



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2008 00598**

(22) Data de depozit: **31.07.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.08.2013** BOPI nr. **8/2013**

(41) Data publicării cererii:
26.02.2010 BOPI nr. **2/2010**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE CHIMICO-FARMACEUTICĂ - ICCF, CALEA VITAN NR.112, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **LUPESCU IRINA, STR.PREVEDERII NR.15 A, BL.C 1, SC.A, ET.2, AP.9, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MOSCOVICI MIȘU, STR.JEAN STERIADI NR.7, BL.122, SC.B, ET.2, AP.16, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MOCANU EUGENIA, ȘOS.IANCULUI NR.1, BL.112 C, SC.A, ET.4, AP.20, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PARASCHIV MIHAIU, STR.VALEA IALOMITEI NR.5, BL.D 21, SC.E, AP.45, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **GROPOȘILĂ-CONSTANTINESCU DIANA-GABRIELA, STR.PĂDURENI NR.10, BL.58 B, SC.1, PARTER, AP.1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **IONESCU ANA DESPINA, STR.ALUNIȘULUI NR.4, BL.11 A, SC.3, AP.99, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
S.KAMARAJ, "BIOGAS BASED POWER GENERATION FROM FRUIT AND VEGETABLE WASTE THROUGH BI-PHASIC DIGESTION", PROGRAM - THE NANOTECHNOLOGY CONFERENCE AND TRADE SHOW, BOSTON, 1-5 Iunie, 2008; WO 2008/084490 A1; W.J.JEWELL, R.J.CUMMINGS, B.K.RICHARDS, "METHANE FERMENTATION OF ENERGY CROPS: MAXIMUM CONVERSION KINETICS AND IN SITU BIOGAS PURIFICATION", BIOMASS & BIOENERGY, VOL.5, PP.261-278, 1993

(54) **PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE OBTINERE A BIOGAZULUI PORNIND DE LA DEȘEURI CEREALIERE LIGNOCELULOZICE**



RO 125230 B1

1 Invenția se referă la un procedeu biotehnologic de obținere a biogazului, pornind de
la deșeurile cerealiere lignocelulozice.

3 În literatura de specialitate, este descrisă producerea biogazului (metan), ca rezultat
al transformării deșeurilor organice, pe parcursul unor procese de fermentație. Acest tip de
5 bioconversie este în general cunoscut sub denumirea de digestie anaerobă (AD). AD este
un proces natural, utilizat ca un mijloc de reducere a gradului de poluare a apelor reziduale
7 comunitare, precum și a dejecțiilor animale.

9 Tehnologiile moderne de producere a biogazului vizează nu numai utilizarea deșeu-
rilor organice, tradițional folosite în acest scop, ci și a deșeurilor pre- și post-alimentare, a
deșeurilor verzi (resturi de iarbă, așchii provenite de la tăierea copacilor etc.), a maculaturii,
11 a deșeurilor lipidice vegetale și animale și a apelor reziduale. În multe țări europene
(Germania, Franța etc.), sunt folosite, în producția de biogaz, în amestec cu dejecțiile anima-
13 liere și substraturi vegetale constând în plante energetice cultivate în mod special în acest
scop și care se utilizează în întregime (de exemplu: porumb și floarea soarelui), rezultatele
15 fiind promițătoare [W. J. Jewell, R. J. Cummings, B. K. Richards, *Methane fermentation of
energy crops: maximum conversion kinetics and in situ biogas purification*,
17 *Biomass&Bioenergy*, vol. 5, pp. 261...278, 1993]. Fermentațiile producătoare de biogaz din
substraturi organice naturale durează de regulă minimum 20 de zile, pentru a obține o con-
19 concentrație în metan de circa 60%.

21 Utilizarea deșeurilor și/sau subproduselor agricole cerealiere, ca unice surse de
carbon și energic pentru producerea biogazului, nu este încă descrisă în literatura de specia-
23 litate, deși este cunoscut faptul că mai mult de jumătate din biomasa vegetală, obținută în
agricultură și silvicultură, nu se folosește decât parțial sau se aruncă. Este vorba despre
25 acea parte de biomasă vegetală, care, din cauza unui conținut ridicat de compuși ligno-
celulozici, nu poate fi utilizată în mod nemijlocit în hrana animalelor sau a omului, sau de
deșeurile rezultate din industria lemnului și a hârtiei. Cantități mari de deșeurile lignocelulozice
27 sunt generate de prelucrările agricole și forestiere, de industria celulozei și a hârtiei, a
lemnului și alte nenumărate agro-industrii, și ridică serioase probleme legate de poluarea
29 mediului înconjurător. Din păcate, o mare parte a deșeurilor lignocelulozice se pierde prin
arderea acestora pe câmp, practică extinsă la nivelul întregii planete, deși cantitatea uriașă
31 de biomasă alcătuită din reziduuri vegetale, considerată „deșeu”, reprezintă o sursă
potențială de produși utili.

33 În prezent, pe plan mondial, recuperarea și reintroducerea în circuitul economic a
resurselor materiale sunt abordate ca părți componente ale strategiilor de armonizare a
35 relațiilor dintre creșterea economică, consumul de resurse și protecția mediului natural. La
scară globală, sunt evidente o serie de restricții în privința resurselor materiale disponibile,
37 ceea ce a făcut ca reciclarea acestora să devină o necesitate obiectivă. În acest context,
interesul pentru valorificarea deșeurilor lignocelulozice a crescut considerabil, una dintre
39 direcțiile cercetărilor pe plan internațional fiind orientată, în prezent, spre îmbunătățirea
digestibilității deșeurilor lignocelulozice, prin tratamente combinate fizico-chimice și
41 enzimatice, în scopul disponibilizării substraturilor glucidice recalcitrante, printr-o hidroliză
controlată.

43 Utilizarea deșeurilor cerealiere lignocelulozice este menționată în literatura de
specialitate, cu precădere pentru obținerea bioetanolului [WO 2008/084490 A1], în timp ce,
45 pentru producerea biogazului, sunt menționate în ultimul timp, deșeurile lignocelulozice legumi-
cole sau provenite din fructe [S. Kamaraj, *Biogas based power generation from fruit and
47 vegetable waste through bi-phasic digestion*, Program - The Nanotechnology Conference
and Trade Show, Boston, 1-5 iunie, 2008].

RO 125230 B1

Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, se referă la stabilirea unor etape și condiții specifice de lucru, pentru obținerea mai eficientă a biogazului.	1
Procedeul biotehnologic, de obținere a biogazului pornind de la deșeuri cerealiere lignocelulozice, conform invenției, constă în aceea că deșeurile cerealiere lignocelulozice se tratează succesiv, la 55...60°C, cu laccază în proporție de 0,5...15% față de greutatea deșeurilor și cu un preparat enzimatic conținând celulaze, β-glucanază și xilanază, în proporție de 1...20% față de greutatea deșeurilor, realizând un grad de hidroliză de 25...55%, rezultând astfel un hidrolizat glucidic, care este inoculat cu o cultură de bacterii anaerobe, izolate din dejectii proaspete de bovine și supus fermentației, în condiții statice, timp de 6 zile, la 32°C.	3 5 7 9
Procedeul conform invenției are avantajul realizării pretratamentului termic și enzimatic într-un singur vas de reacție și fără etape intermediare de separare a substratului solid și a utilizării integrale, ulterioare, a hidrolizatului în fermentația producătoare de biogaz.	11
Invenția descrie un procedeu biotehnologic, de valorificare energetică a unor deșeuri lignocelulozice cerealiere, cuprinzând: etape de pretratare fizică și enzimatică a acestora, în scopul disponibilizării polimerilor glucidici, pentru a fi utilizați, sub forma unui hidrolizat, ca surse de carbon și energie, pentru fermentația anaerobă, producătoare de biogaz.	13 15
Procedeul conform invenției permite valorificarea potențialului de bioconversie în biogaz a unor deșeuri de natură lignocelulozică, rezultate de la recoltarea și prelucrarea cerealelor, cum sunt paiele și cocenii.	17 19
Pentru degradarea și transformarea de către microorganisme a compușilor celulozici și hemicelulozici din structura acestor deșeuri, este necesar ca acestea să fie pretratate, astfel încât polimerii și monomerii glucidici să devină accesibili atacului microbial.	21
Rezistența materialelor lignocelulozice naturale la acțiunea diferiților agenți biologici denaturanți este determinată, în principal, de doi factori:	23
1) matricea de protecție, formată de lignină și hemiceluloză, în care sunt implantate fibrele de celuloză;	25
2) porțiunile cristaline, cu structură ordonată, din macromolecula celulozei naturale.	27
Prin procedeul propus în cadrul invenției, delignificarea, decristalinizarea și hidroliza parțială a materialului lignocelulozic se realizează prin combinarea unui tratament termic cu un tratament enzimatic.	29
În prima etapă, deșeurile lignocelulozice, mărunțite prin măcinare, se suspendă într-o cantitate minimă de apă, necesară pentru obținerea unei suspensii fluide și apoi sunt supuse unei degradări termice, cu abur sub presiune, prin autoclavare. Astfel, se realizează îmbibarea cu apă a țesuturilor vegetale, până la starea de supradilatate, diminuându-se atât rezistența mecanică a acestora, cât și rezistența față de acțiunea enzimelor hidrolizante.	31 33 35
În etapa a doua, materialul lignocelulozic prelucrat termic se tratează succesiv cu laccază și apoi cu un complex enzimatic hidrolitic conținând celulaze, β-glucanază și xilanază.	37
Tratamentul cu laccază, care este o fenol-oxidază, permite delignificarea parțială a materialului vegetal, mărinde astfel susceptibilitatea polimerilor glucidici la acțiunea enzimelor hidrolizante. Laccaza se adaugă în proporții variind între 0,5 și 15% față de greutatea materialului vegetal uscat, în suspensia apoasă a acestuia, cu pH = 5,5 (corectat la această valoare, dacă este cazul, cu o soluție de H ₂ SO ₄ sau NaOH 2%). Amestecul astfel obținut se incubează la temperatura de 55°C, sub agitare, timp de 10...20 h. Ulterior, acțiunea laccazei se stopează, enzima inactivându-se prin încălzirea amestecului de reacție timp de 15 min, la 95°C. Inactivarea laccazei este impusă de acțiunea denaturantă a acesteia față de enzimele din complexul celulozic-hemicelulozic ce urmează a fi folosite în continuare.	39 41 43 45 47

RO 125230 B1

1 Hidroliza parțială a substratului celulozic-hemicelulozic se realizează prin tratarea
2 suspensiei de material vegetal, delignificat, cu complexul enzimatic conținând enzimele
3 hidrolizante, specifice, menționate anterior. Preparatul enzimatic se adaugă în proporție de
4 1...20% față de greutatea materialului vegetal uscat și amestecul de reacție se incubează
5 la temperatura de 55...60°C, sub agitare, timp de 4...10 h. Rezultă astfel o suspensie densă,
6 cu aspect de șlam, cu un conținut în glucide reducătoare, solubile, fermentescibile, variind
7 între 25 și 30 mg/ml, corespunzător unui grad de hidroliză a substratului lignocelulozic variind
8 între 25 și 55%.

9 Hidrolizatul obținut se introduce în fermentația anaerobă, producătoare de biogaz,
10 utilizând, ca inocul, un consorțiu de microorganisme izolate din dejecții bovine proaspete,
11 cultivate pe medii specifice, ce realizează transformarea substraturilor glucidice în biogaz (în
12 principal, amestec de metan și dioxid de carbon).

13 Etapa de pretratare conduce la îmbunătățirea randamentului fermentațiilor anaerobe,
14 producătoare de biogaz, datorită faptului că furnizează direct glucide fermentescibile,
15 provenite din deșeuri lignocelulozice, cerealiere.

16 **Exemplul 1.** 5 g deșeuri cerealiere, lignocelulozice, măcinate la dimensiunea de
17 1...5 mm (paie de grâu și/sau de orz), se introduc într-un pahar Erlenmayer de 500 ml. Se
18 adaugă 80 ml apă și amestecul se autoclavează la 121°C, timp de 30 de min. Suspensia
19 rezultată se tratează apoi cu 0, 5 g laccază și se incubează la temperatura de 55°C, sub
20 agitare, timp de 15 h. Ulterior, amestecul de reacție se încălzește apoi la 95°C și se menține
21 la această temperatură timp de 15 min. În continuare, se răcește la 55°C și se adaugă 0,5 g
22 preparat enzimatic conținând celulozaze, β-glucanază și xilanază. Amestecul rezultat se
23 incubează la această temperatură timp de 10 h, sub agitare. Se obține astfel un hidrolizat
24 glucidic, sub forma unei suspensii cu aspect de șlam.

25 Analiza hidrolizatului prin metoda cu reactiv acid 3,5-dinitrosalicilic a evidențiat un
26 conținut de 27 mg/ml glucide reducătoare solubile, corespunzând unui grad de hidroliză a
27 materialului lignocelulozic de 53%.

28 **Exemplul 2.** 100 ml hidrolizat glucidic, obținut conform procedurii prezentat în
29 exemplul 1, s-a introdus într-un digester de 500 ml din sticlă, conținând 100 ml mediu de
30 cultivare a bacteriilor metanogene, cu compoziție specifică, alcătuită (g/l) din: K₂HPO₄ -
31 0,348, KH₂PO₄ - 0,227, NH₄Cl - 0,5, MgSO₄·7H₂O - 0,5, CaCl₂·2H₂O - 0,25, NaCl - 2,25,
32 NaHCO₃ - 0,85, FeSO₄·7H₂O - 0,002, rezazurin - 0,001, extract de drojdie - 2, cisteină
33 clorhidrat·H₂O - 0,3, Na₂S·9H₂O - 0,3, soluție microelemente - 1 ml, preparat în condiții
34 anaerobe. Acesta s-a inoculat cu 40 ml cultură de bacterii anaerobe, obținută prin cultivarea
35 timp de 7 zile a unui consorțiu de microorganisme izolate din dejecții proaspete de bovine.

36 Fermentația s-a efectuat în condiții statice, timp de 6 zile, la temperatura de 32°C.

37 Analiza gaz-cromatografică a gazelor rezultate după acest interval a evidențiat o
38 compoziție a acestora de (% mol): metan - 16,7, dioxid de carbon - 34,1, azot - 8, oxigen -
39 0,43, hidrogen sulfurat - 0,1. Aceasta dovedește că procesul de obținere a biogazului se află
40 în desfășurarea ultimelor 2 faze: acidogeneză (cu formare de CO₂) și metanogeneză (cu
41 formare de CH₄).

RO 125230 B1

Revendicare

1

Procedeu biotehologic, de obținere a biogazului pornind de la deșeurile cerealiere, lignocelulozice, **caracterizat prin aceea că** deșeurile cerealiere lignocelulozice se tratează succesiv, la 55...60°C, cu laccază în proporție de 0,5...15% față de greutatea deșeurilor și cu un preparat enzimatic conținând celulaze, β -glucanază și xilanază, în proporție de 1...20% față de greutatea deșeurilor, realizând un grad de hidroliză de 25...55%, rezultând astfel un hidrolizat glucidic, care este inoculat cu o cultură de bacterii anaerobe, izolate din dejectii proaspete de bovine și supus fermentației, în condiții statice, timp de 6 zile, la 32°C.

3

5

7

9



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 760/2013