



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00523

(22) Data de depozit: 10/07/2018

(41) Data publicării cererii:
30/01/2020 BOPI nr. 1/2020

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
INGINERIE ELECTRICĂ ICPE-CA,
SPLAIUL UNIRII NR.313, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE DELTA DUNĂRII,
STRADA BABADAG, NR.165, TULCEA, TL,
RO

(72) Inventatori:

• MATEESCU CARMEN,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.102, BL.48 A,
SC.1, ET.7, AP.26, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NICULA NICOLETA OANA,
STR. NICOLAE BĂLCESCU, NR.26, BL.50,
SC.A, AP.2, MIZIL, PH, RO;
• LUNGULESCU EDUARD MARIUS,
STR. PRELUNGIREA GHENCEA, NR.285A,
AP.3, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• TOROK LILIANA PARASCHIVA,
STR.1848, NR.17, BL.8, SC.C, ET.1, AP.7,
TULCEA, TL, RO;
• TOROK ZSOLT, STR.1848, NR.17, BL.8,
SC.C, ET.1, AP.7, TULCEA, TL, RO

(54) PROCEDU DE PRETRATARE ENZIMATICĂ A BIOMASEI
ALGALE PENTRU PRODUCERE DE BIOGAZ

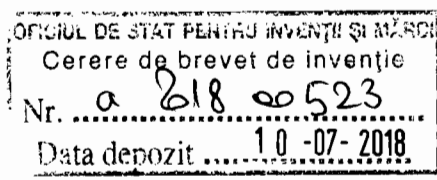
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de pretratare a biomasei algale utilizată ca substrat de fermentare în reactoare anaerobe pentru producerea de biogaz. Procedeu, conform invenției, constă în expunerea biomasei algale *Ulva intestinalis*, timp de 24 h, la acțiunea biologică a unui amestec enzimatic secretat de șase tipuri de fungi filamentoși din speciile *Trichoderma reesei*, *Trichoderma versicolor*, *Penicillium chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Chaetomium*

thermophile și *Myrothecium verrucaria*, pregătit prin cultivarea în soluție nutritivă de săruri, și inocul de tip dejecții de vite, într-o încălzită termostată la temperatura de 27...29°C și umiditate relativă de 90%, rezultând un amestec de substrat organic tratat enzimatic condiționat, care reduce timpul de fermentare și crește producția de biogaz în procesele de fermentare anaerobă.

Revendicări: 1





Procedeu de pretratare enzimatică a biomasei algale pentru producere de biogaz

Prezenta invenție se referă la un procedeu de pretratare enzimatică a biomasei algale utilizată ca substrat de fermentare în reactoarele anaerobe pentru producere de biogaz. Procedeu de pretratare din prezenta invenție are ca scop desfacerea structurilor macromoleculare compacte de carbohidrați (celuloză și hemiceluloze) din biomasa algală sub acțiunea unui amestec de enzime hidrolitice secretate de speciile fungice *Trichoderma reesei*, *Trichoderma versicolor*, *Penicillium chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile* și *Myrothecium verrucaria*, facilitând astfel accesul bacteriilor fermentative anaerobe la fibrele celulozice greu biodegradabile, reducând timpul de fermentare și crescând producția de biogaz în procesele de fermentare anaerobă.

Se cunoaște faptul ca, biomasa algală este considerată la ora actuală cea mai promițătoare bioresursă pentru producția de biocombustibili de diverse tipuri (bioetanol, biodiesel, biogaz), datorită productivității mari într-un timp de creștere foarte scurt comparativ cu biomasa terestră, lipsei competiției pentru terenurile agricole dar mai ales conținutului bogat în celuloză și hemiceluloze. Având în vedere că nivelul de lignină din alge este foarte redus, pregătirea substratului algal pentru producerea de biocombustibili nu necesită tratamente mecanice costisitoare de mărunțire, algele fiind mult mai susceptibile pentru hidroliza prin conținutul ridicat de apă. În plus, balanța energetică a sistemelor de biogaz din alge este superioară sistemelor de producere biodiesel din alge, în primul rând deoarece sistemele de biogaz utilizează resurse umede dar și pentru faptul că pentru producerea de biogaz nu este necesară extragerea uleiurilor, procedură ce se impune pentru producerea de biodiesel.

Există unele impedimente care afectează în mod negativ eficiența procesului de producere a biogazului. Pereții celulelor algale au în componența lor macromolecule cu biodegradabilitate și/sau biodisponibilitate redusă precum celuloza și hemiceluloze, structuri care sunt greu accesibile bacteriilor fermentative, prelungind astfel etapa de hidroliză în procesul de fermentare (etapa determinantă de viteză). Prin urmare, timpul de fermentare este prelungit în mod neeconomic, iar producția de biometan este îngreunată, pereții rezistenți ai celulelor de alge împiedicând accesul bacteriilor la compușii organici nutritivi din citoplasmă [Passos, 2014]. În acest context, în vederea solubilizării biomasei algale, a îmbunătățirii gradului de descompunere a materiei organice în bioreactoarele anaerobe și implicit a producției de biogaz, tehnicile de pretratare sunt o etapă necesară în procesele de biorafinare a biomasei algale [Hom-Diaz, 2016].

Se cunosc numeroase procedee de pretratare a biomasei algale, ele fiind clasificate în principalele patru categorii: termice, mecanice, chimice și biologice. Până de curând, pretratarea termică și mecanică au fost pe larg studiate și utilizate, ele fiind considerate ca cele mai eficiente în ruperea structurilor pereților celulari ai algelor. Tehnicile termice sunt cele care au condus la generarea de energie netă care este superioară consumurilor energetice în procesele de biorafinare, fiind totuși dependente de tipul biomasei algale utilizate [Schwede, 2013]. În schimb, tehnicile de pretratare mecanică sunt mai puțin dependente de materialul algal, dar necesită consumuri energetice mult mai mari comparativ cu metodele termice, chimice și biologice [Lee, 2012]. Metodele de pretratare chimică sunt mult mai puțin utilizate decât cele termice și mecanice dar s-au dovedit a fi eficiente, în special în combinație cu metodele termice [Mendez, 2014]. Totuși, utilizarea substanțelor chimice are dezavantajul că poate contamina produșii finiți și poate influența echilibrul biochimic, precum și aciditatea

mediului de fermentare, în cazul producerii de biogaz. Anumite substanțe chimice utilizate în pretratarea biomasei algale pot fi inhibitoare sau chiar toxice pentru microorganismele fermentative, reducând sau compromițând total producția de biogaz din bioreactoarele anaerobe.

Pretratarea biologică prin intermediul enzimelor secretate de diverse microorganisme este o tehnică promițătoare care poate să îmbunătățească hidroliza structurilor algale, fiind în același timp o metodă economică, cu consumuri energetice scăzute [Ehimen, 2013]. Diverse cercetări de laborator au evidențiat îmbunătățirea hidrolizei structurilor chimice recalcitrante din pereții celulari algali, pentru acest scop fiind utilizate enzime pure secretate de diverse specii de fungi, precum *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus ostreatus* etc. [Ashok, 2015].

Comparativ cu tehnicile de pretratare menționate, metodele enzimatic prezintă următoarele: au consum energetic redus, nu necesită utilizarea de substanțe chimice care pot avea efect inhibitor asupra populațiilor bacteriene fermentative, se realizează în condiții blânde de mediu.

Cercetările experimentale au arătat că în cazul producerii de biogaz din biomasa algală, rezultate de biodegradabilitate mai bune se înregistrează prin utilizarea unui amestec de diferite tipuri de enzime, față de utilizarea unei singure specii. [Ehimen, 2013] Aceasta se explică printr-un comportament de biodegradare în lanț, în care hidroliza unui component îmbunătățește gradul de biodisponibilitate al altor componenți care urmează a fi hidrolizați [Passos, 2014].

În procesele de pretratare enzimatică aplicate până în prezent se utilizează în special enzime pure, selectate în funcție de compoziția biomasei algale în celuloză, hemiceluloze, pectine, glicoproteine, lignina etc. [C.Y.Chen, 2013]. Enzimele cel mai frecvent utilizate în tratarea biomasei algale sunt enzimele comerciale α -amilaza, amilglucozidaza, celulaza, xilanaza, lipaza și proteaza [Ehimen, 2013]. S-a arătat că prin utilizarea unui amestec de enzime comerciale se obține un potențial de biometan al biomasei algale mai bun decât prin utilizarea unei enzime singulare specifice unui anumit substrat [Passos, 2015].

Soluțiile tehnice de pretratare cunoscute prezintă unele dezavantaje, dintre care pot fi subliniate următoarele:

- Metodele mecanice prezintă costuri de investiție și de operare ridicate precum și consumuri energetice ridicate;
- Metodele termice prezintă consumuri energetice ridicate precum și riscul de îngroșare a probei de biomasă algală prin evaporarea apei, afectând conținutul de solide totale și implicit procesul de fermentare anaerobă; în plus, unele metode termice (metode hidrotermice, metode cu aburi) prezintă costuri de investiție ridicate;
- Metodele chimice prezintă riscul de contaminare a probei cu substanțe chimice nedorite, riscul de formare inhibitori precum și riscul de modificare a acidității mediului de fermentare;
- Metodele enzimatic cu utilizarea de enzime pure prezintă costuri de materiale ridicate și necesită condiții de lucru sterile pentru evitarea contaminării cu alte specii biologice.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu de pretratare enzimatică a substratului de fermentare de tip biomasă algală, prin expunerea probei de biomasa algală, pe o durată de 24 ore, înainte de efectuarea testelor de fermentare anaerobă, la acțiunea biologică a unui amestec enzimatic secretat de șase tipuri de fungi

filamentoși din speciile *Trichoderma reesei*, *Trichoderma versicolor*, *Penicillium chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile* și *Myrothecium verrucaria*, în vederea îmbunătățirii hidrolizei compușilor recalcitranți din pereții celulelor algale și reducerii timpului de fermentare, concomitent cu creșterea potențialului de biogaz al substratului algal. Amestecul enzimatic este pregătit prin cultivarea în soluție nutritivă de săruri a speciilor de fungi *Trichoderma reesei*, *Trichoderma versicolor*, *Penicillium chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile* și *Myrothecium verrucaria*, speciile fungice utilizate având un nivel de maturitate mediu, adică 14 zile de la data însămânțării, asigurându-se astfel culturi tinere, dar în același timp suficient de active, culturile fiind aplicate substratului algal înainte de maturizarea lor completă în vederea menținerii unei activități biochimice superioare.

Procedeul de pretratare enzimatică, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate prin aceea că utilizează un amestec enzimatic secretat de șase tipuri de fungi filamentoși din speciile *Trichoderma reesei*, *Trichoderma versicolor*, *Penicillium chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile* și *Myrothecium verrucaria*, cultivate și crescute pe o durată totală de 14 zile; amestecul de fungi se obține prin adăugarea în fiecare cultură a câte 10 ml apă distilată, iar soluțiile obținute se agită ușor pentru dispersarea sporilor iar peste aceste soluții se adaugă 500 ml soluție nutritivă obținută prin dizolvarea în apă distilată a următoarelor substanțe, indicate în metoda descrisă în standardul SR CEI 68-2-10: KH_2PO_4 0,7 g/l, K_2HPO_4 0,3 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, NaNO_3 2 g/l, KCl 0,5 g/l, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/l, zaharoză 30 g/l; un volum de 50 ml amestec enzimatic fungic astfel realizat se adaugă în substratul organic de fermentare, reprezentat de 50 ml biomasa algală *Ulva intestinalis* și 25 ml inocul de tip dejecții de vite; volumul total de 125 ml substrat organic se menține timp de 24 ore într-o incintă termostată la temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ și umiditatea relativă de 90%; după condiționare amestecul de substrat organic tratat enzimatic se introduce într-un recipient de sticlă brună având volumul de 500 ml, închis etanș cu dop de cauciuc butiric după evacuarea aerului din interior prin purjare cu argon timp de 2 minute în substrat și 1 minut în spațiul de deasupra substratului; vasul de sticlă se conectează, prin intermediul unui tub de polietilenă, la un balon de colectare biogaz având volumul de 5 litri, recipientul de sticlă fiind apoi condiționat la temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ într-un incubator, pe o durată totală de fermentare anaerobă de 30 zile; în paralel cu acest experiment, un volum egal de substrat organic de fermentare, precum cel utilizat în descrierea anterioară, adică 125 ml, reprezentat de 50 ml biomasă algală, 25 ml inocul de tip dejecții de vite și 50 ml soluție nutritivă de săruri, dar fără adaos de amestec enzimatic fungic, se menține în aceleași condiții de temperatură și umiditate relativă precum proba de biomasă tratată enzimatic, timp de 24 ore în incinta termostată, după care este supus experimentelor de fermentare anaerobă într-un recipient de sticlă precum cel descris anterior, în regimul termic din incubator la temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, astfel încât evaluarea acțiunii amestecului enzimatic asupra producției de biogaz din cele două vase de fermentare, pe durata totală de fermentare de 30 zile, să poată fi determinată prin teste comparative de producție de biogaz și compoziție de metan (potențial de biometan), la duratele de fermentare de 14, 22 și 30 zile.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Procedeul de pretratare enzimatică cu amestec de fungi în soluție nutritivă este economic din punct de vedere al costurilor de materiale și consumurilor energetice;

- Nu necesită achiziția de enzime pure, speciile fungice selectate pentru realizarea amestecului enzimatic fiind capabile să producă *in vivo* enzimele necesare degradării componentelor peretelui celular în biomasa algală;
- Durata de expunere a biomasei algale la acțiunea enzimelor fungice este relativ scurtă, fără a exista riscul de îngroșare a substratului de biomasă algală prin evaporare;
- Amestecul nutritiv de enzime fungice nu conține substanțe chimice care ar putea dăuna microorganismelor fermentative;
- Metoda de pretratare cu amestec de enzime poate fi aplicată atât în laboratoare de cercetare, precum și în aplicații la scară industrială, fără a necesita condiții sterile de lucru;
- Speciile fungice sunt ieftine, ușor de procurat și ușor de menținut prin repicare, utilizând metode microbiologice specifice.

În continuare se dă un exemplu de realizare a invenției, pentru un procedeu de pretratare enzimatică a biomasei algale de tip macroalge din specia *Ulva intestinalis*, prelevate din Rezervația Biosferei Delta Dunării. Amestecul enzimatic pentru pretratarea probei de biomasă algală s-a realizat prin cultivarea în soluție nutritivă de săruri a următoarelor șase specii de fungi existente în micoteca institutului: *Trichoderma reesei*, *Trichoderma versicolor*, *Penicillium chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Chaetomium thermophile* și *Myrothecium verrucaria*. Mediul de cultură a fost preparat într-un vas Erlenmeyer de 1000 ml, dizolvând într-un volum de apă distilată de 1000 ml următoarele cantități de substanțe chimice: 0,7 g KH_2PO_4 , 0,3 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g NaNO_3 , 0,5 g KCl, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ și 30 g zaharoză. Suspensia de amestec enzimatic fungic s-a obținut prin inocularea a câte 10 ml suspensie de *Trichoderma reesei*, 10 ml suspensie de *Trichoderma versicolor*, 10 ml suspensie de *Penicillium chrysosporium*, 10 ml suspensie de *Fusarium solani*, 10 ml suspensie de *Chaetomium thermophile* și 10 ml suspensie de *Myrothecium verrucaria* în 500 ml soluție nutritivă de săruri. Amestecul enzimatic fungic în suspensie a fost utilizat pentru pretratarea enzimatică, pe o durată de 24 ore, a unui volum de biomasă algală de 50 ml, inoculată cu 25 ml inocul de tip dejecții de vite și diluată cu 50 ml soluție nutritivă de săruri ce conțin speciile fungice menționate, pretratarea realizându-se înainte de efectuarea testelor de fermentare anaerobă. În timpul pretratarii enzimatică, proba de biomasă algală a fost menținută în contact cu amestecul enzimatic fungic, timp de 24 ore, într-un pahar Berzelius de 250 ml, amplasat într-o încălzită termostată, la temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ și umiditatea relativă de 90%. În paralel cu acest experiment, a fost pregătită o probă martor astfel: un volum de 50 ml biomasă algală inoculată cu 25 ml inocul de tip dejecții de vite a fost diluat cu un volum de 50 ml soluție nutritivă de săruri fără amestec fungic și a fost condiționat în incinta termostată, în aceleași condiții de temperatură și umiditate precum proba de biomasă algală pretratată enzimatic. După finalizarea duratei de pretratare de 24 ore, cele două probe de biomasă algală diluate cu amestec enzimatic fungic în suspensie (proba pretratată), respectiv cu soluție nutritivă de săruri (proba martor), și inoculate cu material de inocul de tip dejecții de vită, în raportul volumetric biomasă algală : inocul de 1 : 0,5, au fost transvazate în vase de sticlă brune, fiecare vas având un volum de 500 ml, au fost închise etanș cu dopuri de cauciuc butiric fixate cu bandă siliconică, volumul de aer existent în sticle fiind evacuat prin purjare cu argon timp de 2 minute în substrat și 1 minut în spațiul de deasupra substratului. Vasele de sticlă au fost conectate prin intermediul unui furtun de polietilenă de 4 mm la câte un

recipient de stocare biogaz cu volumul de 5 litri și au fost introduse în incubator, la temperatura de $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, unde au fost menținute în regim termic mezofil pe o durată totală de 30 zile. Volumele cumulative de biogaz generat prin fermentarea anaerobă a biomasei algale inoculate au fost măsurate la duratele de fermentare de 14, 22 și 30 zile, prin metoda dezlocuirii. Concentrația de metan din biogaz a fost măsurată prin metoda cromatografică, cu ajutorul unui cromatograf de gaze Varian 450-GC. Pe baza măsurătorilor de volum de biogaz și concentrație de metan pentru biogazul generat de proba de biomasă pretratată enzimatic, respectiv de proba martor, a fost evaluat efectul pretratării enzimatice fungice asupra probei de biomasă algală. Rezultatele măsurătorilor au indicat o creștere a volumului cumulat de metan în biogaz, la 30 zile, de la 235 ml de metan în biogaz pentru proba martor, la 430 ml pentru proba de biomasă algală pretratată enzimatic, ceea ce reprezintă o creștere a producției de metan cu 83%. Concentrația de metan în biogaz, pentru o durată de fermentare de 30 zile, a crescut de la 24% CH_4 pentru proba martor, la 59% CH_4 pentru proba tratată enzimatic. Aceasta se datorează efectului stimulativ al enzimelor secretate de speciile fungice selectate asupra biodegradabilității structurilor organice compacte din componența pereților celulari ai biomasei algale.

Invenția este destinată activităților de cercetare fundamentală și aplicativă, precum și activităților industriale de valorificare a biomasei algale pentru producere de biogaz în reactoare de fermentare anaerobă, procedeul de pretratare enzimatică facilitând accesul bacteriilor fermentative anaerobe la fibrele celulozice greu biodegradabile, reducând timpul de fermentare și contribuind la creșterea producției de biogaz în procesele de fermentare anaerobă prin îmbunătățirea biodegradabilității materiei organice.

Invenția se aplică probelor de biomasă algală de tip macroalge, alge filamentoase și microalge care sunt folosite ca substrat organic de fermentare în reactoarele de biogaz.

Revendicare

Procedeu de pretratere enzimatică a biomasei algale utilizată ca substrat de fermentare în reactoarele anaerobe pentru producere de biogaz, caracterizat prin aceea că utilizează o suspensie de amestec enzimatic fungic obținută prin inocularea a câte 10 ml suspensie de *Trichoderma reesei*, 10 ml suspensie de *Trichoderma versicolor*, 10 ml suspensie de *Penicillium chrysosporium*, 10 ml suspensie de *Fusarium solani*, 10 ml suspensie de *Chaetomium thermophile* și 10 ml suspensie de *Myrothecium verrucaria* în 500 ml soluție nutritivă de săruri, 50 ml din amestecul enzimatic fungic astfel preparat fiind utilizat pentru pretraterea enzimatică a unui volum de 50 ml biomasă algală inoculată cu 25 ml inocul de tip dejecții de vite, pretraterea realizându-se timp de 24 ore, în incintă termostată, la temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ și umiditatea relativă de 90%, înainte de efectuarea testelor de fermentare anaerobă; o probă martor reprezentată de un volum de 50 ml biomasă algală inoculată cu 25 ml inocul de tip dejecții de vite, diluată cu un volum de 50 ml soluție nutritivă de săruri fără amestec fungic, este condiționată în incinta termostată, în aceleași condiții de temperatură și umiditate precum proba de biomasă algală pretrată enzimatic; după pretratere și condiționare, probele de biomasă algală, pretrată cu amestec enzimatic fungic, respectiv proba martor, sunt fermentate anaerob în regim termic mezofil, la $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 30 zile, în vase de sticlă brună, închise etanș cu dopuri de cauciuc butiric și conectate la recipienti de stocare biogaz cu volumul de 5 litri, volumele cumulative de biogaz generat prin fermentarea anaerobă a biomasei algale inoculate fiind măsurate și evaluate comparativ la duratele de fermentare de 14, 22 și 30 zile prin metoda dezlocuirii, potențialul de biometan fiind evaluat prin determinarea concentrației de metan din biogaz, prin metoda cromatografică.