



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2010 01383**

(22) Data de depozit: **21.12.2010**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27.02.2015** BOPI nr. **2/2015**

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. **6/2012**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL DE CERCETARE-
DEZVOLTARE PENTRU PROTECȚIA
PLANTELOR,**
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN,** *STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*

• **ȘTEFAN AURORA LILIANA,**
*BD.ION IONESCU DE LA BRAD NR.8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **LUPU CARMEN,** *INTRAREA BĂRSEI
NR.5, BL.G 3, SC.A, ET.2, AP.24,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**US 5780023; US 2004/0018274 A1;
US 6217916 B1**

(54) **BIOPREPARAT PENTRU PROTECȚIA PLANTELOR
ÎMPOTRIVA AGENȚILOR FITOPATOGENI ȘI PROCEDEU DE
OBȚINERE A ACESTUIA**



RO 127526 B1

1 Prezenta invenție se referă la un biopreparat pentru protecția plantelor împotriva
2 agenților fitopatogeni, în special, împotriva ciupercilor fitopatogene și toxigene, și la un procedeu
3 de obținere a acestuia, pe bază de drojdii antagoniste, destinate producerii de bioetanol prin
4 fermentația alcoolică a hidrolizatorilor de cereale, în special, a celor provenite din loturi
5 contaminate cu micotoxine, urmată de uscarea și condiționarea drojdiilor încapsulate, recuperate
6 după fermentația alcoolică.

7 Sunt cunoscute mai multe procedee de încapsulare a drojdiilor utilizate pentru
8 fermentația alcoolică, drojdiile încapsulate prezentând avantajul de a fi îndepărtate mai ușor
9 din mediul de fermentație.

10 **US 5070019** descrie un procedeu prin care drojdiile *Saccharomyces bayanus* și/sau
11 *Saccharomyces cerevisiae* sunt încapsulate în granule de alginat de calciu și apoi sunt
12 folosite pentru producerea de băuturi alcoolice. Procedeu descris implică adăugarea ames-
13 tecului de alginat de sodiu 0,5...5% - biomasă de drojdii, sub formă de picături extrudate
14 printr-un ac de seringă, într-o soluție de 0,5%...20% CaCl₂, întărirea granulelor prin menține-
15 rea, timp de 30...80 min, în soluția de CaCl₂, spălarea granulelor pentru 100...500 min, cu
16 apă, având maximum 5 g/l săruri, uscarea granulelor spălate la temperaturi de 10...50°C și
17 utilizarea respectivelor drojdii încapsulate pentru fermentație alcoolică. Procedeu de
18 încapsulare descris produce granule de dimensiuni relativ ridicate, de 1...3 mm, datorită
19 extrudării printr-un ac de seringă. În practică, sunt de preferat granule de drojdie de dimen-
20 siuni mai mici, pentru că acestea prezintă o suprafață mai mare de contact dintre lichidul de
21 fermentat și granulele cu drojdii încapsulate.

22 **US 6217916 B1** se referă la un procedeu de încapsulare a drojdiilor, cu formare de
23 granule de dimensiuni submilimetrice. Procedeu prevede o microemulsionare prealabilă, a
24 amestecului de (pre)polimer - drojdii de imobilizat, într-un ulei alimentar, urmat apoi de poli-
25 merizarea/gelifierea (pre)polimerului dintr-o microemulsie.

26 Toate aceste procedee produc drojdii care sunt imobilizate în rețeaua de alginat de
27 calciu, care le încapsulează. Imobilizarea celulelor de drojdie este favorizată de omogeniza-
28 rea inițială în soluțiile de alginat de sodiu. Soluțiile de alginat de sodiu sunt ușor acide,
29 întrucât la fabricarea alginatului din biomasă algală, tratarea cu hidroxid de sodiu urmărește
30 solubilizarea biopolimerului din pereții celulari și nu neutralizarea tuturor resturilor de acizi
31 uronici. Caracterul acid al soluției de alginat de sodiu determină modificarea înspre pozitiv
32 a încărcăturii electrice a suprafeței celulelor de drojdie, datorită caracterului amfoter al
33 resturilor de aminoacizi din proteinele peretelui celular. Celulele de drojdie încărcate pozitiv
34 sunt fixate de rețeaua de molecule de alginat, fiind apoi total imobilizate, prin formarea rețelei
35 tridimensionale de alginat reticulat cu ioni de calciu.

36 În cazul drojdiilor antagoniste, imobilizarea prezintă dezavantajul reducerii ratei de
37 multiplicare a celulelor, datorită constrângerilor sterice care inhibă procesele de diviziune
38 celulară prin înmugurire. Pentru drojdiile antagoniste agenților fitopatogeni, care sunt desti-
39 nate atât fermentației alcoolice, cât și realizării de produse pentru protecția plantelor, este
40 necesară multiplicarea biomasei concomitent cu desfășurarea proceselor fermentative, deci
41 sunt necesare procedee de încapsulare care să asigure în același timp dimensiuni de ordinul
42 sutelor de micrometri și o structură cu constrângeri sterice, minime, pentru celulele de drojdii
43 sechestrate prin încapsulare.

44 Prelucrarea ulterioară a acestor drojdii antagoniste încapsulate, recuperate după
45 fermentare, destinate fabricării de biopreparate de uz fitosanitar, implică și dezvoltarea unui
46 procedeu de uscare și de condiționare, prin amestecarea cu ingredientii de condiționare.

47 **US 2004/0018274 A1** descrie un procedeu de uscare a biomasei de drojdii recu-
48 perate după procesul de fermentație, prin care se asigură o rată ridicată de supraviețuire și
49 o bună reactivare metabolică. Prin acest procedeu, biomasa de drojdie este trecută succesiv
50 prin două tipuri de soluții, una care conține stabilizatori, de tipul trehalozei, maltitolului,

RO 127526 B1

manitolului, xilozei, și a doua, care conține agenți de reducere a activității apei, de tipul glicerolului, maltitolului și xilitolului, după care uscarea se face la maximum 30°C, într-un uscător de tip pat fluid. Pentru creșterea productivității, ar fi utilă utilizarea unor uscătoare cu o capacitate de uscare mai mare per unitatea de timp, așa cum sunt, de exemplu, uscătoarele prin pulverizare.

US 3962467 precizează însă clar o limită a temperaturii de uscare prin pulverizare, de maximum 55°C. Peste această temperatură, rata de supraviețuire a drojdiilor scade semnificativ. Întrucât uscarea prin pulverizare la temperaturi de sub 55°C nu determină reducerea suficientă a conținutului de apă, în cadrul procedurii protejată prin **US 3962467**, se utilizează un procedeu de uscare combinat, uscare prin pulverizare, continuată prin uscare în pat fluid. Particulele care rezultă prin acest ciclu de uscare au dimensiuni de peste 1 mm, dar mai mici de 1,7 mm.

La uscarea drojdiilor încapsulate, trebuie evitată agregarea granulelor de alginat, cu formarea de particule de dimensiuni mari, dificil de omogenizat cu ingredientii de condiționare. Uscarea în pat fluid poate determina o agregare semnificativă a granulelor de alginat, deci acest procedeu de uscare trebuie evitat pe cât posibil.

Uscarea granulelor de polimer hidrofil/alginat, care conțin drojdii (antagoniste) încapsulate, generează un produs cu o umectabilitate redusă, datorită caracterului hidrocoloid, rezultat dintr-o hidrofilicitate ridicată a (bio)polimerilor cu masa moleculară mare, utilizați pentru încapsulare (alginat), și a celor produși de drojdii (beta-glucani din peretele celular al drojdiilor). Unii dintre compuși utilizați uzual pentru creșterea ratei de supraviețuire a drojdiilor la uscare (trehaloză, maltitol, xilitol, glicerol) accentuează caracterul hidrocoloid, cu înrăutățirea umectabilității biopreparatului final.

Utilizarea finală a produsului, în aplicații de protecția plantelor cultivate împotriva agenților de dăunare, impune însă o umectabilitate ridicată. Procedeu de uscare trebuie deci să ducă la formarea unui produs cu o granulație mai mică de 1 mm și cu o umectabilitate superioară, asigurând, în același timp, o productivitate ridicată, cu supraviețuirea drojdiilor în cursul etapelor de uscare și de depozitare, și menținerea unei capacități ridicate de reactivare metabolică.

Umectabilitatea poate fi ameliorată și în cursul etapei de amestecare cu ingredientii de condiționare, prin adăugarea unor agenți de umectare și a unor surfactanți suplimentari. În afară de umectabilitate, compozițiile pe bază de drojdii antagoniste, utilizate în combaterea agenților fitopatogeni, trebuie să îndeplinească și alte criterii specifice utilizării ca produse de protecția plantelor, respectiv, stabilitate la păstrare, absența formării de pulberi potențial alergene la manipulare, suspendabilitate, timp redus de omogenizare, eventual capacitate de autosuspendare în apă, spumare redusă la amestecarea cu apă dură.

US 5780023 descrie o compoziție pe baza a două drojdii antagoniste: *Pichia guilliermondii* NRRL Y-18314 și *Hanseniaspora uvarum* NRRL Y-18527, care conține un agent purtător (amidon, silicagel, talc), combinat cu un agent de suspendare (tragacantă, gumă karaya, gumă carob, xantan, metilceluloză), la care se pot adăuga prezervanți, agenți umectanți, surfactanți, pentru realizarea unui biopreparat care să corespundă cerințelor utilizării practice. Agenții purtători asigură o bună supraviețuire a drojdiilor în timp, iar agenții de suspendare asigură o bună suspendabilitate, dar combinația drojdii - amidon - metilceluloză, de exemplu, generează materiale cu caracter hidrocoloid pronunțat, dificil de solubilizat în apă. Acțiunea agenților umectanți și a surfactanților este redusă, datorită durității crescute a apei folosite uzual pentru tratamentele în agricultură (care este, de obicei, apă de fântână, motiv pentru care testele produselor de protecția plantelor se fac cu apă dură standard). De asemenea, compoziția care se realizează trebuie să includă exclusiv agenți de umectare biocompatibili, pentru a nu afecta supraviețuirea în timp a drojdiilor condiționate.

RO 127526 B1

1 În cazul particular al compozițiilor pe bază de drojdii antagoniste, încapsulate în
granule de alginat submilimetrice, compoziția trebuie să asigure fixarea biopreparatului pe
3 materialul vegetal, pentru a evita spălarea acestuia de precipitați, rouă sau vânt, și
menținerea relativ constantă a activității apei, pentru a permite reactivarea metabolică a
5 drojdiilor și eliberarea acestora din matricea de încapsulare.

7 Biopreparatul pentru protecția plantelor împotriva agenților fitopatogeni, în special,
împotriva ciupercilor fitopatogene și toxigene, conform invenției, este constituit din:
18,5...20 părți de alginat de calciu, 7,5...7,7 părți de bicarbonat de sodiu, 3,2...3,3 părți acid
9 poliactic, 2,9...3,0 părți acid citric, 1,4...1,6 părți alcool polivinilic, 0,7...0,75 părți lecitină,
0,65...0,7 părți de stearat de calciu, 0,04...0,045 părți ascorbat de sodiu și cel puțin 10^8 ufc
11 de drojdii antagoniste, destinate producerii de bioetanol prin fermentația alcoolică a hidroliz-
zatorilor de cereale, per gram de compoziție.

13 Procedul de obținere a biopreparatului definit mai sus, pe bază de drojdii antago-
niste, destinate producerii de bioetanol prin fermentația alcoolică a hidrolizatorilor de cereale,
15 este alcătuit din următoarele etape: amestecarea a 800 ml soluție bicarbonat de sodiu 1 M
cu 200 ml de suspensie de drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae* L30b, concen-
17 trată, care conține în jur de 10^7 ufc drojdii /ml; adăugarea celor 1000 ml de suspensie de
drojdii în bicarbonat de sodiu 1 M peste 17,6 g acid alginic și solubilizarea acidului alginic
19 prin formarea de alginat de sodiu și eliberare de bioxid de carbon; formarea microgranulelor
sferice prin extrudarea suspensiei de celule de drojdie - alginat de sodiu printr-un ac bont,
21 la o rată constantă de 0,25 ml/min, realizată cu ajutorul unei pompe de tip seringă de 20 ml,
și sub acțiunea combinată a gravitației și a unui câmp electric format de un generator
23 electrostatic de picături, care generează o diferență de potențial electric de 6 kV, pe distanța
de 2,5 cm, între acul de formare a picăturilor și baia de coagulare, cu soluție de CaCb
25 0,25 M; menținerea timp de 30...35 min a granulelor în soluția de clorură de calciu, pentru
întărire; spălarea granulelor prin introducerea, timp de 15 min, în apă distilată; menținerea
27 granulelor de alginat cu drojdie încapsulată, până la utilizare, în soluție fiziologică Ringer, dar
nu mai mult de 48 h; omogenizarea granulelor cu hidrolizat din făină de cereale, grâu, orz
29 sau porumb, obținut în două etape, prin fluidificare și zaharificare, în proporție volumetrică
de 5 ml granule cu drojdii încapsulate la 95 ml hidrolizat din făină de cereale, conținând
31 150 g/l zaharuri fermentescibile, care poate fi contaminat cu micotoxine precum deoxi-
nivalenol, DON, peste limitele maxime admisibile; recuperarea, după fermentare, a drojdiilor
33 încapsulate, spălarea granulelor cu drojdie încapsulată cu soluție Ringer, în raport de 1:2,
pe o sită granulometrică de 30...60 mesh; amestecarea a 300 g de granule de alginat cu
35 drojdii încapsulate cu 1000 ml soluție de bicarbonat de sodiu 0,1 M și omogenizarea
suspensiei cu 0,75...0,85 g stearat de magneziu și 0,05...0,07 g ascorbat de sodiu; uscarea
37 suspensiei astfel rezultate pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu
aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20000 rpm a discului atomizor, la o
39 temperatură de intrare a agentului de uscare de 120...140°C și la o temperatură de ieșire a
agentului de uscare de 65...70°C; amestecarea a 28...28,5 g granule uscate cu 3,1...3,2 g
41 acid acrilic, 2,9...3,0 g acid citric, 1,4...1,6 g alcool polivinilic; dizolvarea separată a
0,7...0,75 g de lecitină în 5 ml de alcool etilic; granulara umedă a 36...36,3 g de amestec
43 conținând granule de alginat uscate cu 5 ml soluție alcoolică, preparată ca mai sus; uscarea,
timp de 4...5 h, a produsului rezultat ca urmare a granularii umede în uscător cu tăvi la
45 presiune normală și la o temperatură de maximum 30°C.

Compoziția de biopreparat are următoarele avantaje:

- 47 - nu formează pulberi potențial alergene, datorită structurii granulare;
- conține exclusiv agenți de condiționare biocompatibili, care nu afectează supravie-
- 49 țuirea drojdiilor;
- are o umectabilitate ameliorată sub acțiunea lecitinei și a stearatului;

RO 127526 B1

- prezintă capacitate ridicată de autosuspendare în apă, datorită sistemului efervescent;	1
- are o suspendabilitate superioară, care este asigurată de agenții de suspendare pe care-i conține, alcool polivinilic, sau care se formează la dizolvare, poliacrilatul de sodiu și citratul de sodiu;	3 5
- nu spumează, datorită creșterii semnificative a viscozității sub acțiunea combinată a poliacrilatului de sodiu și a alcoolului polivinilic;	7
- asigură o bună fixare de suprafața materialului vegetal, sub acțiunea aderentă, conjugată, a alcoolului polivinilic și a poliacrilatului de sodiu;	9
- formează pelicule pe suprafața resturilor vegetale pe care se aplică, în care apa este reținută de macromoleculele cu caracter hidrofil ridicat.	11
Procedeul de obținere a biopreparatului conform invenției prezintă următoarele avantaje:	13
- celulele de drojdie nu se fixează de rețeaua moleculelor de alginat, ci sunt respinse de acestea, întrucât au aceeași încărcătură electrică, negativă, ca urmare a suspendării inițiale într-o soluție cu pH bazic;	15
- celulele de drojdie, care nu sunt imobilizate, prezintă o mai mare libertate de mișcare și o mai mare libertate de diviziune;	17
- efervescenta blândă, rezultată la solubilizarea acidului alginic, determină o omogenizare foarte bună a moleculelor de alginat, cu expunerea acestora în întreaga masă de suspensie;	19 21
- granulele, care se formează, sunt de dimensiuni submilimetrice, datorită acțiunii de reducere a tensiunii superficiale de către moleculele de alginat, sub acțiunea câmpului electric;	23
- limitează tendința de aglomerare a granulelor de alginat de calciu, datorită repulsiei electrostatice dintre particulele cu aceeași sarcină, rezultată ca urmare a suspendării în mediu ușor bazic;	25 27
- reduce timpul de expunere a drojdiilor la temperaturi ridicate, ca urmare a turației ridicate a discului atomizor, și a efectului lubrifiant și de reducere a tensiunii superficiale, exercitat de stearatul de magneziu;	29
- asigură o rată bună supraviețuire a drojdiilor în timpul proceselor de uscare și de depozitare, datorită acțiunii protective a acidului ascorbic;	31
- asigură o umectabilitate bună a compoziției rezultate, ca urmare a structurii granulate, poroase, formată prin granulare umedă.	33
Se prezintă, în continuare, invenția pe larg.	35
Procedeul de încapsulare a drojdiilor antagoniste este alcătuit din următoarele etape:	
- amestecarea a 800 ml soluție bicarbonat de sodiu 1 M cu 200 ml de suspensie drojdie antagonistă <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L30b, concentrată, care conține în jur de 10^7 ufc drojdii/ml;	37 39
- adăugarea celor 1000 ml de suspensie de drojdii în bicarbonat de sodiu 1 M peste 17,6 g acid alginic și solubilizarea acidului alginic prin formarea de alginat de sodiu și eliberarea de bioxid de carbon;	41
- formarea microgranulelor sferice prin extrudarea suspensiei de celule de drojdie - alginat de sodiu printr-un ac bont, la o rată constantă de 0,25 ml/min, realizată cu ajutorul unei pompe de tip seringă de 20 ml, și sub acțiunea combinată a gravitației și a unui câmp electric format de un generator electrostatic de picături, care generează o diferență de potențial electric de 6 kV, pe distanța de 2,5 cm, între acul de formare a picăturilor și baia de coagulare cu soluție de CaCl_2 0,25 M;	43 45 47

RO 127526 B1

- 1 - menținerea, timp de 30...35 min, a granulelor în soluția de clorură de calciu, pentru
întărire;
- 3 - spălarea granulelor prin introducerea, timp de 15 min, în apă distilată;
- menținerea granulelor de alginat cu drojdie încapsulată, până la utilizare, în soluție
5 fiziologică Ringer, dar nu mai mult de 48 h;
- omogenizarea granulelor cu hidrolizat din făină de cereale, grâu, orz sau porumb,
7 obținut în două etape, prin fluidificare și zaharificare, în proporție volumetrică de 5 ml granule
cu drojdie încapsulate la 95 ml hidrolizat din făină de cereale, conținând 150 g/l zaharuri
9 fermentescibile, care poate fi contaminat cu micotoxine precum deoxinivalenol, DON, peste
limitele maxime admisibile.
- 11 Procedul de uscare și condiționare a drojdiilor încapsulate, recuperate după fermentare,
este alcătuit din următoarele etape:
- 13 - spălarea granulelor cu drojdie încapsulată cu soluție Ringer, în raport de 1:2, pe o
sită granulometrică de 30...60 mesh;
- 15 - amestecarea a 300 g de granule de alginat cu drojdie încapsulate cu 1000 ml soluție
de bicarbonat de sodiu 0,1 M și omogenizarea suspensiei cu 0,75...0,85 g stearat de
17 magneziu și 0,05...0,07 g ascorbat de sodiu;
- uscarea suspensiei astfel rezultată pe o instalație de uscare prin pulverizare, cu disc
19 atomizor și cu aer încălzit, ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20000 rpm a discului
atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 120...140°C și la o tempera-
21 tură de ieșire a agentului de uscare de 65...70°C;
- amestecarea a 28...28,5 g granule uscate cu 3,1...3,2 g acid acrilic, 2,9...3,0 g acid
23 citric, 1,4...1,6 g alcool polivinilic;
- dizolvarea separată a 0,7...0,75 g de lecitină în 5 ml de alcool etilic;
- 25 - granularea umedă a 36...36,3 g de amestec, conținând granule de alginat uscate,
cu 5 ml soluție alcoolică, preparată ca mai sus;
- 27 - uscarea, timp de 4...5 h, a produsului rezultat ca urmare a granulării umede în
uscător cu tăvi la presiune normală și la temperatură de maximum 30°C.
- 29 Se prezintă, mai jos, un exemplu de realizare a invenției.
- Exemplu.** Se prepară 200 ml de suspensie de drojdie antagonistă, de exemplu,
31 *Saccharomyces cerevisiae* L30b, conform procedeelelor cunoscute, cum ar fi, de exemplu,
reluarea biomasei crescute la suprafața unui mediu agarizat sau concentrarea biomasei
33 crescute pe mediu lichid aerat și agitat. Numărul de celule de drojdie se măsoară prin
numărare pe o lamelă citometrică sau prin determinarea densității optice la 600 nm
35 (considerând $DO_{600}=1$ pentru 3×10^7 ufc drojdie/ml). Se aduc cei 200 ml de suspensie de
drojdie la o concentrație de 10^7 ufc drojdie /ml și se amestecă cu 800 ml soluție bicarbonat
37 de sodiu 1 M. Cei 1000 ml de suspensie de drojdie în bicarbonat de sodiu 1 M se aduc peste
17,6 g acid alginic și se solubilizează acidului alginic prin formarea de alginat de sodiu și
39 eliberare de bioxid de carbon.
- Granulele sferice, care conțin celule de drojdie încapsulate, se formează prin
41 extrudarea suspensiei de celule de drojdie - alginat de sodiu printr-un ac bont, la o rată
constantă de 0,25 ml/min. Această extrudare este realizată cu ajutorul unei pompe de tip
43 seringă de 20 ml (Harvard Apparatus sau KD Scientific). Acțiunea de formare a picăturilor
de suspensie de drojdie în alginat de sodiu este sub acțiunea combinată a gravitației și a
45 unui câmp electric format de un generator electrostatic, care generează o diferență de
potențial electric de 6 kV, pentru doi electrozi placă, situați unul pe acul bont de formare a
47 picăturilor, la care este polul negativ și al doilea pe baia de coagulare cu soluție de CaCl
0,25 M, la care este polul pozitiv. Distanța dintre cei doi electrozi este de 2,5 cm, iar câmpul

RO 127526 B1

electric se asigură fie cu un generator electrostatic de picături (cum este, de exemplu, cel de la Niso Engineering, Elveția), fie o sursă care are capacitatea de a genera potențiale de 5 kV (cum este, de exemplu, sursa EV262 de la Consort, Belgia) la care se adaptează electrozi plăcă. Sub acțiunea câmpului electric, este forțată migrarea moleculelor încărcate electric către suprafața picăturii; având aceeași sarcină, acestea se vor respinge reciproc, reducând tensiunea superficială care determină de fapt mărimea picăturilor - granulelor formate, menținând integritatea picăturilor de suspensie până la o anumită masă. Sub acțiunea câmpului electric, se vor forma deci picături de dimensiuni mai mici, care vor genera granule sferice de dimensiuni mai mici.

Granulele sferice, formate prin coagularea alginatului în soluție de clorură de calciu, se mențin, timp de 30... 35 min, în soluția de clorură de calciu, pentru întărire. Se spală apoi, prin introducerea, timp de 15 min, în apă distilată și apoi se mențin granulele de alginat cu drojdie încapsulată până la utilizare în soluție fiziologică Ringer (NaCl 6 g, KCl 0,075 g, CaCl₂ 0,1 g, NaHCO₃ 0,1 g), dar nu mai mult de 48 h. Se omogenizează granulele cu hidrolizat din făină de grâu. Hidrolizatul de făină de grâu (sau din oricare altă cereală) se obține conform procedeelelor cunoscute, prin fluidificare cu α -amilază bacteriană termorezistentă și zaharificare cu glucoamilază fungică.

Hidrolizatul preparat ca mai sus se amestecă cu granule conținând drojdie încapsulată, în proporție volumetrică de 5 ml granule cu drojdie încapsulate la 95 ml hidrolizat din făină de cereale. Se continuă fermentația timp de circa 42 h, până la reducerea concentrației de glucoză la mai puțin de 2 g/l. Granulele de alginat cu drojdie încapsulată se separă de plămada fermentată prin trecere pe o sită granulometrică de 30...60 mesh, fiind apoi supuse procesului de uscare și condiționare.

Granulele de alginat cu drojdie încapsulate recuperate după fermentare se spală cu soluție Ringer, în raport de 1 volum granule : 2 părți soluție Ringer, pe o sită granulometrică de 30...60 mesh. Se amestecă 300 g de granule de alginat cu drojdie încapsulate cu 1000 ml soluție de bicarbonat de sodiu 0,1 M și se omogenizează suspensia cu 0,75...0,85 g stearat de magneziu și 0,05...0,07 g ascorbat de sodiu. Suspensia se usucă pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 120...140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 65...70°C. O instalație de uscare prin pulverizare care poate fi utilizată în acest scop este, de exemplu, Niro Production Minor Unit, produsă de Niro Gea sau Laboratory spray dryer, produsă de ICF Cibec. După uscare, se amestecă 28...28,5 g granule uscate cu 3,1... 3,2 g acid acrilic, 2,9...3,0 g acid citric, 1,4...1,6 g alcool polivinilic. Produsul rezultat, 36...36,3 g de amestec conținând granule de alginat uscate, se granulează cu 5 ml soluție alcoolică, care conține 0,7...0,75 g de lecitină dizolvate în 5 ml de alcool etilic. Se usucă timp de 4...5 h, produsul rezultat ca urmare a granulării umede în uscător cu tăvi la presiune normală și la temperatură de maximum 30°C. Se formează un biopreparat, care conține granule spongioase de dimensiuni de 3...4 mm. Acest biopreparat rezultat ca aplicare a procedeelelor menționate are următoarea compoziție: 18,5...20 părți de alginat de calciu, 7,5...7,7 părți de bicarbonat de sodiu, 3,2...3,3 părți acid poli-acrilic, 2,9...3,0 părți acid citric, 1,4...1,6 părți alcool polivinilic, 0,7...0,75 părți lecitină, 0,65...0,7 părți de stearat de calciu, 0,04...0,045 părți ascorbat de sodiu și cel puțin 10⁸ ufc drojdie per gram de compoziție.

Procedeele descrise în exemplul de mai sus au fost aplicate pe un hidrolizat realizat din făină de grâu contaminată cu deoxinivalenol (DON) la un nivel de 1400 ug/kg, nivel peste limita admisibilă de 1,2 ppm. Într-un vas de reacție din inox, prevăzut cu manta rezistentă la abur 1 bar, 121°C, de 10 l, s-au adus 1360 g făină de grâu, conținând circa 818 g amidon,

RO 127526 B1

1 care au fost dispersate cu 3 l apă distilată, amestecându-se până la formarea unei paste.
2 Vasul de reacție, conținând pasta de făină de grâu a fost menținut, timp de 5 min, la 105°C,
3 pentru a se produce gelatinizarea amidonului. După autoclavare, flaconul a fost răcit la 95°C
și incubat la această temperatură. În pasta de făină de grâu la 95°C, s-au adăugat 5 g de α -
5 amilază bacteriană (activitate enzimatică > 1500 U/kg), 3 ml soluție dintr-o soluție 1 mM de
clorură de calciu (conținând 1 μ M de Ca^{2+} per ml, respectiv, 4 mg de ioni de calciu pentru
7 100 g de pastă de amidon = 40 mg/kg = 40 ppm Ca^{2+}). Suspensia gelifiată a fost incubată
la 95°C, timp de 2 h. La sfârșitul perioadei de incubare, s-a verificat solubilizarea amidonului,
9 adăugând peste 2...3 ml suspensie fluidizată, răcită la temperatura camerei, 0,1 ml soluție
de iod în iodură de potasiu (preparată prin dizolvarea 2 g iod și 5 g iodură de potasiu în
11 100 ml apă distilată). Cu această soluție de iod, amidonul formează o culoare albastră
specifică, iar maltodextrinele rezultate prin solubilizarea amidonului/fluidificarea suspensiei
13 de făină gelifiate generează o culoare roșiatică, a cărei intensitate descrește cu gradul de
hidroliză. Soluția rezultată prin fluidificarea făinii de grâu a fost răcită la 55°C și s-au adăugat
15 7,5 ml de amiloglucozidază fungică (activitate enzimatică > 2000 U/kg). S-a incubat timp de
8 h, pentru zaharificare; la final, s-au prelevat probe de 1 ml în care s-au determinat grupările
17 reducătoare cu reactiv DNS. Soluția de zaharuri fermentescibile rezultată a fost adusă la
6000 ml cu apă distilată, pentru a se obține o soluție conținând 150 g/l. Peste cei 6000 ml
19 apă distilată, s-au adus 300 ml granule cu drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae*
L30b (număr de depozit DSM 23648, orice altă drojdie antagonistă fermentativă putând fi
21 folosită), încapsulată conform exemplului de mai sus. S-a procedat la fermentare, la sepa-
rarea granulelor cu drojdie încapsulată, la uscarea și condiționarea granulelor cu drojdie
23 încapsulată, conform exemplului de mai sus, ca și la suspendarea biopreparatului în apă
dură standard, 1 g la 1000 ml (echivalent al unei doze de 1 kg/ha, reluată în 1000 ml). După
25 fiecare stadiu, s-a determinat numărul de drojdii încapsulate, prin tehnica unităților forma-
toare de colonii.

27 Prima diluție a fost realizată în soluție 2% de citrat de sodiu, pentru a dizolva gelul
de alginat de calciu. În același timp, s-a verificat și păstrarea caracteristicilor antagoniste *in*
29 *vitro* ale drojdiei *S. cerevisiae* L30b, încapsulate și prelucrate conform procedeele descrise,
față de o tulpină de *Fusarium graminearum* DSM 4527, producătoare de deoxinivalenol
31 DON.

33 Tabelul 1

35 *Influența diferitelor etape ale procedeelelor conform invenției asupra numărului
de drojdii antagoniste încapsulate și a activității antagoniste a drojdiilor*

37 Etape conform procedeelelor de invenție	Număr drojdii (ufc per gram granule)	Activitate antagonistă <i>in vitro</i> față de <i>F. graminearum</i> DSM4527*
39 Încapsulare	$2,5 \times 10^7$	0,1; Puternic antagonist (PA)
După fermentarea hidrolizatului de cereale contaminat cu DON	$3,7 \times 10^{10}$	0,1; Puternic antagonist (PA)
41 După uscare prin pulverizare	$1,2 \times 10^8$	0,1; Puternic antagonist (PA)
43 După condiționare și reluare în apă dură standard	$1,5 \times 10^8$	0,1; Puternic antagonist (PA)

45 *Antagonism (A) cu atât mai puternic (PA) cu cât valorile coeficientului x sunt mai apropiate de valoarea 0; calcularea coeficientului x s-a realizat pe baza raportului dintre razele interne (i) și externe (e) ale ciupercii test (A) și a drojdiei (B), după formula : $x = iA/iB \times eB/Ea$.

RO 127526 B1

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 1. Aceste rezultate dovedesc: (i) 1
înmulțirea semnificativă a drojdiilor antagoniste încapsulate în timpul fermentației, în pofida 2
încapsulării și a prezenței DON în exces; (ii) supraviețuirea drojdiei antagoniste în cursul 3
etapelor de uscare și condiționare, inclusiv la reluarea biopreparatului în soluții apoase; (iii) 4
păstrarea proprietăților antagoniste *in vitro* ale drojdiilor supuse operațiilor de încapsulare și 5
de fermentare, multiplicare, uscare și condiționare în stare încapsulată.

În cursul fermentației, au fost monitorizați principalii parametri specifici, respectiv, 7
concentrația de etanol (și parametrii derivați precum randamentul și productivitatea 8
volumetrică) și concentrația de glucoză (determinată prin lichid cromatografie) și numărul de 9
drojdii încapsulate, determinate prin tehnica unităților formatoare de colonii, după realizarea 10
primei diluții în soluție 2% de citrat de sodiu, pentru a dizolva gelul de alginat de calciu. 11
Condițiile analizei lichid cromatografice prin care s-au determinat simultan concentrația de 12
alcool și de glucoză au fost: Sistem Agilent 1290 Infinity LC, coloana Hi-Plex H 8 μm , 300 13
 \times 7,7 mm, p/n: PL1170-6830; eluent: acid sulfuric 5 mM; gradient isocratic; flux de 0,7 14
ml/min, volum injectat 20 μl , temperatură 60°C, presiune 4,6 MPa (46 bari), detector cu indice 15
de refracție, menținut la 55°C. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

*Evoluția unor parametri specifici fermentației hidrolizatului de făină de grâu 19
contaminat cu DON prin utilizarea drojdiilor antagoniste,
imobilizate conform procedurii descrise în invenție 21*

Timp de fermentație (ore)	25	40	
Concentrație etanol (%g/g)	7,97	8,98	23
Randament etanol (g/g)	0,45	0,52	
Productivitate volumetrică (g/l/h)	3,06	0,52	25
Concentrație reziduală de glucoză (g/l)	87,6	2,36	
Număr celule drojdie ($\times 10^{10}$ ufc)	0,15	2,24	27

Aceste rezultate din tabelul 2 arată o capacitate ridicată de fermentare a hidrolizatelor 29
de cereale contaminate cu micotoxine de către drojdiile antagoniste încapsulate în granule 30
de alginat de calciu, în paralel, cu o multiplicare peste limita uzual întâlnită în procesele de 31
fermentare cu drojdii.

S-a testat și capacitatea biopreparatului obținut în final, comparativ cu cea a 33
suspensiei de drojdii de aceeași concentrație în limitarea producerii de ascospori de către 34
ciuperca *Fusarium graminearum* Schw. DSM 4527 (teleomorfa *Gibberella zea* Schw. Petch). 35
Ciuperca toxigenă, forma conidială, *F. graminearum*, a fost cultivată pe mediu înclinat cartof - 36
glucoză - agar. După șapte zile de creștere, cultura a fost reluată în tampon fosfat salin, pH 37
7,2, adusă la 10^5 ufc/ml și inoculată (0,1 ml/g) peste paie de grâu sterilizate prin autoclavare. 38
Același tratament a fost aplicat și unor variante experimentale tratate aseptice (anterior, 39
concomitent sau ulterior) cu biopreparat realizat conform exemplului (0,1 ml dintr-o 40
suspensie realizată prin dizolvarea a 1 g biopreparat la 1 l suspensie, pentru 10 g de paie) 41
și cu inocul de reluat de pe mediu YEM agarizat, înclinat (inoculare 0,1 ml suspensie 10^5 42
ufc/ml per gram de paie).

Paiele au fost trecute apoi aseptice pe plăci Roux, închise cu dopuri de vată, care 43
conțineau câte 5 g de vermiculit steril, umectat cu câte 5 ml de apă sterilă. Plăcile au fost 44
incubate timp de 21 zile, la 25°C, și în lumină fluorescentă cu dominantă în UV apropiat 45
(două lămpi F40 BLB, două lămpi F40 CWX, Philips). Vermiculitul a fost reumectat de două 46
ori.

RO 127526 B1

1 ori pe săptămână. Captarea ascosporilor s-a realizat cu ajutorul unor lamele de microscop
25 x 75 mm, tratate cu silicon și plasate la 10 mm de gâtul plăcii Roux. După 21 de zile, s-a
3 lăsat vermiculitul să se usuce timp de 5 zile, după care a fost reumectat abundent, cu 7 ml
de apă sterilă. Această alternanță a favorizat ejectarea sporilor din apotecii. Sporii captați în
5 uleiul siliconic au fost numărați la microscop, pe 25% din suprafața lamelei. Fiecare variantă
experimentală a fost realizată în trei repetiții, iar întregul experimentul a fost repetat o dată.
7 Datele au fost interpretate pe baza testului Friedman pentru măsurări repetate. Rezultatele
sunt prezentate în tabelul 3, de mai jos.

Tabelul 3

11 *Influența aplicării biopreparatului pe baza tulpinii de drojdie antagonistă S. cerevisiae*
12 *L30b, obținută conform procedeelelor descrise în invenție, comparativ cu a*
13 *suspensiei de drojdii antagoniste L30b, asupra producerii de ascospori*
14 *de către Fusarium graminearum DSM 4527 (teleomorfa Gibberella zea)*

Varianta experimentală	Ascospori (*10 ⁶) per cm ² de substrat*	% față de martor
Martor, paie de grâu neinoculate cu microorganisme antagoniste, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per gram de paie	12,6 a	-
Preinoculat cu biopreparat, conform exemplului, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per gram de paie	1,71 c	13,57%
Inoculat concomitent cu biopreparat, conform exemplului, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per gram de paie	2,61 bc	20,71%
Postinoculat cu biopreparat, conform exemplului, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per gram de paie	4,27 b	25,95%
Preinoculat cu 0,1 ml suspensie L30b 10 ⁵ ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per gram de paie	1,62 a	12,86%
Inoculat concomitent cu 0,1 ml suspensie L30b 10 ⁵ ufc/ml per g de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per gram de paie	2,87 bc	22,78%
Postinoculat cu 0,1 ml suspensie L30b 10 ⁵ ufc/ml per gram de paie, inoculare 0,1 ml suspensie 10 ⁶ ufc/ml per gram de paie	4,15 b	32,94%

* Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru testul Friedman la 0,05 nivel de încredere.

33 Rezultatele din tabelul 3 demonstrează că biopreparatul realizat pe baza procedeelelor
34 descrise în invenție este eficient în reducerea dezvoltării și a sporulării ciupercilor
35 fitopatogene și toxigene *F. graminearum*. Tulpina condiționată sub formă de biopreparat,
36 rezultat în urma aplicării procedeelelor conform invenției, este la fel de eficace ca și tulpina ca
37 atare, aplicată sub formă de suspensie.

1. Biopreparat pentru protecția plantelor împotriva agenților fitopatogeni, în special, împotriva ciupercilor fitopatogene și toxigene, **caracterizat prin aceea că** este constituit din: 18,5...20 părți de alginat de calciu, 7,5...7,7 părți de bicarbonat de sodiu, 3,2...3,3 părți acid poliacrilic, 2,9...3,0 părți acid citric, 1,4...1,6 părți alcool polivinilic, 0,7...0,75 părți lecitină, 0,65...0,7 părți de stearat de calciu, 0,04...0,045 părți ascorbat de sodiu și cel puțin 10^8 ufc de drojdii antagoniste, destinate producerii de bioetanol prin fermentația alcoolică a hidrolizatelor de cereale, per gram de compoziție.

2. Procedeu de obținere a biopreparatului definit în revendicarea 1, pe bază de drojdii antagoniste, destinate producerii de bioetanol prin fermentația alcoolică a hidrolizatelor de cereale, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: amestecarea a 800 ml soluție bicarbonat de sodiu 1 M cu 200 ml de suspensie drojdie antagonistă *Saccharomyces cerevisiae* L30b, concentrată, care conține în jur de 10^7 ufc drojdii/ml; adăugarea celor 1000 ml de suspensie de drojdii în bicarbonat de sodiu 1 M peste 17,6 g acid alginic și solubilizarea acidului alginic prin formarea de alginat de sodiu și eliberare de bioxid de carbon; formarea microgranulelor sferice prin extrudarea suspensiei de celule de drojdie - alginat de sodiu printr-un ac bont, la o rată constantă de 0,25 ml/min, realizată cu ajutorul unei pompe de tip seringă de 20 ml, și sub acțiunea combinată a gravitației și a unui câmp electric format de un generator electrostatic de picături, care generează o diferență de potențial electric de 6 kV, pe distanța de 2,5 cm, între acul de formare a picăturilor și baia de coagulare cu soluție de CaCb 0,25 M; menținerea timp de 30...35 min a granulelor în soluția de clorură de calciu, pentru întărire; spălarea granulelor prin introducere timp de 15 min în apă distilată; menținerea granulelor de alginat cu drojdie încapsulată până la utilizare în soluție fiziologică Ringer, dar nu mai mult de 48 h; omogenizarea granulelor cu hidrolizat din făină de cereale, grâu, orz sau porumb, obținut în două etape, prin fluidificare și zaharificare, în proporție volumetrică de 5 ml granule cu drojdii încapsulate la 95 ml hidrolizat din făină de cereale conținând 150 g/l zaharuri fermentescibile, care poate fi contaminat cu micotoxine precum deoxinivalenol, DON, peste limitele maxime admisibile; recuperarea, după fermentare, a drojdiilor încapsulate, spălarea granulelor cu drojdie încapsulată cu soluție Ringer, în raport de 1:2, pe o sită granulometrică de 30...60 mesh; amestecarea a 300 g de granule de alginat cu drojdii încapsulate cu 1000 ml soluție de bicarbonat de sodiu 0,1 M și omogenizarea suspensiei cu 0,75...0,85 g stearat de magneziu și 0,05...0,07 g ascorbat de sodiu; uscarea suspensiei astfel rezultată pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit, ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 120...140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 65...70°C; amestecarea a 28...28,5 g granule uscate cu 3,1...3,2 g acid acrilic, 2,9...3,0 g acid citric, 1,4...1,6 g alcool polivinilic; dizolvarea separată a 0,7...0,75 g de lecitină în 5 ml de alcool etilic; granularea umedă a 36...36,3 g de amestec conținând granule de alginat uscate cu 5 ml soluție alcoolică preparată ca mai sus; uscarea timp de 4...5 h a produsului rezultat ca urmare a granulării umede în uscător cu tăvi la presiune normală și la temperatură de maximum 30°C.

