



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00860

(22) Data de depozit: 05/12/2019

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:  
• 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.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,  
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,  
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• BALA IOANA, STR.POIANA CU ALUNI,  
NR.1, BL.4, SC.4, ET.4, AP.60, SECTOR 2,  
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

(54) **PROCEDEU DE ZAHARIFICARE ȘI FERMENTAȚIE  
SECVENȚIAL SIMULTANĂ PENTRU PRODUCEREA  
DE 2,3-BUTANDIOL DIN MATERIAL LIGNOCELULOZIC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a 2,3-butandiol. Procedeu, conform invenției, constă în conversia materialului vegetal de tip lignocelulozic în zaharuri fermentescibile sub acțiunea enzimelor produse de tulpini biostimulante de *Trichoderma*, cu incubare timp de 96 h sub agitare, la temperatura de 35°C, separarea supernatantului de materialul celulozic recalitrant cu biomasă de *Trichoderma*, utilizarea supernatantului pentru fermentare cu tulpini de

*Paenibacillus*, timp de 96 h, la 35°C, pH 7, 0, din care rezultă 2,3-butandiol care este separat de mediul de cultură prin distilare extractivă cu acid oleic și uscarea suspensiei rămase în blazul de distilare, care conține bacterii formatoare de endo-spori, prin pulverizare, la o temperatură de intrare de 140...150°C și la o temperatură de ieșire de 80...85°C.

Revendicări: 4



## PROCEDEU DE ZAHARIFICARE ȘI FERMENTAȚIE SECVENȚIAL SIMULTANĂ PENTRU PRODUCEREA DE 2,3 BUTANDIOL DIN MATERIAL LIGNOCELULOZIC

Prezenta invenție se referă la un procedeu de zaharificare și fermentație secvențial simultană pentru producerea de 2,3 butandiol din material lignocelulozic.

Sunt cunoscute diferite procedee de producere a 2,3 butandiolului prin zaharificare și fermentare simultană. Brevetul CN 102643869 B dezvăluie un procedeu de obținere a 2,3-butanediolului prin zaharificare și fermentare simultană a zaharurilor extrase din coceni de porumb cu xiloză extrasă din porumb. Procedeu implică utilizarea zaharurilor extrase din coceni de porumb ca sursă de carbon și a ureei ca sursă de azot, folosind tulpinile selecționate de *Klebsiella pneumoniae* CICC 10011, *Klebsiella oxytoca* CICC 21518, *Bacillus polymyxa* CICC 10010, *Bacillus cloacae* CICC 10014 pentru a realiza simultan zaharificarea și fermentare. Amestecul de tulpini folosite permite obținerea unei rate de conversie a zaharurilor extrase din coceni de porumb în 2,3-butanediol și acetoină care ajunge la 19,59% - 36,13%. Totuși, datorită folosirii unor tulpini de microorganisme patogene pentru om din genul *Klebsiella*, procedeul prezintă riscuri la ridicarea la scară.

Brevetul CN101173306 B descrie hidroliza enzimatică combinată cu fermentarea continuă pentru producția de acetoină și butanol din paie pre-tratate prin explozie cu abur într-un reactor membranar cu fibre tubulare. Folosirea celulelor rezolvă problema utilizării tulpinilor de patogeni umani. Brevetul revendică și refolosirea celulei la hidroliza enzimatică a paielor pre-tratate, datorită reactorului membranar, ceea ce ar asigura eficiență ridicată și costuri reduse.

Există o problemă tehnică a inhibării enzimelor celulazice datorită acumulării produselor de fermentație. Brevetul US 9238792 B se referă la un sistem de zaharificare și fermentație în care un vas de zaharificare este conectat la un vas de fermentație prin intermediul a două reactoare membranare tubulare. Această soluție tehnică elimină inhibarea datorită acumulării produșilor de fermentație, dar nu rezolvă problema utilizării biomasei recalcitrante (care nu este zaharificată) și căreia nu i se dă nici o utilizare. De asemenea, costurile sistemelor enzimatică celulazice implicate în degradarea lignocelulozei sunt ridicate. Aceste sisteme, constituite de obicei din endoglucanaze (endo 1,4-d-glucanază sau E.C. 3.2.1.4), care atacă în mod aleatoriu regiuni de cristalinitate scăzută pentru a crea lanțuri libere, exoglucanaze sau celobiohidrolaze (1, 4-β-d glucan-celobiohidroază sau E.C.

3.2.1.91c), care eliberează celobioză din capetele libere ale lanțurilor cristaline, și  $\beta$ -glucozidaze (E.C. 3.2.1.21), care hidrolizează celobioza cu eliberare de glucoză, au o eficiență redusă în hidroliza regiunilor cristaline sau în desfacerea asocierilor cu hemiceluloza / lignina. Utilizarea exclusiv a acestor enzime a făcut ca toate instalațiile, prevăzute în ambițiosul plan de obținere a etanolului celulozic din SUA, prevăzut a atinge 30 miliarde tone, să fie închise sau nepuse în funcțiune (Brown, 2019. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13, 889-898). În afară de cele trei clase de enzime descrise mai sus, în desfacerea lanțurilor de celuloză mai intervin și monoxigenazele litice pentru polizaharide (LPMO, *Lytic Polysaccharide Monooxygenase*, EC 1.14.99.54) și swoleninele / cerato-plataninele, proteine care desface legăturile de hidrogen dintre lanțurile de celuloză (Passoth & Sandgren 2019. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 5105–5116). Hemicelulazele (1,4-beta-D-Xilan xilanolhidrolaza, EC 3.2.1.8; 1,4-beta-D-Xylan xilohidrolaza, EC 3.2.1.37 și alpha-L-Arabinofuranoside arabino-furanohidrolaza, EC 3.2.1.55) au efecte sinergice cu celelalte enzime în zaharificarea lignocelulozei pretratate (Adsul et al. 2019. *Enzyme and Microbial Technology*, 133, 109442). Feroil-esteraza, enzima care desface legăturile dintre acizi fenolic hidroxicinamic (de ex. acidul ferulic) și hemiceluloze are de asemenea un rol important în zaharificare, datorită desfacerii resturilor de lignină care blochează hidrolazele (Gopalan et al. 2015. *Bioresource Technology*, 193, 534-544). Realizarea unui cocktail enzimatic care să conțină toate aceste enzime este costisitoare, astfel încât sunt de obicei preferate culturi mixte de microorganisme. Cererea de brevet JP2013223453 A prezintă un consorțiu cu acțiune de zaharificare a celuloze, format din tulpinile selectate de *Trichoderma longibrachiatum* KFA-2 (NITE P-1174), *Aspergillus niger* KT-10 (NITE P-1175) și *Penicillium comuna* K1-2 (NITE P-1176). Brevetul nu descrie însă soluții tehnice de utilizare a acestor consorții în cadrul unor procese de zaharificare (secvențial) simultane.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este descrie un proces de zaharificare și fermentație secvențial simultană, care să permită conversia a biomasei lignocelulozice în 2,3 butandiol și care să ofere posibilități de valorificare a produselor secundare, ca de exemplu biomasa recalcitrantă sau blazul de la distilarea 2,3 butandiol.

Procedeul dezvoltat prin această invenție constă în următoarele etape:

- ✓ Gonflarea timp de 2 ore a materialului lignocelulozic măcinat până la 2-5 mm, într-un solvent eutectic hidratat, 30% clorură de clorcolină – uree 1M : 2M și 70% apă, în raport de 10 părți material vegetal la 5 părți solvent eutectic;
- ✓ Adăugarea a 20 părți apă și ultra-omogenizarea amestecului, într-un omogenizator rotor stator, timp de 30 min, 6 cicluri a 5 min, urmată de încălzirea materialului omogenizat timp de 3 ore la 85°C;
- ✓ Adăugarea peste suspensia de material lignocelulozic ultra-omogenizat a 2 părți inocul fungic peletizat, care conține tulpini biostimulante de *Trichoderma*, și incubarea timp de 96 ore sub agitare, la o temperatură de 35°C;
- ✓ După 96 ore separarea supernatantului de materialul lignocelulozic recalitrant cu biomasă de *Trichoderma*;
- ✓ Utilizarea supernatantului pentru fermentare cu tulpini de *Paenibacillus*, timp de 96 ore, la 35°C, pH 7.0, agitare 30 rpm, pentru a produce de (2*R*,3*R*) 2,3 butandiol;
- ✓ Separarea (2*R*,3*R*) 2,3 butandiol de mediul de cultură prin distilare extractivă cu acid oleic și uscarea suspensiei rămase în blazul de distilare, care conține bacterii formatoare de endo-spori, prin pulverizare, la o temperatură de intrare de 140-150°C și la o temperatură de ieșire de 80-85°C.

Inoculul fungic peletizat se obține conform următorului procedeu

- Cultivarea axenică pe medii minimale lichide, care includ 2% diatomită, la pH optim și la aerări de până la 50% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C, timp de 3-5 zile;
- Recoltarea biomasei de microorganisme și a diatomitei prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar;
- Uscarea biomasei de microorganisme și a diatomitei, recoltate prin filtrare, până la max. 5% umiditate reziduală;
- Omogenizarea a 9-11 părți biomasă de microorganisme și diatomită, cu 1,5-2,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,2-2,4 părți lecitină, 84,3-87,1 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14% umiditate reziduală și măcinat la o granulație de 1-2 mm, părțile fiind exprimate în unități de masă;
- Compactarea amestecului biomasă microorganism – diatomită – lignosulfonat de sodiu – lecitină – substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, prin presare într-o presă de peleți cu matrițe orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5...8 mm.

Materialul recalcitrant cu spori de *Trichoderma* se usucă și se utilizează ca biostimulant pentru plante, ca tratament al solului.

Pulberea cu tulpini de *Paenibacillus* se formulează pentru aplicări foliare sau de sol, ca biostimulant pentru plante.

Procedeul prezintă următoarele avantaje.

- Determină o bună conversie a materialului lignocelulozic în zaharuri fermentescibile, sub acțiunea concertată a enzimelor produse de consorții de *Trichoderma*, înalt producătoare de enzime / proteine care acționează asupra materialului lignocelulozic;
- Solventul eutectic folosit pentru pre-tratament devine sursă de azot pentru microorganisme;
- Permite folosirea materialului recalcitrant cu spori de *Trichoderma*, producătoare de enzime / proteine care acționează asupra materialului lignocelulozic, întrucât aceste enzime (de ex. celulaze) / proteine (de ex. swolenine sau ceratoplatanine) sunt elicitori ai sistemului de apărare din plante (Mendoza-Mendoza *et al.* 2018, Fungal Biology Reviews, 32, 62-85).
- Permite folosirea pulberii cu tulpini de *Paenibacillus* ca biostimulant pentru plante, întrucât (2*R*,3*R*) 2,3 butandiol este un compus cu efect de biostimulare a plantelor (Park *et al.* 2018. Journal of plant biology, 61, 424-434; Wu *et al.* 2018 Journal of experimental botany, 69, 5625-5635).

În cele ce urmează se prezintă un exemplu de realizare a invenției, care o ilustrează fără a o limita.

**Exemplu 1.** Într-un vas de sticlă Simax® de 5 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică, se adaugă 500 g solvent eutectic hidratat, 30% clorură de clorcolină – uree 1M : 2M și 70% apă și 1 kg de coceni de porumb și se lasă timp de 2 ore la gonflat. Alternativ solventul eutectic se poate prepara prin amestecare la 80°C a clorurei de clorcolină și a uree, în raportul molar 1:2, și agitare până se formează un lichid omogen transparent (Abbott *et al.* 2011, *Green Chemistry*, 13, 82–90). În vasul de sticlă se introduce un mixer rotor-stator Ultra-Turrax® UTC (IKA Werke, Staufen) și 2 litri de apă sterilă și se omogenizează materialului lignocelulozic. După omogenizarea completă, dovedită de menținerea în suspensie a materialului vegetal, se ridică temperatura la 85°C, unde se menține timp de 3 ore.

Se răcește amestecul. Amestecul de omogenizează din nou cu mixerul rotor-sator. Peste suspensia de material lignocelulozic ultra-omogenizat se adăugă 0,2 kg inocul fungic peletizat, care conține tulpini biostimulante de *Trichoderma*, și se incubă timp de 96 ore sub agitare, la o temperatură de 35°C.

Inoculul fungic se obține după cum urmează. Într-un bioreactor (Biostat® B, Goettingen, Germania), prevăzut cu senzor de pH și senzor de oxigen dizolvat (DO) (InPro6800; Mettler-Toledo AG, Greifensee, Elveția), și cu un vas de 5 litri, se aduc 2 litri mediu minimal M9 care conține la 1 litru: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidru) 6 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g; NaCl 0.5 g; NH<sub>4</sub>Cl 1 g, 10 g lactoză. Se suspendă în mediul rezultat 40 g de diatomită, un conținut de bioxid de siliciu de min. 91,5%. Mediul rezultat se sterilizează prin autoclavare *in-situ*, și apoi se adaugă nouă microelemente, în următoarele concentrații finale: MgSO<sub>4</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 3x10<sup>-9</sup> M; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4x10<sup>-7</sup> M; CoCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 3x10<sup>-8</sup> M; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1x10<sup>-8</sup> M; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 8x10<sup>-8</sup> M; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1x10<sup>-8</sup>M; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1x10<sup>-6</sup> M, rezultate din soluții stoc sterilizate prin ultrafiltrare. Se verifică pH-ul și se aduce la pH 5,5 cu HCl 1 M sau NaOH 1 M.

Mediul se inoculează cu 100 ml de suspensie de conidii de consorțiu de *Trichoderma*, cu caracteristici de biostimulant pentru plante, normalizate la 10<sup>8</sup> propagule per ml prin numărare la lamela citometrică. Un exemplu este consorțiul consorțiu de *Trichoderma* cu acțiune de biostimulare a plantelor de cultură descris de invenția RO131827 (A2) și constituit din tulpinile de *T. harzianum* Td50b, depozitată sub numărul de depozit NCAIM(P)F001412, și *T. asperellum* Td36b, depozitată sub numărul NCAIM(P)F001434, la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapesta, Ungaria, care prezintă o activitate optimă la o rată inițială de amestecare de 1:1, raportat la numărul de unități formatoare de colonii per mililitru de suspensie. Orice altă tulpină / consorțiu de *Trichoderma* cu activitate de biostimulant pentru plante pot fi folosite.

Se cultivă consorțiul de *Trichoderma* timp de 5 zile, la o rată de aerare de până la 50% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C.

După terminarea perioadei de cultivare se recoltează biomasa de microorganisme și diatomita prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar, folosind o unitate Sartolab® (Sartorius, Goettingen, Germania). Suspensia rezultat prin filtrare este resuspendat în apă pură miliQ (produsă într-un aparat Milli-Q® Integral, Merck-

Millipore) până la 5% substanță uscată. Suspensia rezultată se usucă până la max. 5% umiditate reziduală, pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20,000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 130-140°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 75...80°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 (Soeborg, Danemarca) sau Laboratory spray dryer, produsă de ICF Cibec (Maranello, Italia). Orice alt tip de instalație de uscare prin pulverizare, cu caracteristici tehnici similare, poate fi utilizată.

Se iau 10 părți biomasă de microorganisme și siliciu coloidal uscate, care se aduc într-un amestecător în pat fluidizat (MiniGlatt, Glatt, Binzen, Germania), împreună cu 9 părți biomasă de microorganisme și diatomită, cu 1,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,4 părți lecitină, 87,1 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14% umiditate reziduală și măcinat la o granulație de 1-2 mm, părțile fiind exprimate în unități de masă.

Lignosulfonatul de sodiu folosit este Borresperse NA (Borregarrd, Sarspborg, Norvegia), cu următoarele caracteristici: substanță uscată min. 93%; calciu max. 0,6%, pH (soluție 10%) 8,3±0,8, dar orice alt lignosulfonat cu caracteristicile de mai sus poate fi utilizat.

Lecitina folosită este Thermolec® WFC, Archer Daniels Midland (Decatur, IL, SUA), cu o balanță hidrofil-lipofilă mai mare de 8, dar orice altă lecitină modificată cu caracteristicile de mai sus poate fi utilizată.

Amestecul rezultat prin omogenizare în pat fluidizat se peletizează folosind o presă (moară) de peleți cu matrițe orizontale, model Kahl 14-175 (Amandus Kahl, Reinbek / Hamburg, Germania), la o putere specifică de 1 kW pentru 0,015 ...0,02 m<sup>2</sup>, cu menținerea temperaturii amestecului de peletizat la circa 65°C, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5..8 mm.

Orice altă presă orizontală de peletizat, care asigură condiții similare de densificare prin presare poate fi utilizată. Peleții rezultați sunt stabilă, cu o rezistență la rupere de circa 4 kP.

După terminarea perioadei de hidroliză se filrează materialului vegetal recalcitrant prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar, folosind o unitate Sartolab® (Sartorius, Goetting). Supernatantul se utilizează pentru producere de (2R,3R) 2,3 butandiol prin fermentare cu tulpini de *Paenibacillus*, timp de 96 ore, la 35°C, pH

7.0, agitare 30 rpm. Fermentația se realizează în flacoane Erlenmayer sterile. Supernatantul zaharificat se sterilizează și se aduce aseptice la pH 7.0 cu NaOH. Incubarea se realizează pe un incubator cu agitare (de ex. New Brunswick™ Excella® E24R, Eppendorf, Hamburg, Germania).

Un exemplu de tulpină producătoare de 2,3 butandiol care se poate folosi este *Paenibacillus graminis* FL400, cu număr de depozit NCAIM (P) B 001365. Orice altă tulpină de *Paenibacillus*, producătoare de 2,3 butandiol, se poate folosi cu succes.

Separarea (2*R*,3*R*) 2,3 butandiol de mediul de cultură se face prin distilare extractivă cu acid oleic, conform metodei cunoscute (Xiu & Zeng 2008. Applied microbiology and biotechnology, 78, 917-926). Orice altă metodă de separare a 2,3 butandiol se poate utiliza.

Suspensia rămasă în blazul de distilare, care conține bacterii formatoare de endo-spori (*Paenibacillus*), se usucă până la max. 5% umiditate reziduală, pe o instalație de uscare prin pulverizare cu disc atomizor și cu aer încălzit ca agent de uscare, la o turație de cel puțin 20,000 rpm a discului atomizor, la o temperatură de intrare a agentului de uscare de 140-150°C și la o temperatură de ieșire a agentului de uscare de 80...85°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 (Soeborg, Danemarca) sau Laboratory spray dryer, produsă de ICF Cibec (Maranello, Italia). Orice alt tip de instalație de uscare prin pulverizare, cu caracteristici tehnice similare, poate fi utilizată.



## Revendicări

1. Procedeu de zaharificare și fermentație secvențial simultană pentru producerea de 2,3 butandiol din material lignocelulozic conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: gonflarea timp de 2 ore a materialului lignocelulozic măcinat până la 2-5 mm, într-un solvent eutectic hidratat, 30% clorură de clorcolină – uree 1M : 2M și 70% apă, în raport de 10 părți material vegetal la 5 părți solvent eutectic; adăugarea a 20 părți apă și ultra-omogenizarea amestecului, într-un omogenizator rotor stator, timp de 30 min, 6 cicluri a 5 min, urmată de încălzirea materialului omogenizat timp de 3 ore la 85°C; adăugarea peste suspensia de material lignocelulozic ultra-omogenizat a 2 părți inocul fungic peletizat, care conține tulpini biostimulante de *Trichoderma*, și incubarea timp de 96 ore sub agitare, la o temperatură de 35°C; după 96 ore separarea supernatantului de materialul lignocelulozic recalcitrant cu biomasă de *Trichoderma*; utilizarea supernatantului pentru fermentare cu tulpini de *Paenibacillus*, timp de 96 ore, la 35°C, pH 7.0, agitare 30 rpm, pentru a produce de (2*R*,3*R*) 2,3 butandiol; separarea (2*R*,3*R*) 2,3 butandiol de mediul de cultură prin distilare extractivă cu acid oleic și uscarea suspensiei rămase în blazul de distilare, care conține bacterii formatoare de endo-spori, prin pulverizare, la o temperatură de intrare de 140-150°C și la o temperatură de ieșire de 80-85°C.

2. Procedeu de zaharificare și fermentație secvențial simultană pentru producerea de 2,3 butandiol din material lignocelulozic conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** inoculul fungic peletizat se obține conform următoarelor etape: cultivarea axenică pe medii minimale lichide, care includ 2% diatomită, la pH optim și la aerări de până la 50% saturație de oxigen, cu varierea temperaturii de incubare cu un interval de 10°C, 12 ore la 20°C și 12 ore la 30°C, timp de 3-5 zile; recoltarea biomasei de microorganisme și a diatomitei prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar; uscarea biomasei de microorganisme și a diatomitei, recoltate prin filtrare, până la max. 5% umiditate reziduală; omogenizarea a 9-11 părți biomasă de microorganisme și diatomită, cu 1,5-2,5 părți lignosulfonat de sodiu, 2,2-2,4 părți lecitină, 84,3-87,1 părți de substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus*, uscat până la 14% umiditate reziduală și măcinat la o granulație de 1-2 mm, părțile fiind exprimate în unități de masă; compactarea amestecului biomasă microorganism – diatomită – lignosulfonat de sodiu – lecitină – substrat epuizat de la cultivarea

ciupercilor *Pleurotus*, prin presare într-o presă de peleți cu matrițe orizontale, pentru a forma peleți cu lungimea de aprox. 15 mm și diametrul de 5...8 mm.

3. Procedeu de zaharificare și fermentație secvențială simultană pentru producerea de 2,3 butandiol din material lignocelulozic conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul recalcitrant cu spori de *Trichoderma* se usucă și se utilizează ca biostimulant pentru plante, ca tratament al solului.

4. Procedeu de zaharificare și fermentație secvențială simultană pentru producerea de 2,3 butandiol din material lignocelulozic conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** pulberea cu tulpini de *Paenibacillus* se formulează pentru aplicări foliare sau de sol, ca biostimulant pentru plante.