



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00841

(22) Data de depozit: 29/12/2022

(41) Data publicării cererii:  
28/04/2023 BOPI nr. 4/2023

(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,  
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• POPA DARIA GABRIELA,  
STR. BISTRIȚEI, NR.2, PLOIEȘTI, PH, RO;  
• DEȘLIU-AVRAM MĂLINA, STR.GĂRLENI  
NR.4, BL.C85, SC.A, ET.6, AP.40,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **COMPOZIȚIE DE ENZIME PENTRU ALBIREA  
SEMICELULOZEI ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de enzime pentru albirea semicelulozei și la un procedeu de obținere a acesteia din substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor lignocelulozice. Compoziția conform invenției este alcătuită din următoarele componente exprimate în procente masice: 52...54% substanță uscată, din care 23...27% proteine, și restul până la 100% apă și are o activitate endo - 1,4 - β - glucanazică de 120,2...160,4 unități/mg proteină, endo - 1,4 - β - xilanazică de 625...743, 6 unități/mg proteină, pectat liazică de 87,3...105,6 unități/mg proteină și feruloil - esterazică de 18,4...27,2 unități/mg proteină. Procedeu de obținere conform invenției constă în curățarea și măcinarea resturilor de material lignocelulozic, omogenizarea materialului lignocelulozic cu lignosulfat de Ca, sterilizarea și umectarea substratului cu apă clocotită, inocularea materialului cu inocul de ciuperci lignocelulozice,

introducerea materialului răcit și inoculat în saci de polietilenă și cultivarea la o temperatură cuprinsă între 24...28°C timp de 3 săptămâni, cu umectarea substratului la fiecare 3 zile cu 10 ml de apă/90 grame substrat, urmată de introducerea corpurilor de fructificație și recoltarea celor trei valuri timp de 2 săptămâni, separarea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor și uscarea acestuia prin presare pe o presă cu șnec pentru deshidratarea materialului umed, ultrafiltrarea tangențială a suspensiei rezultate pentru separarea și concentrarea proteinelor cu activitate enzimatică, iar în final are loc concentrarea retentatului până la o vâscozitate de 250 mPa.s care corespunde unei concentrații cuprinse între 52...54% substanță uscată, din care 23...27% proteine.

Revendicări: 3

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).



8

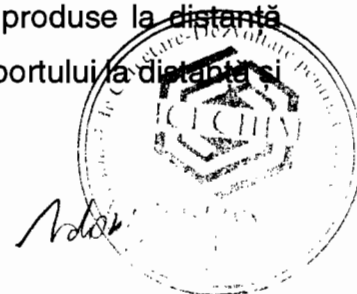
## COMPOZIȚIE DE ENZIME PENTRU ALBIREA SEMICELULOZEI ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la o compoziție de enzime destinată albirii semicelulozei obținute prin procedeul sulfat și la un procedeu de obținere a acesteia din substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor lignocelulozice.

Sunt cunoscute diferite compoziții de enzime destinate albirii semicelulozei obținute prin procedeul sulfat. În ultimele două decenii, albirea semicelulozei - procesul de îndepărtare a ligninei pentru a produce semiceluloza complet albă, a devenit o problemă majoră de mediu datorită conștientizării pericolului compușilor organoclorurați (Iglesias et al. 2020, *Forest Products Journal*, 70(1), 10-21). Pentru a reduce și mai mult impactul asupra mediului au fost propuse o serie de tehnologii enzimatică, în care sunt utilizate hidrolaze care acționează asupra hemicelulozelor și acizilor hexuronici (xilanază, pectinaze / poligalacturonaze), enzime lignolitice (lignin peroxidază, mangan peroxidază, laccază) sau esteraze care acționează asupra porțiunilor esterificate care ancorează hemicelulozele de lignină – ca de ex. feruloil-esteraza.

Brevetul US9677053 B2 protejează o secvență polipeptidică cu activitate laccazică (EC 1.10.3.2), care este utilizată împreună cu TEMPO pentru albirea celulozei. Brevetul FR3028262 B3 protejează o secvență de endo-1,4-beta-xilanaze (EC 3.2.1.8) termorezistentă destinată albirii celulozei. Brevetul EP1268927 B1 prezintă un procedeu de albire în care este folosită laccază (EC 1.10.3.2) produsă de *Polyporus pinsitus*. Cererea de brevet WO2015039962 se referă la un procedeu pentru albirea și/sau scăderea numărului kappa a unei paste de hârtie, care cuprinde punerea în contact a pastei de hârtie cu o enzimă activă asupra carbohidraților din clasa GH78, produsă de *Xylaria polymorpha*, care are o activitate feruloilesterazică (EC 3.1.1.73) și rhamnozidazică (EC 3.2.1.40). Cererea de brevet WO2006047713 descrie un procedeu de albire a celulozei, respectiv semicelulozei, produsă prin procedeul Kraft, respectiv procedeul sulfat, în care este utilizat pentru pretatare înainte de tratamentul oxidativ un amestec de endo-1,4-beta-xilanaze (EC 3.2.1.8) și endo-1,4-beta-manaze (EC 3.2.1.78).

Dezavantajele comune ale utilizării enzimelor comerciale produse la distanță sunt determinate de: (i) costurile economice și ecologice ale transportului la distanță și



4

(ii) necesitatea adaptării procedului de utilizare a enzimelor la specificul diferitelor tipuri de celuloză / semiceluloză.

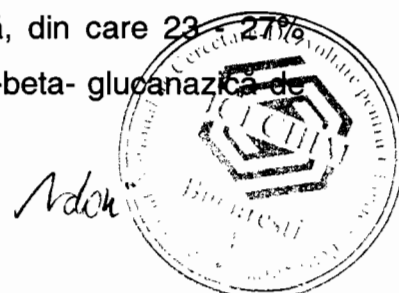
O soluție pentru contracararea acestor dezavantaje este producerea de enzime în apropierea instalațiilor de producere celuloză, prin cultivarea diferitelor tipuri de macromicete lignocelulozolice pe deșeurile lignocelulozice rezultate de la fabricarea celulozei. Brevetul EP2078755 B1 prezintă un procedeu de extracție și purificare a enzimelor (piranoz-dehidrogenază, xilanază, pectinază, protează și laccază), a proteinelor legate de polizaharide și a lectinelor și a altor compuși bioactivi (alcaloizi, antibiotice și terpeni) din diferite co-produse ale culturii ciupercilor – substrat epuizat ciuperci, butoni, corpi de fructificație degradați. Mai multe specii de ciuperci pot fi utilizate în acest scop, fiind exemplificate prin *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Cordyceps sinensis*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Poria cocos*, *Polyporus umbellatus*, *Hericium erinaceus*, *Auricularia auricular* și *Coriolus versicolor*. Procedeu implică etape de extracție, precipitare, separare centrifugală și gel-cromatografie.

Brevetul KR101458628 B1 se referă la un procedeu de obținere a unor enzime care zaharifică biomasa, xilanaze, celulaze și laccaze, din substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor lignocelulozolice, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Filammulina velutipes*, *Lentinus edodes*. Procedeu implică extracția enzimelor în diferite tipuri de solvenți – apă, 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, 0,01-0,1M 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.

Dezavantajul comun al acestor procedee este determinat de costurile de operare ridicate, determinate de extracția urmată de operații de purificare a enzimelor, respectiv de etape succesive de introducere și de eliminare solvenți apoși.

Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este realizarea unui procedeu prin care să se obțină un amestec enzimatic pentru pretratamentul de albire, adaptat la specificul diferitelor tipuri de celuloză / semiceluloză, printr-un procedeu care să nu implice etape de extracție.

Compoziția este alcătuită din 52-54% substanță uscată, din care 23-27% proteine, și restul până la 100% apă, are o activitate endo-1,4-beta- glucanazică de



6

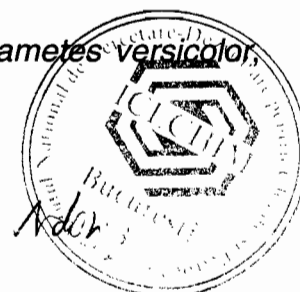
120,2-160,4 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -manazică de 35,4 – 49,3 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -xilanazică de 625 – 743,6 unități per mg proteină, pectat liazică de 87,3 – 105,6 unități per mg proteină și feruloil-esterazică de 18,4- 27,2 unități per mg proteină.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Curățarea și măcinarea resturilor de material lignocelulozic rămas de la fabricarea chipsurilor pentru producerea pasteii de semiceluloză până la dimensiuni de 3-5 mm;
- Omogenizarea materialului lignocelulozic cu lignosulfonat de calciu, 2 grame lignosulfonat de calciu la 98 grame de material lignocelulozic;
- Sterilizarea și umectarea substratului cu apă clocotindă, în raport de 30 ml apă clocotindă la 70 grame substrat și inocularea materialului cu inocul de ciuperci lignocelulozololitice, în raport 10 ml inocul cu  $10^8$  spori/ml la 90 grame de substrat umectat;
- Introducerea materialului răcit și inoculat în saci de polietilenă de 10 litri care au găuri circulare de cca 2 cm pe laterala mediană a sacilor și cultivarea la 24-28°C timp de 3 săptămâni, cu umectarea substratului la fiecare 3 zile cu 10 ml apă la 90 grame substrat;
- Inducerea corpiilor de fructificație prin reducerea temperaturii la 16-18°C și iluminare 12 ore pe zi cu o intensitate de min. 250  $\mu$ moli fotoni  $m^{-2}.s^{-1}$  și recoltarea celor trei valuri timp de 2 săptămâni;
- Separarea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor și uscarea acestuia prin presare pe o presă cu șnec pentru deshidratarea materialului umed;
- 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 și concentrarea proteinelor cu activitate enzimatică;
- Concentrarea retentatului la 40-45°C și -400 mbar, până la o vâscozitate de 250 mPa.s, care corespunde unei concentrații de 52-54% substanță uscată, din 23 - 27% proteine.

Resturile de material lignocelulozic provin de la plop, *Populus alba*, fag, *Fagus sylvatica*, carpen, *Carpinus betulus*, salcie, *Salix alba*.

Macromicetele care se cultivă sunt *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius* sau *Ganoderma lucidum*.



5

Procedeul descris conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Permite producerea enzimelor pentru albirea semicelulozei prin valorificarea subproduselor de la producerea pastei de semiceluloză, într-o unitate de producție care poate fi amplasată în apropierea fabricilor de semiceluloză, reducând costurile de transport;
- ✓ Adaptează structura enzimelor produse de către macromicetele lignocelulozolitice la specificul materiei prime din care este produsă semiceluloză, datorită cultivării macromicetelor pe același tip de material;
- ✓ Înlocuiește etapele de extracție enzime, urmată de separarea lor de solvenții apoși, printr-o etapă de deshidratare prin presare a substratului epuizat;
- ✓ Produce prin presare un material compozit care poate procesat ulterior în plăci compozite aglomerate prin presare la cald.

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

*Exemplu 1.* Resturile de material lignocelulozic rămas de la fabricarea chipsurilor de plop, *Populus alba*, pentru producerea pastei de semiceluloză sunt curățate prin spălare în jet de apă de pământ și de nisip și sunt măcinate pe o moară cu cuțite (de ex. Willey model 4, Thomas, Thermo Fischer, Waltham, MA, SUA), prevăzută cu o sită de 5 mm, rezultând particule de lemn cu dimensiuni de 3-5 mm. Se amestecă 98 g resturi lignocelulozice măcinate cu 2 g de lignosulfonat de calciu (de ex. într-un amestecător de pulberi Mini Cyclomix, Hosokawa Micron, Doetinchem, Olanda).

Lignosulfonatul folosit este Borresperse NA (Borregarrd, Sarspborg, Norvegia), cu următoarele caracteristici: substanță uscată min. 93%; calciu max. 4,6%, pH (soluție 10%)  $8,3 \pm 0,8$ , dar orice alt lignosulfonat cu caracteristicile de mai sus poate fi utilizat.

3,5 kg de amestec omogen resturi lignocelulozice măcinate - lignosulfonat de calciu se trec într-un vas de inox steril de 10 litri și se aseptizează și se umectează cu 1,5 litri apă clocotindă. Se omogenizează cu o baghetă de oțel inox sterilizată și apoi se inoculează cu inocul de ciuperci lignocelulozolitice. La cele 5 kg de material umectat se adaugă 555 ml de inocul cu  $10^8$  spori/ml *Pleurotus ostreatus*, în raport 10 ml inocul la grame de substrat umectat.

Materialul răcit și inoculat se introduce în saci de polietilenă de 10 litri care au găuri circulare de cca 2 cm pe laterala mediană a sacilor. Se menține sacul cu material inoculat la 24-28°C timp de 3 săptămâni, pentru cultivarea macromicetelor. Se



4

umectează prin stropire cu câte 615 ml apă la fiecare 3 zile. Se induc corpi de fructificație prin reducerea temperaturii la 16-18°C și iluminare 12 ore pe zi cu o intensitate de 250  $\mu\text{moli fotoni m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (generată cu o lampă LED de 1000 W). Se recoltează cele trei valuri timp de 2 săptămâni. Se separă substratul epuizat de la cultivarea ciupercilor și se usucă acesta prin presare pe o presă cu șnec (de ex. CP-4, Vincent, Tampa, Florida) pentru deshidratarea materialului umed. Rezultă 600 mL de lichid, care se ultrafiltrează tangențial pe un sistem de ultrafiltrare Cogent M1 (Merck Group, Darmstadt, Germania), prevăzut cu 1 modul Biomax, cu membrană de polietersulfonă, cu pragul de excludere de 15 kDa și cu o suprafață de 50 cm<sup>2</sup>. Se operează la un debit pe minut care reprezintă 1% din volumul vasului de alimentare, respectiv 92 mL/min și la o diferență de presiune de 140 kPa, pentru separarea proteinelor cu activitate enzimatică. Se concentrează retentatul la 40-45°C și -400 mbar, prin concentrare la un evaporator rotativ sub vid (Rotavapor® R-300, Buchi, Flawil, Elveția) Se continuă până la o vâscozitate de 250 mPa.s, (determinată cu un vascozimetru digital, ca de ex. Atago 6800 Digital Viscometer VISCO™, Atago, Saitama, Japonia) care corespunde unei concentrații de 52 % substanță uscată, (verificată refractometric, cu refractometru digital HI 96801, Hanna Instruments, Cluj Napoca, România). Se determină concentrația de proteine prin metoda Dumas și un analizor elemental (de ex. FlashSmart™ Elemental Analyzer, Thermo Fisher, Waltham, MA, SUA). Rezultă un conținut de 23% proteine.

În concentrat se determină activitatea enzimatică folosind kit-uri Megazyme. Compoziția rezultată are o activitate endo-1,4-beta- glucanazică de 120,2 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -manazică de 49,3 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -xilanazică de 625 unități per mg proteină, pectat liazică de 92,2 unități per mg proteină și feruloil-esterazică de 18,4 unități per mg proteină.

O unitate de activitate glucanază este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea unui  $\mu\text{mol}$  de echivalent zaharuri reducătoare pe minut din  $\beta$ -glucan de orz (5 mg/ml) în tampon de fosfat de sodiu (100 mM), pH 6,5 la 40°C.

O unitate de activitate endo-1,4- $\beta$ -manazică este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea unui  $\mu\text{mol}$  de echivalent zahăr reducător de manoză pe minut din galactomanan de roșcove (10 mg/ml) în tampon de acetat de sodiu (100 mM), pH 4,0 la 40°C



O unitate de activitate pectat-liazică este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea unui  $\mu\text{mol}$  de acid galacturonic din acid poligalacturonic (2,5 mg/ml) pe min în tamponul Tris.HCl (50 mM), pH 8,0 la 40°C.

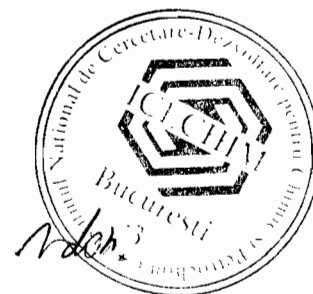
O unitate de activitate endo-1,4- $\beta$ -xilanazică este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea unui  $\mu\text{mol}$  de echivalent zahăr reducător de xiloză pe minut din arabinoxilan de grâu (5 mg/ml) în tampon de fosfat de sodiu (100 mM), pH 6,0.

O unitate de activitate feruloil-esterazică este definită ca cantitatea de enzimă necesară pentru a elibera un  $\mu\text{mol}$  de acid ferulic pe minut din etil-ferulat (0,39 mM) în tampon de fosfat de sodiu (100 mM), pH 6,5 la 40°C.

*Exemplul 2.* Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se lucrează cu resturi de material celulozic de fag, *Fagus sylvatica*, care se inoculează cu *Trametes versicolor*. Se obține un concentrat cu 54% substanță uscată, din 27% proteine, și restul până la 100% apă. Concentratul are o activitate endo-1,4-beta-glucanazică de 160,4 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -manazică de 35,4 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -xilanazică de 743,6 unități per mg proteină, pectat liazică de 87,3 unități per mg proteină și feruloil-esterazică de 27,2 unități per mg proteină.

*Exemplul 3.* Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se lucrează cu resturi de carpen, *Carpinus betulus*, care se inoculează cu *Fomes fomentarius*. Se obține un concentrat cu 53,2% substanță uscată, din 25,3% proteine, și restul până la 100% apă. Concentratul are o activitate endo-1,4-beta- glucanazică de 147,3 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -manazică de 44,6 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -xilanazică de 736,4 unități per mg proteină, pectat liazică de 90,7 unități per mg proteină și feruloil-esterazică de 24,3 unități per mg proteină.

*Exemplul 4.* Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se lucrează cu resturi de salcie, *Salix alba*, care se inoculează cu *Ganoderma lucidum*. Se obține un concentrat cu 53,6% substanță uscată, din 25,3% proteine, și restul până la 100% apă. Concentratul are o activitate endo-1,4-beta- glucanazică de 137,5 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -manazică de 42,3 unități per mg proteină, endo-1,4- $\beta$ -xilanazică de 704,8 unități per mg proteină, pectat liazică de 105,6 unități per mg proteină și feruloil-esterazică de 23,7 unități per mg proteină.



## Revendicări

1. Compoziția enzime destinată albirii semicelulozei obținute prin procedeul sulfat **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 52-54% substanță uscată, din care 23 - 27% proteine, și restul până la 100% apă, are o activitate endo-1,4-beta- glucanazică de 120,2-160,4 unități per mg proteină, endo-1,4-β-manazică de 35,4 – 49,3 unități per mg proteină, endo-1,4-β-xilanazică de 625 – 743,6 unități per mg proteină, pectat liazică de 87,3 – 105,6 unități per mg proteină și feruloil-esterazică de 18,4- 27,2 unități per mg proteină.
2. Procedeul de obținere a compoziției conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: curățarea și măcinarea resturilor de material lignocelulozic rămas de la fabricarea chipsurilor pentru producerea pastei de semiceluloză până la dimensiuni de 3-5 mm; omogenizarea materialului lignocelulozic cu lignosulfonat de calciu, 2 grame lignosulfonat de calciu la 98 grame de material lignocelulozic; sterilizarea și umectarea substratului cu apă clocotindă, în raport de 30 ml apă clocotindă la 70 grame substrat și inocularea materialului cu inocul de ciuperci lignocelulozolitice, în raport 10 ml inocul cu  $10^8$  spori/ml la 90 grame de substrat umectat; introducerea materialului răcit și inoculat în saci de polietilenă de 10 litri care au găuri circulare de cca 2 cm pe laterala mediană a sacilor și cultivarea la 24-28°C timp de 3 săptămâni, cu umectarea substratului la fiecare 3 zile cu 10 ml apă la 90 grame substrat; inducerea corpiilor de fructificație prin reducerea temperaturii la 16-18°C și iluminare 12 ore pe zi cu o intensitate de min.  $250 \mu\text{moli fotoni m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  și recoltarea celor trei valuri timp de 2 săptămâni; separarea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor și uscarea acestuia prin presare pe o presă cu șnec pentru deshidratarea materialului umed; 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 și concentrarea proteinelor cu activitate enzimatică; concentrarea retentatului la 40-45°C și -400 mbar, până la o vâscozitate de 250 mPa.s, care corespunde unei concentrații de 52-54% substanță uscată, din 23 - 27% proteine.
3. Procedeul de obținere a compoziției conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că** resturile de material lignocelulozic provin de la plop, *Populus alba*, fag, *Fagus sylvatica*, carpen, *Carpinus betulus*, salcie, *Salix alba*, iar macromicetele care se cultivă sunt *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius* sau *Ganoderma lucidum*.

