



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00673

(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;

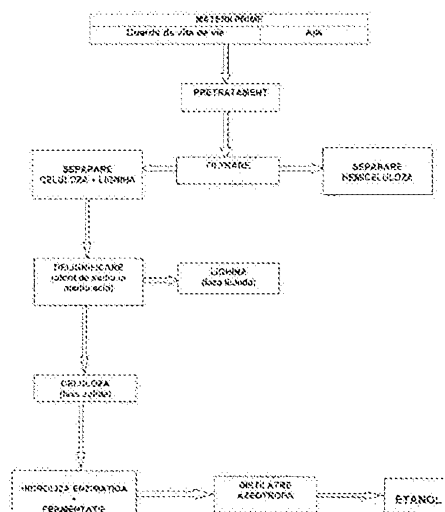
• VARATICEANU CERASEL,
STR. AVRAM IANCU NR. 10, TURDA, CJ,
RO;
• KOVACS ENIKO MARIA, NR.211,
COMUNA BACIU, CJ, RO;
• SCURTU DANIELA ALEXANDRA,
STR.OASULUI NR.89-90 BL.L2, SC.1,
AP.14, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• ROMAN CECILIA, STR. PIATA ABATOR,
BL. B, AP. 58, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) PROCEDEU DE OBTINERE BIOETANOL DIN COARDE DE VIȚĂ DE VIE PRIN METODA SSF DE ZAHARIFICARE ȘI FERMENTARE SIMULTANĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a bioetanolului din coarde de viță de vie prin pretratarea de autohidroliză, delignificarea pentru eliminarea completă a ligninei, urmate de hidroliza și fermentarea zaharurilor obținute la bioetanol. Procedeu conform invenției constă în prelucrarea unei cantități de 100 g de coarde de viță de vie uscate și măcinate care se supun autohidrolizei cu apă la o temperatură cuprinsă între 165...180°C, la o presiune cuprinsă între 60...80 bari, timp de 5...10 minute, după care urmează delignificarea cu clorit de sodiu în acid acetic 10%, la o temperatură cuprinsă între 60...80°C, cu timpul de reacție cuprins în intervalul de 1...4 ore, urmată de hidroliza enzimatică și fermentația simultană în soluție de citrat de sodiu de 0,05 M, după care se adaugă 10 FPU/g biomasă enzime *Trichoderma reesei* ATCC 26924 și 20 U/g biomasă enzime β - glucozidaze, inocul și nutrienți, la o temperatură cuprinsă între 38...45°C, timp de 24...72 ore și se distilează azeotrop cu benzen, rezultând o cantitate de 3...6 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).



6

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 22 00673</u>
Data depuneri <u>2.7.10-2020</u>

PROCEDEU DE OBTINERE BIOETANOL DIN COARDE DE VITA DE VIE PRIN METODA SSF DE ZAHARIFICARE SI FERMENTARE SIMULTANA

Inventia se refera la un procedeu de obtinere bioetanol (combustibil lichid) din coarde de vita de vie prin pretratamentul de autohidroliza, delignificarea pentru eliminarea completa a ligninei si hidroliza si fermentarea zaharurilor obtinute la bioetanol.

Cultivarea de plante pentru obtinerea de biocombustibili creeaza numeroase probleme economice, sociale si de mediu astfel ca s-au cautat si se cauta alternative viabile constand in valorificarea superioara a deseurilor de biomasa rezultate in practica agricola. Coardele de vita de vie sunt deseuri lignocelulozice care contin celuloza, hemiceluloze, lignina si materie anorganica. Producerea de biocombustibili din deseurile provenite din viticultura reprezinta o alternativa durabila, nealimentara, de eliminare a poluarii cauzate de arderea acestora, care este o practica intalnita in mod curent [1].

In prezent, producerea bioetanolului are loc prin fermentatia fractiilor zaharoase cu un continut ridicat de zaharuri. In general, metodele de producere bioetanol din biomasa lignocelulozica au in componenta patru etape: pretratamentul, hidroliza, fermentatia si distilarea/anhidrificarea etanolului [2, 3]. Celuloza si hemicelulozele prezente in structura coardelor de vita de vie se pot converti la etanol. Prezenta ligninei in procesul de hidroliza actioneaza ca un inhibitor al hidrolizei. Metoda de delignificare folosind clorit de sodiu in mediu acid reactioneaza selectiv doar cu lignina din structura coardelor de vita de vie. Metoda de hidroliza enzimatica si fermentatie simultana presupune combinarea a doua procese intr-unul singur si reducerea substantiala a timpului de producere bioetanol prin controlarea temperaturii de hidroliza, respectiv de fermentatie. Unul din neajunsurile privind procesul de hidroliza enzimatica si fermentatie simultana este gasirea temperaturii optime pentru realizarea proceselor simultan deoarece hidroliza enzimatica are loc la temperaturi de 40 -55°C, iar fermentatia are loc la temperaturi de 30 -38°C. In acest sens, trebuie aleasa temperatura care acopera intreg domeniu de reactivitate, atat pentru enzime, cat si pentru drojdie. Un alt neajuns este gasirea timpul optim de reactivitate, atat pentru hidroliza enzimatica cat si pentru fermentatie. In general, atat procesul de hidroliza enzimatica cat si fermentatia au loc timp de 24 -72 h fiecare [4, 5].

In strainatate exista metode de obtinere a bioetanolului, cunoscute din brevetele WO2009005390A1, WO2013114962A1, US8551747B2, CN104593448B.



Brevetul **WO2009005390A1** descrie o metoda de producere a bioetanolului din lignoceluloze prin tratament mecanoenzimatic. Conform inventiei, amestecul de lignoceluloze si enzime celulozice se introduc intr-o moara cu bile timp de 0,5-10 min si o viteza de agitare de 10-120 m/s, dupa care are loc fermentarea la bioetanol.

De asemenea, brevetul **WO2013114962A1** descrie o metoda de producere etanol din manioc prin urmatoarele etape: deseurile de manioc si apa sunt introduse intr-un reactor de presiune si sunt incalzite la 80-95°C si presurizate la 200 KPa pentru 1-20 min, hidrolizate cu ajutorul enzimelor celulozice, glucoamilazice si pectinaze la 40-60°C si fermentate la etanol cu ajutorul bacteriilor (*S. cerevisiae* si *Kluyveromyces marxianus*). In literatura de specialitate se regaseste brevetul US8551747B2, in care se dezvaluie un procedeu de obtinere a bioetanolului din materiale lignocelulozice prin urmatoarele etape: 1) destructurarea materialului lignocelulozic prin tratarea acestuia cu un amestec de apa si acid formic (50%) la temperatura de 95-110°C, (2) separarea fazei solide (care contine celuloza) de fractia lichida (care contine hemiceluloze, lignina si compusi secundari) si hidroliza enzimatica la zaharuri si (3) fermentatia la bioetanol cu ajutorul drojdiilor. Brevetul **CN104593448B** descrie producerea bioetanolului din biomasa lignocelulozica prin urmatoarele etape: (1) pretratamentul biomasei cu acid sulfuric, (2) tratamentul alcalin al fractiei solide; (3) hidroliza acida la 50-100°C in prima etapa, urmata de hidroliza enzimatica in cea de-a doua etapa, (4) fermentatia la bioetanol.

In tara nu exista nici instalatii industriale nici de capacitate mica care sa produca bioetanol din deseuri provenite din viticultura sau materiale lignocelulozice, dar exista cateva metode de producere bioetanol descrise de inventiile: RO127523 B1, RO 126407 B1 si RO 127297 B1.

Brevetul **RO127523 B1** descrie producerea unei tulpine de drojdie, *Saccharomyces cerevisiae*, cu activitate antagonista si fermentativa folosita pentru fermentarea alcoolica la bioetanol si bioproduse din cereale contaminate cu micotoxine. Brevetul **RO 126407 B1** descrie un procedeu de obtinere a unui combustibil pentru motoare cu aprindere interna din lemn. Conform inventiei, fractiile zaharoase sunt separate prin autohidroliza cu abur la presiune de 50...70 bari, catalizate de acid la pH 2...4, la temperatura de 190...220°C, dupa care faza lichida continand hemiceluloza este amestecata cu fractia solida rezultata si hidrolizata cu acid sulfuric 2% si 15% si fermentate la bioetanol. Brevetul **RO 127297 B1** descrie un procedeu de obtinere bioetanol din deseuri celulozice in procesul de zaharifcare si fermentare simultana prin urmatoarele etape: (1) separarea fractiunilor celulozice si hemiceluloza prin metoda de pretratament de autohidroliza in faza de vapori catalizata la pH 2...4, la o temperatura de 180...210°C, la o presiune de 50...70 bari, timp de rezidenta de 10...15 min si (2) faza solida separata dupa pretratament este



hidrolizata si fermentata simultan cu *S. cerevisiae* la pH 4.8...5,5, la o temperatura de 30...40°C, timp de hidroliza si fermentatie de 24...72h.

Scopul prezentei inventii este obtinerea bioetanolului din coarde de vita de vie printr-un procedeu de obtinere ce consta in patru etape de conversie: (i) pretratarea coardelor de vita de vie cu apa la temperaturi si presiuni ridicate, (ii) delignificarea coardelor pretratate, (iii) hidroliza enzimatica si fermentatia simultana la bioetanol si (iv) distilarea si anhidrificarea bioetanolului obtinut si scurtarea duratei procesului.

Descriere: Inventia se caracterizeaza prin aceea ca are la baza patru etape de conversie a coardelor de vita de vie la bioetanol: (i) pretratarea, prin autohidroliza pentru separarea hemicelulozelor, (ii) delignificarea cu clorit de sodiu in mediu acid, pentru eliminarea ligninei, (iii) combinarea proceselor de hidroliza si fermentare intr-un singur proces si (iv) distilarea azeotropa pentru purificarea/anhidrificarea bioetanolului obtinut. Metoda de autohidroliza folosita foloseste doar apa la temperaturi si presiuni ridicate pentru separarea hemicelulozelor din structura coardelor de vita de vie. Fractia solida rezultata dupa pretratament contine cu preponderenta celuloza si lignina. Delignificare cu clorit de sodiu in mediu acid este folosita pentru eliminarea ligninei din coardele de vita de vie pretratate inainte de hidroliza si fermentarea la bioetanol. In figura 1 este prezentat procedeu de obtinere bioetanol din coarde de vita de vie propus spre brevetare prin prezenta cerere de brevet.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia este:

- eliminarea reactivilor chimici utilizati in etapa de pretratament din componenta metodelor descrise anterior, prin propunerea unei metode de pretratament ecologic care foloseste doar apa la temperaturi si presiuni ridicate in scopul separarii componentelor principale din coarde,
- eliminare intr-un procent ridicat a ligninei, prin propunerea unei metode de delignificare care asigura eliminarea ligninei in proportie de 98%,
- scurtarea timpului total al procesului de obtinere bioetanol, prin combinarea etapei de hidroliza enzimatica cu cea de fermentatie intr-o singura etapa.

Mod de aplicare al inventiei

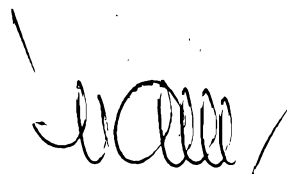
1. Uscare si maruntire a coardelor de vita, pana la granulatii de 2..10 mm.
Se cantaresc 100 ± 10 g coarde maruntite.
2. Pretratamentul coardelor de vita de vie:



- a. autohidroliza amestecului de celor 100 ± 10 g coarde vita de vie cu 700 ml apa, incalzite la temperaturile de $165...180$ °C, $60..80$ bari pentru un timp de reactie de $5 ...10$ minute.
 - b. faza solida este separata de fractia lichida si este supusa delignificarii cu solutie acida de clorit de sodiu.
3. Coardele de vita de vie pretratate (cf. etapa 2) se trateaza cu $20..25$ g clorit de sodiu in $1...1,5$ L acid acetic 10%, temperatura de $60...80$ °C, timp de reactie $1...4$ h. Se formeaza doua faze: in fractia lichida se recupereaza lignina, iar in fractia solida se recupereaza celuloza care este supusa in continuare hidrolizei si fermentatiei simultane.
4. Celuloza (recuperata in etapa 3) este supusa in continuare hidrolizei si fermentatiei simultane. Hidroliza enzimatica si fermentatia simultana au loc concomitent in acelasi bioreactor (echipat cu senzor de temperatura, pH si oxigen) in care se introduc enzimele celulazice, drojdia de bere, nutrientii si solutia de inocul.
 - a. La $15...25$ g faza solida uscata se adauga $250..300$ 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 -glucozidaze, $100...150$ ml nutrienti, $100..150$ ml inocul, peptona (1g/L) cu 10% concentratia solidelor, temperatura de $38...45$ °C, timp de hidroliza $24...72$ ore.
 - b. Solutia de inocul contine: drojdie, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ iar nutrientii contin: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 .
5. Produsul de fermentatie este separat prin distilare si anhidrificat prin distilare azeotropa cu benzen. Din 100 g coarde de vita de vie se obtin $3...6$ g bioetanol.

Inventia are urmatoarele avantaje:

- bioetanolul se obtine din surse regenerabile;
- metoda de pretratament folosita este o metoda ecologica care foloseste doar apa pentru separarea componentelor principale din coardele de vita de vie;
- se elimina lignina din structura coardelor pretratate prin metoda propusa obtinandu-se o crestere a randamentului de fermentatie de pana la 98%;
- timpul de procesare pentru hidroliza, respectiv pentru fermentatie este foarte scurt deoarece se combina doua procese intr-unul singur (hidroliza enzimatica + fermentatie).

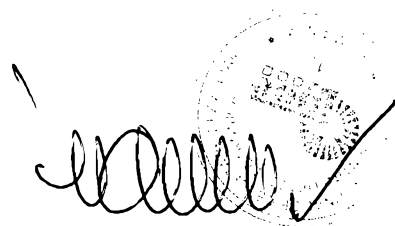


Bibliografie:

1. F. Cotana, M.Barbanera, D. Foschini, E. Lascaro, C. Buratti, Preliminary optimization of alkaline pretreatment for ethnaol production from vineyard pruning, *Energy Procedia*, **2015**, 82, 389-394.
2. S. Achinas, G.J.W. Euverink, Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass, *Electronic Journal of Biotechnology*, **2016**, 23, 44-53.
3. 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.
4. E.R. Pachón, P. Mandade, E. Gnansounou, Conversion of vine shoots into bioethanol anc chemicals: Prospective LCA of biorefinery concept, *Bioresource Technology*, **2020**, 303, 122946.
5. M.S. Jesus, A. Romaní, Z.Genisheva, J.A. Teixeira, L. Dominques, Integral valorization of vine pruning residue by sequential autohydrolysis stages, *Journal of Cleaner Production*, **2017**, 168, 74-86.

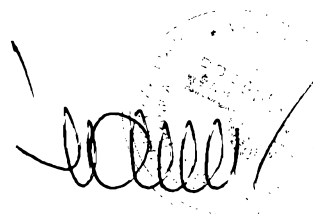
Mulumiri:

Cerere de brevet de inventie a fost realizata pe baza cercetarilor realizate in cadrul proiectului de cercetare CCCDI-UEFISCDI, project number PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017 0251/4PCCDI/2018, iar taxa de inregistrare si publicare au fost platite din proiectul PROINSTITUTIO, contract nr. 19PFE/17.10.2018.

A handwritten signature in black ink is written over a circular official stamp. The stamp contains text in Romanian, including "ROMANIA" and "INSTITUTUL NAȚIONAL DE PROPRIETATE INDUSTRIALĂ".

REVENDICARE

Procedeu de obtinere bioetanol din coarde de vita de vie prin metoda SSF de zaharificare si fermentare simultana **caracterizat prin aceea că** din 100 g coarde de vita de vie uscate si macinate care se supun autohidrolizei cu apa la o temperatura de 165...180 °C, presiunea de 60..80 bari, timp 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...4 h, urmata de hidroliza enzimatica si fermentatia (simultana) 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), inocul, nutrienti, la o temperatura de de 38...45°C, timp de hidroliza 24...72 ore, urmata de distilarea azotropa cu benzen, rezulta 3...6 g bioetanol.

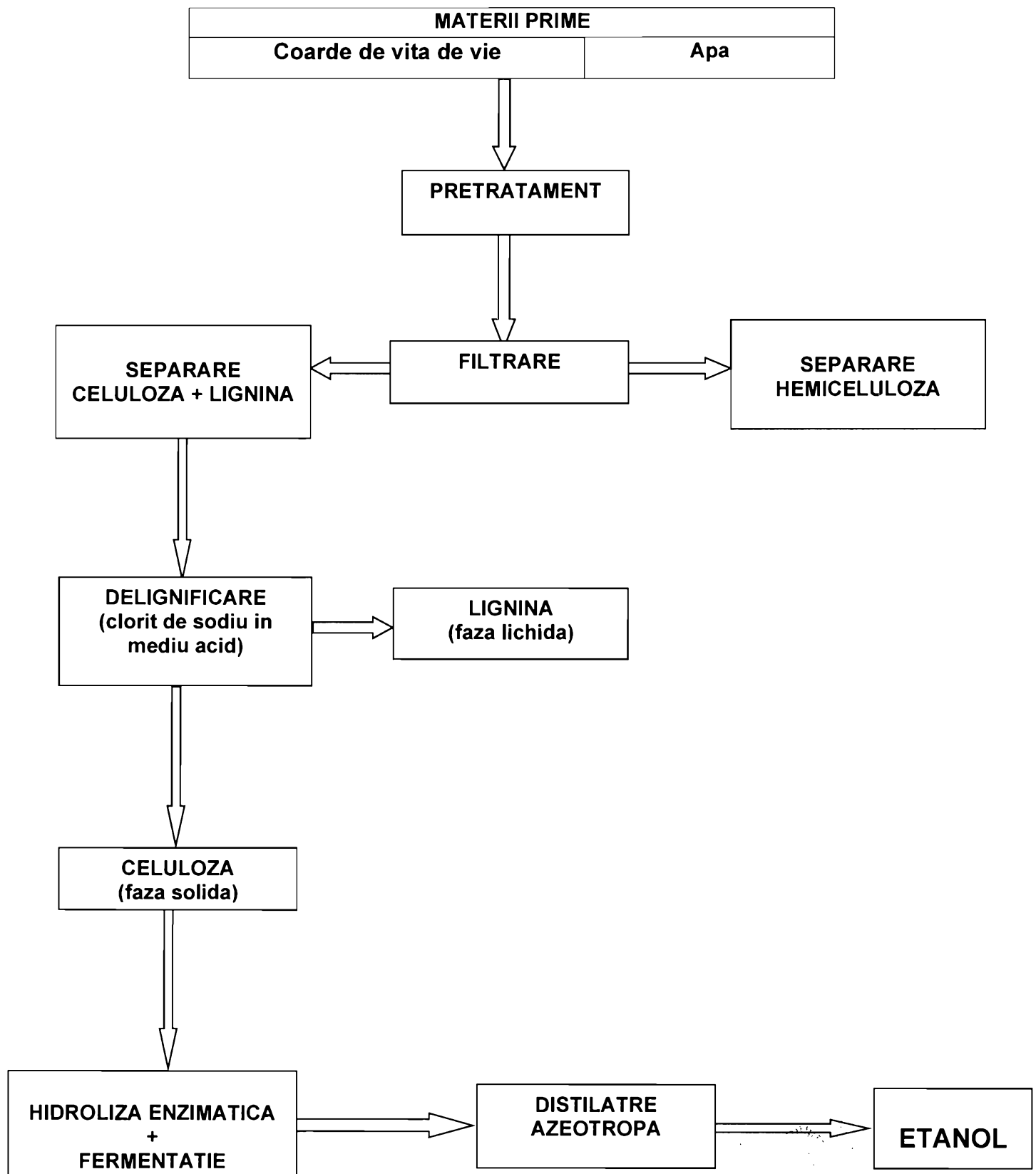
A handwritten signature in black ink is written over a circular official stamp. The stamp contains some text, including what appears to be a date '18.12.2011' and some other illegible characters.

DESENE

Fig. 1 Schema procedeu de obtinere bioetanol din coarde de vita de vie prin metoda SSF de zaharificare si fermentare simultana

A handwritten signature in black ink is written over a circular official stamp. The stamp contains some text, including the word "ROMANIA" and a date "2014".

Fig. 1 SCHEMA PROCEDEU DE OBTINERE BIOETANOL DIN COARDE DE VITA DE VIE



Handwritten signature and the number 2.