

CERCETĂRI PRIVIND CONVERSIA BIOMASEI LIGNOCELULOZICE LA ETANOL

Șef lucrări, dr.ing. Teodor VINTILĂ
USAMVB – Timișoara



Absolvent al primei promoții de ingineri biotehnologi (1997) a Facultății de Zootehnie și Biotehnologii, profilul biotehnologii agricole, USAMVB, Timișoara. Master în specializarea biologie moleculară în agricultură, promoția 1998. Doctor în științe, din 2003. Din 1997 activitate didactică la disciplinele de microbiologie generală, microbiologie industrială, bioinginerie și bioreactoare, procese și utilaje în biotehnologii, imunogenetică și imunomodulare, genetica microorganismelor (master). În prezent este titularul disciplinelor de microbiologie specială și tehnologia produselor de biosinteză din cadrul Facultății de Zootehnie și Biotehnologii, Timișoara.

Este coautor la șase publicații de specialitate în edituri de prestigiu și la peste 50 de lucrări științifice. A participat la stagii de pregătire și burse în străinătate: modul de învățământ interuniversitar francofon în domeniul *Adaptation digestive et métabolique chez ruminants*; stagiul de pregătire în domeniul agriculturii montane, Germania, prin Bayerische Bauerverband; stagii scurte de perfecționare în microbiologie și biologie moleculară, în cadrul Institutului de Biotehnologii Godollo – Ungaria și în inginerie genetică, în cadrul Institutului de Cercetări Biologice Szeged – Ungaria, în managementul fermelor de vaci de lapte și industria aditivilor furajeri microbieni, prin intermediul Communicating for Agriculture Exchange Program și Ridgewater College – Hutchinson, Minnesota, USA; bursă de studii finanțată prin Norman E. Borlaug International Agricultural Science and Technology Fellows Program, la Universitatea din Kentucky, în domeniul biotehnologiilor industriale, bioconversia biomasei celulozice la etanol ca biocombustibil; absolvirea unui curs și lucrări practice organizat de Dublin University (Irlanda), The Children's Medical & Research Foundation și Universitatea de Științe Agricole Timișoara în:

tehnici de biologie moleculară: identificarea receptorilor ARNm în celule eucariote, prin izolarea ARN, transcripție și amplificare PCR; tehnici de culturi tisulare: cultivarea celulelor epiteliale umane; reguli de siguranță în laborator.

REZUMAT

În prima parte a lucrării se face o analiză a situației mondiale a producerii etanolului ca biocombustibil și consecințele dezvoltării acestei industrii în anii din noul mileniu. Se face referire la cadrul legal, prețul cerealelor, situația din sectorul zootehnic creată de consumul tot mai mare de cereale în scopul obținerii de etanol. În partea a doua a lucrării se prezintă cercetările efectuate de către autor în domeniul microbiologiei industriale, legate de conversia biomasei agricole la etanol, prin hidroliză enzimatică și fermentare.

ABSTRACT

In the first part of this work an analysis of the world ethanol production as biofuel is made and the implications of the development in this industry in the recent years. The legal frame, the price of the cereals, the situation in the animal sector created by the increasing consume of cereals for ethanol production are described. In the second part of the work the researches of the author are presented, in the field of industrial microbiology and the conversion of biomass to ethanol by hydrolysis and fermentation.

Criza mondială de energie din ultimul timp a pus pe jar comunitatea științifică internațională. Prețul țițeiului este tot mai greu de controlat. De aceea, trebuie căutate noi metode de a obține combustibili „pe cale naturală”. Se pare că soluția cea mai bună o reprezintă înlocuirea combustibililor convenționali, fosili, cu biocombustibili obținuți din surse regenerabile. O sursă permanentă de materie energetică o reprezintă plantele care conțin glucide sau poliglucide care înmagazinează energie. O astfel de plantă este porumbul. Orice crescător de animale știe că porumbul conține mult amidon, transformat de animalul care îl consumă în energie; aceasta, dacă

depășește necesitățile energetice ale organismului, este transformată în depozite de grăsime. Amidonul poate fi transformat însă cu ajutorul enzimelor în glucoză, care poate fi fermentată cu ajutorul microorganismelor în etanol. Iată, deci, o altă modalitate de a exploata energia înmagazinată în porumb.

UE, cu toate că se află în grupul celor mai mari producători de biocombustibili, este devansată cu mult de țări ca Brazilia sau SUA. În anul 2003, la 30 de ani după ce Brazilia a lansat programul „pro alcool”, UE a stabilit cadrul legal și fiscal pentru încurajarea producerii și folosirii biocombustibililor în țările membre. Pachetul

legislativ constă în două directive. Cea „promoțională” stabilește indicatorii și țintele pentru a încuraja statele membre să utilizeze 2% biocombustibili din consumul total, până în 2006, și 5,75%, până în 2011. A doua directivă se referă la taxarea produselor energetice (directiva 2003/30/EC privind promovarea folosirii biocombustibililor sau a altor combustibili ecologici pentru transport, OJ L 123 din Mai 2003). Sub această directivă, statele membre vor putea să scutească de impozite, complet sau în parte, produsele care conțin substanțe ecologice.

În 2002, alcoolul combustibil reprezenta aproximativ 15% din alcoolul produs în UE (396 milioane litri) și era produs doar în trei țări: Spania (56%), Franța (30%) și Suedia (14%). Se estimează ca acest procent să crească la 84% până în 2011. Luând în considerare consumul de benzină în statele membre și procentajele țintă de substituție, respectiv 2% și 5,75%, nevoia de etanol va crește la 3000 – 5000 milioane litri (2% substituție) și 9000 – 155 000 milioane litri (5,75% substituție). Acest lucru va duce la folosirea unei cantități tot mai mari de plante furajere, cereale și leguminoase, în scopul producției de biocombustibili. Cererea tot mai mare va duce, pe de o parte, la creșterea prețului acestor produse; pe de altă parte, porumbul, soia nu vor fi disponibile (periodic) pe piață pentru crescătorii de animale. Dacă în UE se impune adăugarea de minimum 5,75% biocombustibil până în 2011, în Brazilia, spre exemplu, deja legea impune introducerea a minimum 26% etanol în benzină. Însă, în Brazilia, etanolul este produs din bagase (trestie-de-zahăr epuizată, rezultată în urma extracției zahărului) și, doar o mică parte, din porumb. Semnale de alarmă se aud deja în SUA, unde producția de etanol a crescut exponențial în ultimii 5 ani. Economisții estimează că prețul de 79 USD/tonă porumb va crește din cauza competiției procesatorilor industriali cu cel puțin 19 USD sau chiar cu 39 USD în următorii 10 ani. Deja 15% din porumbul consumat în SUA este transformat în etanol de către cele peste 130 de biorafinării, iar în 2012 se estimează că acest procentaj va crește la 39%! Aceasta înseamnă că porumbul transformat în biocombustibil va crește de la 37 tone, în 2005, la 108 t/an. Producătorii de etanol contracarează nemulțumirile crescătorilor de animale (mai ales pe cele ale crescătorilor de porci), spunând că ceea ce rămâne după extragerea alcoolului din porumbul fermentat (numit DDGS = *distilled dried grains with solubles*, sau cereale uscate distilate cu substanțe solubile) este un bun furaj proteic. Deja în statele din nord-vestul SUA, rațiile porcilor în stadiile de creștere și finisare conțin 20 – 30 % DDGS. Însă, ultimele date obținute de la porcii hrăniți cu furaje care conțin DDGS arată obținerea unor carcase cu grăsime moale, care ridică probleme procesatorilor în obținerea de produse proaspete (bacon).

Care ar fi soluția pentru a depăși această criză? Din ce altceva se poate obține etanol, pentru a lăsa cerealele

sectorului furajer și alimentar, și a nu afecta prețul acestora?

Biotehnologiile găsesc soluții acolo unde alte discipline își ating limitele, după cum o spune și definiția biotehnologiilor, și anume: *aplicarea integrată a cunoștințelor și tehnicilor de microbiologie, genetică, biochimie și inginerie chimică, în scopul de a produce cu ajutorul celulelor microbiene, animale și vegetale, substanțe utile sau servicii necesare societății*. Soluția găsită în acest caz este obținerea etanolului nu din porumb, ci din **biomasă lignocelulozică** (orice subprodus, deșeu agricol, menajer sau industrial care conține celuloză). Biomasă lignocelulozică reprezintă o sursă abundentă și ieftină de resurse energetice regenerabile. De exemplu, reziduurile de trestie-de-zahăr, numite *bagase*, rezultate în urma extracției zahărului din trestia-de-zahăr sunt generate în cantități foarte mari în țări ca Brazilia, Tailanda, India, Hawaii și în sudul SUA. Teoretic, o tonă de bagase uscată poate genera circa 424 litri etanol. Alte produse lignocelulozice care pot fi folosite ca surse de energie sunt: reziduuri sau subproduse agricole – coceni de porumb, paie de grâu sau orez; reziduuri forestiere; reziduuri din industria de celuloză și hârtie; plante ierboase energetice. Însă, spre deosebire de amidon, care este un polimer omogen și ușor de hidrolizat, materia lignocelulozică vegetală conține celuloză, hemiceluloză, lignină și alte componente greu de hidrolizat. Toate aceste componente trebuie inițial tratate chimic și enzimatic, până sunt transformate în zaharuri care pot fi fermentate la alcool. Cu toate că biomasă lignocelulozică este disponibilă în cantități foarte mari, provocarea principală pentru a face produsul competitiv din punct de vedere comercial este reducerea costurilor procesului de conversie a biomasei la etanol. Deja sunt câteva proiecte finanțate pentru a produce alcool ieftin din celuloză, în SUA țelul fiind, până în 2010, un cost de producție de 1,07 USD/galon etanol.

La Facultatea de Zootehnie și Biotehnologii din cadrul USAMVB Timișoara se fac cercetări în acest sens de câțiva ani. Cercetările efectuate de colectivul de la disciplinele de microbiologie industrială și tehnologia produselor de biosinteză au ca bază Colecția de microorganisme industriale care este gestionată de personalul din cadrul acestor discipline. Această bancă de celule microbiene conține peste 50 de tulpini de bacterii, drojdii și fungi de interes industrial și agricol. Tulpinile sunt conservate atât prin refrigerare cât și prin congelare. O parte dintre tulpini sunt modificate genetic, în scopul ameliorării capacității productive a unor substanțe biologice active. Cercetările efectuate de acest colectiv, legate de biocombustibili, cuprind atât domeniul fermentației glucidelor cu obținere de etanol, cât și domeniul hidrolizei celulozei la glucide fermentescibile.

1. Aplicarea metodelor de ameliorare genetică prin selecție și mutagenză a drojdiilor folosite în industria

alcoolului și ca probiotice. În urma acestor lucrări au fost obținute noi tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* din următoarele tipuri morfologice: tulpini de tip rugos, floculant, preferate de producătorii de biomasă proteică furajeră sau de producătorii de bere; tulpini de tip neted, nefloculant, care sunt preferate de producătorii de alcool.

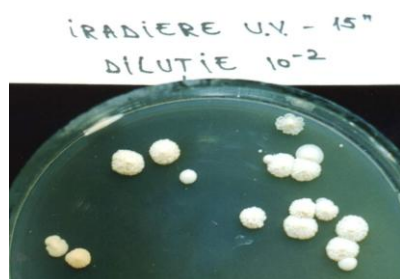
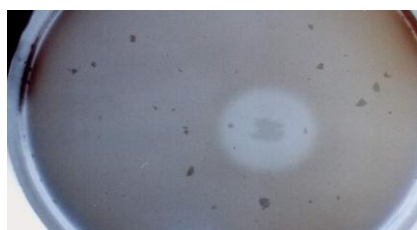


Fig. 1. Colonii obținute în urma iradierii celulelor de *Saccharomyces cerevisiae*. Se observă colonii de tip rugos, neted și petite.



A



B

Fig. 2. A. Halou produs de o colonie de *Bacillus licheniformis* transformant, rezistent la kanamicină, pe mediu cu caseină. Descompunerea caseinei indică secreția de enzime proteolitice extracelulare. B. În partea de sus a imaginii se observă două colonii transformate de *Bacillus subtilis*, cu ADN cromozomal de la *Bacillus globigii amy*⁺.

3. Testarea tulpinilor de microorganisme la nivel de laborator și în bioreactor micropilot, în vederea stabilirii capacității de biosinteză în specifice industriale, urmată de izolarea produsului de interes din mediul de biosinteză.

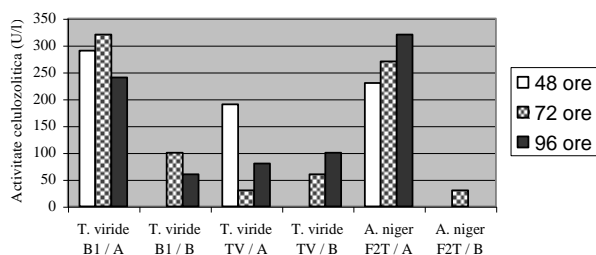


Fig. 3. Activitatea celulozolică a tulpinilor *T. viride* B1, *T. viride* TV și *A. niger* F2T cultivate pe două tipuri de medii de cultură, notate cu A și B.

Complexul enzimatic celulozolic produs de *T. viride* B1 a fost izolat din mediul de biosinteză prin precipitare cu solvenți organici. În urma precipitării a 25 ml mediu de biosinteză s-au obținut 227,9 mg precipitat umed. Acest precipitat a fost uscat, obținându-se 16,8 mg pulbere uscată cu activitate celulozolică (67,2 mg pulbere / 100 ml mediu de biosinteză).

2. Ameliorarea genetică prin selecție și transformare a microorganismelor producătoare de enzime hidrolitice (proteaze, amilaze, celuloze). În acest scop au fost aplicate o serie de metode:

- transformare directă a unor tulpini de *Bacillus subtilis* cu ADN cromozomal de la *Bacillus globigii*, în scopul ameliorării capacității de producție a amilazelor;

- transformare prin electroporare, transformare de protoplaști și transformare directă în prezență de cationi bivalenți a unor tulpini de *Bacillus licheniformis* cu ADN plasmidial pLC1 și pNC 61, în scopul ameliorării capacității de producție a proteazelor;

- de asemenea, au fost selecționate tulpini de *Trichoderma viride* și *Aspergillus niger*, producătoare de enzime celulozolitice necesare pretratării enzimatică a biomasei lignocelulozice și transformarea ei în glucide fermentescibile.

Enzima a fost supusă testării la valori de pH și temperatură diferite, în vederea caracterizării ei. Valorile obținute sunt redate în tabelele 1 și 2.

S-a constatat că enzima obținută în urma biosintezei are o activitate optimă la pH = 7 și la temperatura de 60°C. Se constată că activitatea ei scade la 0 la valori mici de pH. Prin urmare, trebuie tamponată aciditatea mediului în care urmează a fi aplicată. Enzima poate fi folosită în procesul de hidroliză enzimatică a biomasei lignocelulozice, în scopul obținerii de glucide fermentescibile, urmată de fermentarea hidrolizatului la etanol cu tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* sau *Zymomonas mobilis* modificate genetic, care pot fermenta nu numai glucoza, ci și arabinoza sau xiloza rezultate în urma hidrolizei complexului lignocelulozic. Pe de altă parte, consider că enzima poate fi inclusă cu succes în componența unui inoculant pentru siloz. La însilozare, pH-ul substratului vegetal este aproape de 7, deci complexul celulozolic acționează, descompune celuloza, punând glucoza la dispoziția bacteriilor lactice. Odată cu dezvoltarea bacteriilor lactice, pH-ul scade, inhibând activitatea enzimei. Aceasta înseamnă că se oprește procesul degradativ, conservându-se calitățile plantei însilozate.

Tabelul 1. Activitatea celulozolică a produsului obținut la temperaturi diferite

Temperatura [°C]	Activitatea soluției enzimatică [U/ml]	Activitatea pulberii enzimatică [U/g]
30	0	0
37	0,04	4
50	0,21	21
60	0,32	32

Tabelul 2. Activitatea celulozolică a produsului obținut la valori de pH diferite

pH-ul	Activitatea soluției enzimatică [U/ml]	Activitatea pulberii enzimatică [U/g]
4,6	0	0
7	0,32	32
8	0,12	12

În etapa următoare a cercetărilor efectuate în cadrul Laboratoarelor de Biotehnologii Microbiene și Enzimologie din cadrul Facultății de Zootehnie și Biotehnologii s-a trecut la condiționarea produselor de biosinteză obținute. În acest sens, s-a realizat imobilizarea prin diferite metode a enzimelor de biosinteză în matrice solide, iar în prezent se fac cercetări pentru condiționarea produselor care conțin celule vii de microorganisme prin imobilizarea în alginat, silicagel sau fixarea acestora pe suporturi solide uscate sau umede, minerale sau organice (carbonat de calciu, bentonită, diferite tipuri de ceramică, zeolit, turbă, celuloză, cereale măcinate etc.).

Cercetările realizate în acest domeniu vor permite alinierea României la tendințele actuale ale cercetării științifice internaționale în domeniul biotehnologiilor industriale (grey biotechnologies) și de mediu (green biotechnologies), de asemenea, vor contribui la promovarea biotehnologiilor moderne cu aplicabilitate practică în industria și agricultura din țara noastră.

BIBLIOGRAFIE

- Aden, A., M. Ruth, K. Ibsen, J. Jechura, K. Neeves, J. Sheehan, and B. Wallace from National Renewable Energy Laboratory; L. Montague, A. Slayton, and J. Lukas from Harris Group – Seattle, Washington. "Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. National Renewable Energy Laboratory Contract No. DE-AC36-99-GO10337. June 2002. NREL/TP-510-32438, pg. 5-36.
- Best P., "Doubts over ethanol's feed cost effect", Pig International. Vol. 36. No.5. June 2006, pg. 4.
- Gill C., "Corn's food-feed-fuel race may spur other feedstuffs. Feed International. Vol. 27. No.6. July 2006, pg.4.
- <http://www.europa.eu.int/comm/energy/res/sectors/bioenergy-en.htm>
- <http://www.fermentis.com/FO/EN/00-home/Article.asp?ArticleId=29> 10/2004, Biofuel in Europe.
- <http://www.farmfutures.com/ME2/Segments/NewsHeadlines/Pri nt.asp?Module=News&id=...6/9/2006>
- http://www.usaedc.org/success.cfm#successtype_name22
- <http://www.wreg.com/global/story.asp?s=5160614&ClientType =Printable> 7/26/2006
- http://www.efsa.europa.eu/science/gmo/gmo_guidance/catindex_en.html
- <http://www.dti.gov.uk/energy/sources/renewables/index.html>
- <http://www.ias.unu.edu/proceedings/icibs/mansson/paper.htm>
- http://journeytoforever.org/biofuel_library/WoodEthanolReport.html
- http://journeytoforever.org/biofuel_library/ethanol_sawdust.html
- http://www1.eere.energy.gov/biomass/analytical_procedures.html
- <http://www.eia.doe.gov/oiaf/analysispaper/biomass.html>
- Knauf M., M. Moniruzzaman, "Lignocellulosic biomass processing: A perspective". 2004. International Sugar Journal. Vol. 106, NO 1263, 2004, pg. 147-150.
- Philippidis, G., T.K. Smith and C. Wyman, "Study of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose for Production of Fuel Ethanol by Simultaneous Saccharification and Fermentation Process". 1993. Biotechnology and Bioengineering Vol. 41, pg 846-853.
- Vintila T. et al., Brevet de Inventie nr. 119062. *Procedeu de obtinere a unui furaj fermentat*. Oficiul de Stat pentru Inventii si Marci Romania, 2004.
- WATT Feed E-newsletter - Global view. Ethanol boom causing jitters over corn. Tuesday, July 11, 2006.
- WATT Feed E-newsletter – Industry News. Perdue: Poultry, grain, now biofuel. Tuesday, July 11, 2006.
- Zacchi, G. 1996. Ethanol from lignocellulose. Working report. May 1996.