



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00004

(22) Data de depozit: 06.01.2009

(41) Data publicării cererii:
28.10.2011 BOPI nr. 10/2011

(71) Solicitant:
• ASOCIAȚIA CENTRUL DE
BIOTEHNOLOGII MICROBIENE,
BD. MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• JURCOANE ȘTEFANA, STR.BODEȘTI
NR.5, BL.K8, SC.A, ET.5, AP.24,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• DIGUȚĂ CAMELIA,
STR. TÂRGU DIN VALE NR. 68, BL. P20,
SC. C, AP. 1, PITEȘTI, AG, RO;

• MATEI RĂDOI FLORENTINA,
STR.23 AUGUST NR.9, BL.U4, SC.3, AP.22,
OTOPENI, IF, RO;
• SIMION VASILICA, STR.BREAZA NR.7,
BL.V22A, SC.1, AP.2, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• TCACENCO LUMINIȚA, STR. EDUCAȚIEI
NR.35, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• MANOLIU ALEXANDRU, STR.METEOR
NR.5A, ET.3, AP.20, IAȘI, IS, RO;
• ISRAEL ROMING FLORENTINA,
STR.HAGI GHIȚĂ NR.77, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI COMPLEX ENZIMATIC
HIDROLITIC CU O TULPINĂ DE *TRICHODERMA REESEI***

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui complex enzimatic hidrolitic, utilizat pentru degradarea materialelor lignocelulozice, producerea de combustibili din surse regenerabile etc., prin cultivarea submersă a 10% inocul vegetativ de *Trichoderma reesei* pe un mediu de cultură conținând 2% uruială de porumb, 1% șrot de soia, 0,3% azotat de sodiu, 0,2% fosfat acid de potasiu, 0,1% sulfat de magneziu, 0,05% clorură de potasiu, 0,01% sulfat feros, la 30...31°C, sub

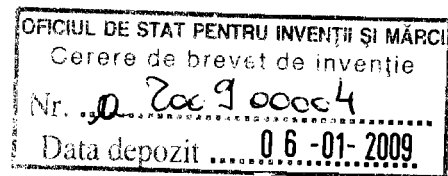
agitare la 220 rpm, după care biomasa se separă și lichidul enzimatic se concentrează prin ultrafiltrare, pe un modul cu un randament al activității amilolitice de 80...82%, celulozolitice de 88...90% și xilanazice de 86...88%, rezultând un concentrat enzimatic ce se precipită cu sulfat de amoniu 70%, rezultând un preparat enzimatic brut.

Revendicări: 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).



4



Descriere inventie

Inventia se refera la un procedeu de obtinere a unui preparat enzimatic cu activitate celulozolitica din culturi de *Trichoderma reesei*, capabil sa hidrolizeze celuloza, hemiceluloza, amidonul, xilanul si alte polizaharide din plantele energetice(diferite varietati de porumb, griu, paie coceni, tulpini de Miscanthus giganteus etc.utilizate in fermentatia anaeroba in productia de biogaz.

In prezent, sunt cunoscute si alte procedee de obtinere a preparatelor celulozolitice prin cultivarea microorganismelor, in sistem discontinuu pe medii de cultura cu alte surse de carbon cum ar fi: glucoza, zaharoza, carboximetilceluloza etc. sau de azot: extract de porumb, saruri de amoniu etc., care induc formarea unui anumit tip de complex enzimatic continand celulaze si hemicelulaze.

Este cunoscut faptul ca hidroliza completa a resturilor celulozice din plante si lemn este un proces dificil, nerezolvat pina in prezent, in special datorita structurii complexe a celulozei, dar si asocierii ei cu alti compusi (in special lignina). Pentu hidroliza acestora exista procedee fizice, chimice, enzimatic sau combinate. In prezent se utilizeaza diverse preparate enzimatic care, in functie de enzimele componente, realizeaza diferite grade de hidroliza a materialelor lignocelulozice.

Problema pe care o rezolva inventia de fata este de a stabili succesiunea etapelor de procedeu, precum si a conditiilor tehnice de realizare a acestora astfel incit sa se obtina un preparat enzimatic hidrolitic complex, capabil sa degradeze componentele existente in plantele energetice, astfel incat, glucidele rezultate in urma hidrolizei sa conduca la marirea randamentului in biogaz, bioetanol.

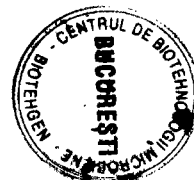
Procedeul, conform inventiei, consta in aceea ca cuprinde urmatoarele etape:

-cultivarea submersa, in sistem discontinuu a 10% , in volum, de inocul vegetativ de *Trichoderma reesei* inregistrata in Colectia de Microorganisme a Centrului de Biotehnologii Microbiene-Bucuresti sub nr. 28 pe un mediu de cultura ce contine, 2,0 % uruiala de porumb (stiulete de porumb tocat integral pina la dimensiunea particulei de 0,5-1mm), 1,0% srot de soia, 0,3% azotat de sodiu, 0,2 % fosfat acid de potasiu, 0,1% sulfat de magneziu, 0,05% clorura de potasiu, 0,01% sulfat de feros, procente in volum, in conditii de temperatura: 30-31°C, agitare constanta la 220 rpm, aer si presiune variabile, astfel incat continutul de oxigen dizolvat in mediu sa nu scada sub 50% timp de 96 ore de la inoculare.

-prelucrarea mediului de cultura care include separarea biomasei si concentrarea prin ultrafiltrare a lichidului enzimatic pe un modul cu un randament al activitatii amilolitice de 80-82%, celulozolitice de 88-90% si xilanazice de 86-88%, rezultand un concentrat enzimatic din care la faza de conditionare prin precipitare cu sulfat de amoniu, la 70% saturatie, se obtine preparatul enzimatic brut de *Trichoderma reesei*, la un randament de 33% , de culoare alb gri, netoxic, cu activitate celulazica, amilazica si xilanazica dupa cum urmeaza:

- activitate celulazica specifica de 2,1 U/mg proteina
- activitate xilanazica specifica de 17,35 U/mg proteina
- activitate amilazica specifica de 2,66 U/mg proteina

Preparatul enzimatic obtinut este activ in domeniul de pH 5,5-6,5 si temperatura: 35-50°C.



SA

Prin aplicarea inventiei se obtine avantajul sintetizarii unui preparat enzimatic complex, ce contine fractiuni enzimatic active pentru hidroliza concomitenta a celulozei, xilanului si amidonului (pina la maltoza, glucoza) din materiale lignocelulozice (coceni, porumb integral, faina de porumb, paie etc.) utilizate in productia de biogaz (inainte de fermentatia anaeroba).

Se prezinta, in continuare, un exemplu de realizare a inventiei.

Exemplu

a) Cultivarea submersa in sistem discontinuu a tulpinii de *Trichoderma reesei*, inregistrata in Colectia de Microorganisme a Centrului de Biotehnologii Microbiene Bucuresti, sub nr.28.

Intr-un bioreactor de 0,01 m³, cu 0,007...0,008 m³ mediu de cultura care contine, in procente de volum, 2,0 % uruiala de porumb(stiulete de porumb tocat integral pina la dimensiunea particulei de 0,5-1mm), 1,0% srot de soia, 0,3% azotat de sodiu, 0,2 % fosfat acid de potasiu, 0,1% sulfat de magneziu, 0,05% clorura de potasiu, 0,01% sulfat de feros, cu pH-ul initial de 5,5, se insaminteaza un inocul vegetativ de *Trichoderma reesei*, in proportie de 10%(inoculul s-a dezvoltat pe mediu PDB (Potato Dextrose Broth), timp de 48 ore, cu agitare de 220 rpm la 28°C. Cultivarea se efectueaza timp de 90-96 de ore (agitare 220 rpm), aerare si presiune variabile pe parcursul bioprocesului si anume: 1,0-1,2 l aer/min, astfel incat, continutul in oxigen sa nu scada sub 50%.

Preinoculul a constat dintr-o suspensie de spori a tulpinii fungice *Trichoderma reesei* utilizate, bine dezvoltate pe mediu PDA(Potato Dextrose Agar), timp de 7 zile la 28°C.

b) Prelucrarea mediului de cultura

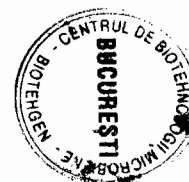
La sfirsitul bioprocesului dupa 90-96 ore cultivare a producatorului se efectueaza prelucrarea mediului de cultura in urmatoarele faze:

b1) Separarea biomasei de *Trichoderma reesei* prin filtrare pe filtru Nutsche, cu adaugare de adjuvant de filtrare 0,1%(Perlita), viteza medie de filtrare 30 l/m²/h

b2) Concentrare prin ultrafiltrare a lichidului de cultura rezultat din faza de separare a biomasei, utilizand un modul Pellicon Standard(Millipore Corp) echipat cu o caseta de membrane polisulfonice de tip PTGC 00005(limita de excludere NMWL-10 kDa), realizind o concentrare de pana la 5...10 ori a filtratului cu un randament de 82...90%, rezultand concentratul enzimatic hidrolitic lichid.

b3) Conditionarea concentratului enzimatic hidrolitic lichid se realizeaza prin precipitare cu sulfat de amoniu, la 70% saturatie; precipitatul se separa prin centrifugare si se usuca sub vid, obtinandu-se preparatul enzimatic brut, sub forma unei pulberi de culoare alb- gri, netoxic, cu activitate celulazica specifica(2,1U/mg), amilazica specifica(2,66U/mg) si xilanazica specifica(17,35U/mg), activ in domeniul de pH 5,5-6,5 si temperatura: 35-50°C, lipsit de toxicitate la testele efectuate pe animale de ferma.

Produsul obtinut prin procedeul descris in inventie permite obtinerea unor preparate polienzimatice care contin in principal celulaze, amilaze, xilanaze, care pot fi utilizate la hidroliza plantelor energetice(in vederea obtinerii de biocombustibili cum ar fi biogazul sau bioetanolul) si in zootehnie la alcatuirea premixurilor.



S. P. Micu

Revendicare

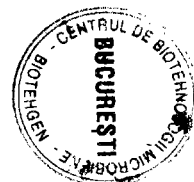
Procedeu de obtinere a unui preparat enzimatic hidrolitic (celulaze, amilaze, xilanaze) din culturi de *Trichoderma reesei*, caracterizat prin aceea ca, cuprinde urmatoarele etape:

-cultivarea submersa, in sistem discontinuu a 10% , in volum, de inocul vegetativ de *Trichoderma reesei* inregistrata in Colectia de Microorganisme a Centrului de Biotehnologii Microbiene-Bucuresti sub nr. 28 pe un mediu de cultura ce contine, 2,0 % uruiala de porumb (stiulete de porumb tocat integral pina la dimensiunea particulei de 0,5-1mm), 1,0% srot de soia, 0,3% azotat de sodiu, 0,2 % fosfat acid de potasiu, 0,1% sulfat de magneziu, 0,05% clorura de potasiu, 0,01% sulfat de feros, procente in volum, in conditii de temperatura: 30-31⁰C, agitare constanta la 220 rpm, aer si presiune variabile, astfel incat continutul de oxigen dizolvat in mediu sa nu scada sub 50% timp de 96 ore de la inoculare.

-prelucrarea mediului de cultura care include separarea biomasei si concentrarea prin ultrafiltrare a lichidului enzimatic pe un modul cu un randament al activitatii amilolitice de 80-82%, celulozolitice de 88-90% si xilanazice de 86-88%, rezultand un concentrat enzimatic din care la faza de conditionare prin precipitare cu sulfat de amoniu, la 70% saturatie, se obtine preparatul enzimatic brut de *Trichoderma reesei*, la un randament de 33% , de culoare alb gri, netoxic, cu activitate celulazica, amilazica si xilanazica dupa cum urmeaza:

- activitate celulazica specifica de 2,1 U/mg proteina
- activitate xilanazica specifica de 17,35 U/mg proteina
- activitate amilazica specifica de 2,66 U/mg proteina

Preparatul enzimatic obtinut este activ in domeniul de pH 5,5-6,5 si temperatura: 35-50⁰C.



S. M. C.