 35...70% cu combustibil de hidrocarbura 15...40% si eter metil-tertbutilic sau eter tertbutilic in proportie de 10...25% pentru obtinerea unui combustibil pe baza de etanol ce poate fi utilizat ca inlocuitor al benzinei in motoare cu ardere interna. Brevetul **RO126407** descrie un procedeu de obtinere a unui combustibil pentru motoare cu aprindere interna. In documentul **RO126407** se prezinta un procedeu de producere combustibil (etanol) din biomasa lignocelulozica prin autohidroliza biomasei la temperaturile de 190...220°C, presiunea de 50...70 bari, hidroliza acida cu 2% acid sulfuric in prima faza, respectiv 15% in cea de a doua faza a fractiei celulozice si fermentatia fractiei lichide separata dupa autohidroliza biomasei si a fractiei lichide separata dupa hidroliza acida cu *S. cerevisiae*, la un pH 4...6 si o temperatura de 30...40°C. Brevetul **RO127297** descrie un procedeu de obtinere a bioetanolului din deseuri celulozice prin hidroliza enzimatica si fermentatia fractiilor zaharoase. Procedeu de obtinere bioetanol are loc prin autohidroliza deseurilor celulozice cu apa in cataliza acida la pH 2...4, la o temperatura de 180...210°C, la o presiune de 50...70 bari si un timp de rezidenta de 10...150 min, dupa care fractia lichida este separata de fractia solida care este in continuare hidrolizata cu enzime si fermentata cu drojdia de bere *S. cerevisiae*.

Scopul prezentei inventii este obtinerea bioetanolului din coarde de vita de vie printr-un procedeu de obtinere ce consta in cinci etape de conversie: (i) tratarea coardelor de vita de vie cu microunde, (ii) delignificarea coardelor pretratate, (iii) hidroliza enzimatica cu enzime celulozice, (iv) fermentatia zaharurilor la bioetanol si (v) distilarea si anhidrificarea bioetanolului obtinut.

Descriere: Inventia se caracterizeaza prin aceea ca are la baza cinci etape de conversie a coardelor de vita de vie la bioetanol: (i) pretratate coardelor de vita de vie cu microunde in prezenta apei, (ii) delignificarea cu clorit de sodiu a coardelor pretratate pentru eliminarea ligninei, (iii) hidroliza enzimatica a coardelor delignificate pentru hidroliza celulozei la monozaharide, (iv) fermentatia monozaharidelor la etanol, (vi) distilarea/anhidrificarea etanolului obtinut.

Metoda de pretratament cu microunde foloseste doar apa ca solvent pentru separarea hemicelulozelor din coardele de vita de vie. Se formeaza doua faze: fractia lichida care contine hemiceluloza solubilizata sub forma de monozaharide, oligozaharide si compusi inhibitori (furfurol, 5-hidroximetilfurfural) si fractia solida care contine celuloza si lignina. Fractia solida rezultata dupa pretratament contine cu preponderenta celuloza si lignina. Delignificarea cu clorit de sodiu in mediu acid este folosita pentru eliminarea ligninei din coardele de vita de vie pretratate inainte de hidroliza enzimatica. Metoda de delignificare are avantajul eliminarii efective a ligninei fara degradarea altor componente. Hidroliza enzimatica a fractiei solide delignificate are loc cu ajutorul enzimelor celulozice *Trichoderma reesei* si β -

glucosidaze. Trebuie mentionat si subliniat ca hidroliza enzimatica se realizeaza separat de etapa de fermentatie. In figura 1 este prezentata tehnologia de producere bioetanol din coarde de vita de vie propusa spre brevetare prin prezenta cerere de brevet.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia este:

- Rapiditatea metodei de pretratament propusa;
- Eliminarea substantelor chimice prin folosirea apei in locul solventilor chimici pentru extractia hemicelulozelor;
- Folosirea materiei prime regenerabile si utilizarea materiilor prime nealimentare sau furajere;
- Separarea celulozei prin metoda de delignificare propusa;
- Randament mare de hidroliza enzimatica si procent ridicat de bioetanol
- Hidroliza se realizeaza separat de etapa de fermentatie asigurand un randament marit de obtinere a carbohidratilor.

Mod de aplicare al inventiei

1. Uscare si maruntire a coardelor de vita, pana la granulatii de 0,2..2 mm. Se cantaresc 20 ± 2 g coarde maruntite.
2. Pretratamentul coardelor de vita de vie:
 - a. amestecul celor 20 ± 2 g coarde vita de vie cu 50 ml apa si introducerea intr-un digestor cu microunde, incalzite la temperaturile de 150...180°C, pentru un timp de reactie de 10 ...30 minute.
 - b. faza solida este separata de fractia lichida si este supusa delignificarii cu solutie de clorit de sodiu.
3. Coardele de vita de vie pretratate (cf. etapa 2) se trateaza cu 3..5 g clorit de sodiu in 200...400 ml acid acetic 10%, temperatura de 60...80 °C, timp de reactie 1...2 ore. Se formeaza doua faze: in fractia lichida se recupereaza lignina, iar in fractia solida se recupereaza celuloza care este supusa in continuare hidrolizei enzimatice.
4. Fractia solida (recuperata in etapa 3) este supusa in hidrolizei enzimatice. Hidroliza enzimatica are loc intr-un bioreactor (echipat cu senzor de temperatura, pH si oxigen) in care se introduc enzimele celulozice.
 - a. La 8...12 g faza solida uscata se adauga 80..120 ml citat de sodiu (0,05 M), dupa care se adauga 10 FPU/g biomasa enzime *Trichoderma reesei* ATCC 26924 si 20 U/g biomasa enzime β -glucosidaze, cu 10% concentratia solidelor, temperatura de 37...55°C, timp de hidroliza 24...72 ore.

5. Produsul de hidroliza este supus in continuare fermentatiei cu drojdia de bere *S. cerevisiae*.
 - a. La 80..120 ml solutie de hidrolizat se adauga 50..100 ml solutie de inocul (peptona, drojdia, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 50...100 ml solutie de nutrienti ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4), pH de 4...6, temperatura 30...40°C, timp de fermentatie 24...72 ore.
6. Produsul de fermentatie este separat prin distilare si anhidrificat. Din 20 g de coarde de vita de vie se obtin 0,8...1,5 g bioetanol.

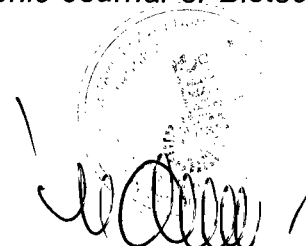
Inventia are urmatoarele avantaje:

- bioetanolul se obtine din surse regenerabile, ieftine si cu un continut ridicat de celuloza, raspunzand astfel principiilor de implementare a principiilor economiei circulare;
- metoda de pretratament folosita este o metoda ecologica care foloseste doar apa pentru separarea componentelor principale din coardele de vita de vie si reduce formarea compusilor secundari;
- timpul de procesare pentru metoda de pretratament este foarte scurt;
- se elimina lignina din structura coardelor pretratate prin metoda propusa;
- randament mare al hidrolizei enzimatica.

Bibliografie:

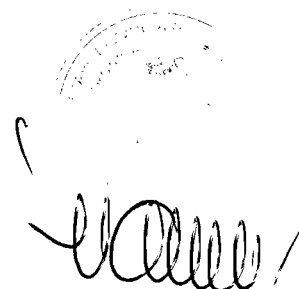
1. R. Sánchez-Gómez, G. L. Alonso, M. R. Salinas, A. Zalacain, Reuse of Vine-Shoots Wastes for Agricultural Purposes, *Handbook of Grape Processing By-Products*, **2017**, 79–104.
2. Z. M. A. Bundhoo, Microwave-assisted conversion of biomass and waste materials to bio-fuels, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2018**, 82, 1149–1177.
3. I. Dávila, J. Remón, P. Gullón, J. Labidi, V. Budarin, Production and characterization of lignin and cellulose fractions obtained from pretreated vine-shoot by microwave assisted alkali treatment, *Bioresource Technology*, **2019**, 289, 121726.
4. B. Sharma, C. Larroche, C. Dussap, Comprehensive assessment of 2G bioethanol production, *Bioresource Technology*, **2020**, 313, 123630.
5. S. Achinas, G.W. Euverink, Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass, *Electronic Journal of Biotechnology*, **2016**, 23, 44-53.

Mulumiri:



REVENDICARE

Procedeu de obtinere bioetanol prin fermentatia carbohidratilor din coarde de vita de vie prin metoda SHF de separare a procesului de hidroliza de procesul de fermentatie **caracterizat prin aceea că** din 20 g coarde de vita de vie uscate si macinate care se supun pretratamentului cu microunde in prezenta apei la o temperatura de 150...180 °C, pentru un timp de reactie de 5...10 minute, dupa care urmeaza delignificarea cu clorit de sodiu in acid acetic 10%, la o temperatura de 60...80 °C, timp de reactie 1...2 ore, urmata de hidroliza enzimatice in solutie de citrat de sodiu 0,05 M, celulase din *Trichoderma reesei* ATCC 26924 (10 FPU/g biomasa) si β -glucozidaze (20 U/g biomasa) la temperatura de 37...55°C, timp de hidroliza de 24...72 ore, urmata de fermentatia cu *S. cerevisiae* in mediu de inocul si nutrienti la o temperatura de 30...40°C, timp de fermentatie de 24...72 ore, urmata de distilarea si anhidrificarea, rezulta 0,8...1,5 g bioetanol.

A handwritten signature in black ink is located at the bottom right of the page. Above the signature, there is a faint, circular stamp or seal, which is mostly illegible but appears to contain some text or a logo.

DESENE

FIG. 1 Schema procedeu de obtinere bioetanol prin fermentatia carbohidratilor din coarde de vita de vie prin metoda SHF de separare a procesului de hidroliza de procesul de fermentatie

A circular stamp is located at the bottom right of the page, partially overlapping a handwritten signature. The stamp contains some illegible text and a central emblem. The signature is written in black ink and appears to be a cursive name.

Fig. 1 Procedeu de obtinere bioetanol prin fermentatia carbohidratilor din coarde de vita de vie prin metoda SHF de separare a procesului de hidroliza de procesul de fermentatie

