



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 01013**

(22) Data de depozit: **03/12/2018**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2024** BOPI nr. **5/2024**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CONSTANTINESCU- ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU NR. 297, BL. 15A,
SC. A, AP. 5, ET.1, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BĂRBIERU OTILIA GABRIELA,
STR.GHEORGHE DOJA, NR.5, BL.7A, SC.4,
ET.1, AP.62, GALAȚI, GL, RO;**
• **DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TRITEAN NAOMI, STR.PERFEȚIONĂRII,
NR.11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**KR 20040018844 A; US 2015/057434 A1;
US 2016/159854 A1**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A PROTEINELOR BIOACTIVE
ȘI A PROTEINELOR AMFIFILE DIN SUBSTRAT EPUIZAT
DE LA CULTIVAREA CIUPERCILOR LIGNOCELULOZICE**



RO 134217 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere din substrat epuizat de
2 ciuperci lignocelulozice a peptidelor bioactive, cu activitate anti-microbiană, a proteinelor cu
3 activitate enzimatică și a proteinelor amfifile.

4 Sunt cunoscute diferite procedee de obținere a peptidelor/proteinelor din substratul
5 epuizat de ciuperci lignocelulozice. Aceste procedee urmăresc valorificarea superioară a
6 unui co-produs agro-industrial produs în cantități din ce în ce mai mari. Pentru 1 kg de
7 ciuperci se generează 5 kg de substrat epuizat, producția anuală de substrat epuizat
8 depășind cu mult 5 milioane de tone (**Mohd Hanafi et al. 2018. Journal of Material Cycles
9 and Waste Management, 20, 1383-1396**).

10 Cererea de brevet **KR 20040018844 A** dezvăluie o metodă de izolare și purificare a
11 proteinei hidrofobinei din *Tricholoma matsutake*. Metoda urmărește parcurgerea urmă-
12 toarelor etape: adăugarea prin pulverizare a 60% etanol peste un material biologic repre-
13 zentat de corpuri fructifere de *Tricholoma matsutake*, urmată de centrifugare, adăugarea de
14 apă distilată în supernatant și supunerea amestecului la dializă peste noapte, centrifugând
15 soluția rămasă la 4°C și liofilizarea supernatantului, dizolvarea substanței liofilizate în 25 ml
16 de soluție tampon fosfat de sodiu 0,05 M (pH 6,0) și soluție de sodiu 1 M și amestecarea
17 acestora; centrifugarea amestecului la temperatura camerei; și spălarea porțiunii care
18 conține hidrofobină precipitată cu soluție tampon de sodiu 1 M, etanol 80% și o soluție mixtă
19 de cloroform și metanol și uscarea acesteia.

20 Documentul brevet **US 2015/057434 A1** se referă la o metodă pentru purificarea unui
21 biosurfactant, în mod avantajos o hidrofobină, mai avantajos hidrofobină II, care poate
22 cuprinde adăugarea unui agent de precipitare, de preferință un modificador organic, mai
23 preferabil un alcool, cel mai preferabil un alcool C1-C3, la o soluție de biosurfactant pentru
24 a genera un prim precipitat, decantând un supernatant din agentul de precipitare/soluția de
25 biosurfactant și adăugarea unui agent de precipitare identic sau diferit la supernatant, pentru
26 a genera un al doilea precipitat, în care al doilea precipitat poate fi un biosurfactant purificat,
27 în mod avantajos un hidrofobină purificată, mai avantajos hidrofobină II purificată. Sistemul
28 biologic din care este izolat biosurfactantul/hidrofobina, cuprinde sau este derivat dintr-un
29 organism viu cum ar fi un microb, o plantă, o ciupercă, o insectă, o vertebrată sau o formă
30 de viață creată prin biologie sintetică. Într-o variantă de realizare deosebit de avantajoasă,
31 hidrofobina purificată din *Trichoderma spp.*

32 În documentul **US 2016/159854 A1** este detaliată o metodă de purificare și concen-
33 trare pentru proteine și anticorpi. În particular, prezenta invenție se referă la o metodă con-
34 tinuă de separare a fazelor pe bază de surfactant pentru recuperarea proteinelor de fuziune
35 a hidrofobinei și pentru recuperarea moleculelor țintă, cum ar fi anticorpii, direct dintr-un lichid
36 prin utilizarea tehnologiilor de separare a fazelor și de fuziune hidrofobină-proteină A.

37 Cererea de brevet **EP 2078755 A** prezintă un procedeu de extracție și purificare a
38 enzimelor (piranoz-dehidrogenază, xilanază, pectinază, protează și laccază), proteinelor
39 legate de polizaharide, lectinelor și a altor compuși bioactivi (alcaloizi, antibiotice și terpene)
40 din diferite co-produse ale culturii ciupercilor - substrat epuizat ciuperci, butoni, corpi de
41 fructificație degradați. Mai multe specii de ciuperci pot fi utilizate în acest scop, fiind
42 exemplificate prin *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Cordyceps
43 sinensis*, *Gri foia frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Poria cocos*, *Polyporus umbellatus*,
44 *Hericium erinaceus*, *Auricularia auricular* și *Coriolus versicolor*. Procedeu implică etape de
45 extracție, precipitare, separare centrifugală și gel-cromatografie.

46 Brevetul **KR 101458628 B1** se referă la un procedeu de obținere a unor enzime care
47 zaharifică biomasa, xilanaze, celulaze și lacaze, din substrat epuizat de la cultivarea
48 ciupercilor lignocelulozolitice, *Pleurotus eryngii*; *Pleurotus ostreatus*; *Filammulina velutipes*;
49 *Lentinus edodes*. Procedeu implică extracția enzimelor în diferite tipuri de solvenți - apă,

RO 134217 B1

soluție 0,5-2% clorură de sodiu, tampon citrat 0,01-0,1 M, tampon fosfat 0,01-0,1 M, tampon fosfat 0,01-0,1 M cu 5-20% glicerol și 0,1-0,5% surfactant ne-ionic, 0,01-0,1 M tampon fosfat cu 0,1-0,5% surfactant ne-ionic. Surfactantul ne-ionic folosit este Polysorbate 20, Polysorbate 80, Poloxamer sau Triton X-100. Extracția este urmată de separarea prin centrifugare a extractului apos de materialul ne-extras.

Un dezavantaj comun al procedeelor de mai sus este că nu realizează o separare a peptidelor bioactive de proteine, iar în cadrul proteinelor nu separă proteinele amfifile, cum ar fi de exemplu hidrofobinele care nu prezintă activitate enzimatică, de cele cu activitate enzimatică. Este cunoscut faptul că substratul epuizat de la cultivarea ciupercilor include o serie de peptide bioactive, cum ar fi de exemplu cele cu activitate anti-microbiană, pleurostrin (Chu et al. 2005, *Peptides*, 26, 2098-2103), eringin (Wang și Ng, 2004, *Peptides*, 25, 1-5) și peptide cationice (Schillaci et al. 2013. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15, 591-594), în cazul ciupercilor din genul *Pleurotus*, sau Ganoderma (Wang și Ng, 2006. *Peptides*, 27, 27-30). De asemenea, în miceliul ciupercilor lignocelulozice rămase în substratul epuizat se acumulează cantități semnificative din proteine amfifile - hidrofobine: POH1, POH2, POH3 (Asgeirsdottir et al. 1998, *Microbiology*, 144, 2961-2969), Vmh2 (Gravagnuolo et al. 2016. *Biomacromolecules*, 17, 954-964) și PN1 (Zhang et al. 2015. *European Journal of Plant Pathology*, 143, 823-831) în *Pleurotus*, Hyd în *Flammulina velutipes* (Kim et al. 2016. *Mycoscience*, 57, 320-325), cu 8 punți de cisteină conservate evolutiv la *Phlebia brevispora*, *Ganoderma sp.* și *Bjerkandera adusta* (Mgbeahuruike et al. 2013, *Mycologia*, 105, 1471-1478). Hidrofobinele au numeroase aplicații în nanobiotehnologie, industrie alimentară și biomedicină, de la stabilizarea sistemelor heterogene (Wosten și Scholtmeijer 2015, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1587-1597), a nanoparticulelor (Politi et al. 2016. *Nanotechnology*, 27, 195701) sau a spumelor alimentare (Wang et al. 2013, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 61, 1554-1562), până la realizarea de noi formulări „inteligente” pentru medicamente (Singh et al. 2018. *Trends in Biotechnology*, 36, 1103-1106). Hidrofobinele sunt proteine cu mase moleculare mici (Khalesi et al. 2015. *The Protein Journal*, 34, 243-255), dificil de separat de peptide prin tehnici de cernere moleculară. Prezența hidrofobinelor în soluțiile de enzime hidrolitice recuperate din substratul epuizat de la cultivarea ciupercilor lignocelulozice influențează negativ activitatea hidrolazelor, deoarece hidrofobinele au o mare capacitate de spumare (Cocs et al. 2009, *Food Hydrocolloids*, 23, 366-376), iar spumarea limitează capacitatea hidrolazelor de a ajunge la substrat.

Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este realizarea unui procedeu prin care să se separe rapid peptidele cu activitate anti-microbiană și proteinele amfifile de proteinele cu activitate enzimatică.

Procedeeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- măcinarea umedă a substratului epuizat, cu reducerea dimensiunii particulelor la mai puțin de 1 mm;

- extracția peptidelor bioactive cu activitate anti-microbiană și a proteinelor amfifile, cu o soluție 0,1 M tampon fosfat, pH 5,8...6,2 în raport de 1 kg substrat epuizat umed la 9 L de tampon fosfat, cu incubare sub agitare timp de 30 min la 30°C;

- separarea prin filtrare a substratului ne-extras de extractul apos;

- aducerea la temperatura de 30°C, și adăugarea unei soluții 0,1...0,3% de surfactant amfifil ne-ionic;

- agitarea timp de 15 min, la temperatura de 30°C, pentru a facilita extracția hidrofobinelor în interiorul structurilor purtător amfifile;

RO 134217 B1

1 - ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate, pe o membrană cu limită de exclu-
dere de 15 kDa, la un debit pe minut care reprezintă 1% din volumul vasului de alimentare,
3 și la o diferență de presiune de 140...170 kPa, pentru separarea peptidelor cu activitate anti-
microbiană de proteinele cu activitate enzimatică și de proteinele amfifile incluse în micle;

5 - concentrarea permeatului până la 5% substanță uscată și uscarea prin pulverizare
blândă, la o temperatură de intrare a aerului de 140...145°C și o temperatură de ieșire de
7 70...75°C;

9 - concentrarea retentatului până la exprimarea fazei micelare care conține proteine
amfifile și separarea acesteia de soluția de proteine cu activitate enzimatică, prin centrifugare
la 2500 x g;

11 - sterilizarea prin ultrafiltrare pe membrană de 0,2 μm a soluției de proteine cu
activitate enzimatică, în vederea utilizării acesteia pentru hidroliza biomasei lignocelulozice
13 pre-tratate.

15 Structurile purtător amfifile sunt: eter alchilic de polioxietilen; tribloc co-polimer, format
dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de
polietilenglicol, sau combinații ale acestora.

17 Procedul descris conform invenției prezintă următoarele avantaje:

19 - separă rapid peptidele cu activitate anti-microbiană, de proteinele amfifile și de
proteinele cu activitate enzimatică;

- recuperează proteinele cu activitate amfifilă;

21 - îmbunătățește caracteristicile de utilizare ale enzimelor extrase din substratul
epuizat, pentru că reduce prin separarea hidrofobinelor capacitatea de spumare a ames-
tecului proteic.

23 În continuare sunt prezentate exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o
25 limita.

Exemplul 1

27 Substratul epuizat umed de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* este măcinat pe o
moară cu cuțite (Willey model 4, Thomas, Thermo Fischer, Waltham, MA, SUA), prevăzută
29 cu o sită de 1 mm. Se cântărește 1 kg din materialul vegetal măcinat umed, care se trece
într-un vas de sticlă Simax® de 15 L (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termo-
31 statare, și agitare mecanică, împreună cu 9 L de soluție 0,1 M tampon fosfat, cu pH-ul ajustat
la 5,8. Se incubează sub agitare timp de 30 min la 30°C, iar apoi se separă substratul ne-
33 extras de extractul apos, prin filtrare pe un filtru cu presiune (RPF T01, BHS-Sonthofen,
Sonthofen, Germania), la 0,6 MPa. Filtratul se trece într-un alt vas Simax® de 15 L, și se
35 verifică valoarea pH-ul filtratului, de 5,8. Se aduce la temperatura de 30°C. Peste cei 9,2 L
de filtrat se introduc 9,2 g de eter etilic de polioxietilen (20) (Brij® 98, Croda International,
37 Snaith, Marea Britanie). Se agită timp de 15 min, la temperatura de 30°C, pentru a facilita
extracția hidrofobinelor în interiorul structurilor purtător amfifile. Se ultrafiltrează tangențial
39 suspensia rezultată, pe un sistem de ultrafiltrare Cogent M1 (Merck Group, Darmstad,
Germania), prevăzut cu 1 modul Biomax, cu membrană de polietersulfonă, cu pragul de
41 excludere de 15 kDa și cu o suprafața de 50 cm². Se operează la un debit pe minut care
reprezintă 1% din volumul vasului de alimentare, respectiv 92 mL/min și la o diferență de
43 presiune de 140 kPa, pentru separarea peptidelor cu activitate anti-microbiană de proteinele
cu activitate enzimatică și de proteinele amfifile incluse în micle. Permeatul cu peptide
45 antimicrobiene se concentrează până la 5% substanță uscată (verificată refractometric, cu
refractometru digital HI 96801, Hanna Instruments, Cluj Napoca, România), prin concentrare
47 la un evaporator rotativ sub vid (Rotavapor® R-300, Buchi, Flaviil, Elveția). Concentratul se
usucă prin pulverizare blândă, pe un uscător cu pulverizare (Mini Spray-Dryer, Buchi), la o

RO 134217 B1

temperatură de intrare a aerului de 140...145°C și o temperatură de ieșire de 70...75°C. Se reiau 0,1 g, se reconstituie ca soluție 10 mg/mL în 10 mL tampon fosfat, și se testează ca activate anti-microbiană față de *Fusarium graminearum* (Chu et al. 2005, **Peptides**, 26, 2098-2103). 1
3

Retentatul se concentrează la un evaporator rotativ sub vid (Rotavapor® R-300), până la exprimarea fazei micelare care conține proteine amfifile - opacizarea soluției datorită transformării nanoemulsiei transparente în micro-emulsie vizibilă (*cloud point* - punctul de turbiditate). Retentatul se trece în 2 vase de centrifugă de 500 mL care se echilibrează și se centrifughează într-o centrifugă Eppendorf 5810 (Eppendorf, Hamburg, Germania) cu rotor batant A-4-81. Se centrifughează la viteza de 3525 rpm, care corespunde, în cazul rotorului batant A-4-81, cu o rază de 18 cm, la o forță centrifugală relativă de 2500 x g. Soluția de proteine cu activitate enzimatică, rezultată ca supernatant, se sterilizează prin ultrafiltrare pe membrană de 0,2 μm, pe un dispozitiv Nalgene™ Rapid-Flow™ Sterile Disposable Filter Unit, conectat la o pompă de vid. Soluția rezultată este utilizabilă pentru hidroliza biomasei lignocelulozice pre-tratate. 5
7
9
11
13
15

Exemplul 2

Se procedează la fel ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Surfactantul ne-ionic utilizat este un tribloc co-polimer, cu o masă moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22, fiind cunoscut sub denumirea comercială de Pluronic® F127 (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Germania). Acesta se adaugă într-o concentrație de 0,3%, respectiv 27,6 g. pH-ul inițial are valoarea 6,2. Ultrafiltrarea se face la o diferență de presiune de 170 kPa. 17
19
21

Exemplul 3

Se procedează la fel ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Surfactantul ne-ionic utilizat este un amestec de tribloc co-polimer, cu o masă moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22, cunoscut sub denumirea comercială de Pluronic® F127 (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Germania) și de eter etilic de polioxietilen (20) (Brij® 98, Croda International, Snaith, Marea Britanie). Acesta se adaugă într-o concentrație de 0,2%, respectiv 18,4 g. pH-ul inițial are valoarea 6,0. Ultrafiltrarea se face la o diferență de presiune de 150 kPa. 23
25
27
29

Revendicări

1

3

5

7

9

11

13

15

17

19

21

23

25

1. Procedeu de obținere din substrat epuizat de ciuperci lignocelulozice a peptidelor bioactive, cu activitate anti-microbiană, și a proteinelor amfifile, **caracterizat prin aceea că**, este alcătuit din următoarele etape: măcinarea umedă a substratului epuizat, cu reducerea dimensiunii particulelor la mai puțin de 1 mm; extracția peptidelor și a proteinelor cu o soluție 0,1 M tampon fosfat, în raport de 1 kg substrat epuizat umed la 9 L de tampon fosfat, cu incubare sub agitare timp de 30 min la 30°C; separarea prin filtrare a substratului ne-extras de extractul apos; ajustarea pH-ului filtratului la valori de 5,8...6,2, aducerea la temperatura de 30°C, și adăugarea 0,1...0,3% a unui surfactant amfifil ne-ionic; agitarea timp de 15 min, la temperatura de 30°C, pentru a facilita extracția hidrofobinelor în interiorul structurilor purtător amfifile; ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate, pe o membrană cu limită de excludere de 15 kDa, la un debit pe minut care reprezintă 1% din volumul vasului de alimentare, și la o diferență de presiune de 140-170 kPa, pentru separarea peptidelor cu activitate anti-microbiană de proteinele cu activitate enzimatică și de proteinele amfifile incluse în micelle; concentrarea permeatului până la 5% substanță uscată și uscarea prin pulverizare blândă, la o temperatură de intrare a aerului de 140...145°C și o temperatură de ieșire de 70...75°C; concentrarea retentatului până la exprimarea fazei micelare care conține proteine amfifile și separarea acesteia de soluția de proteine cu activitate enzimatică, prin centrifugare la 2500 x g; sterilizarea prin ultrafiltrare pe membrană de 0,2 μm a soluției de proteine cu activitate enzimatică, în vederea utilizării acesteia pentru hidroliza biomasei lignocelulozice pre-tratate.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, structurile purtător amfifile sunt: eter alchilic de polioxietilen; tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol, sau combinații ale acestora.

