



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00004

(22) Data de depozit: 06.01.2009

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

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

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

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

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

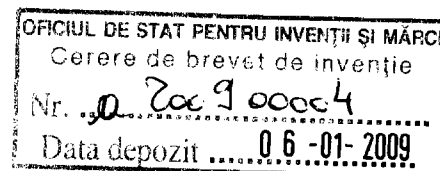
(57) Rezumat:

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

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

Revendicări: 1





Descriere invenție

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui preparat enzimatic cu activitate celulozolitica din culturi de *Trichoderma reesei*, capabil să hidrolizeze celuloza, hemiceluloza, amidonul, xilanul și alte polizaharide din plantele energetice (diferite varietăți de porumb, griu, paie coceni, tulpini de *Miscanthus giganteus* etc.) utilizate în fermentația anaerobă în producția de biogaz.

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

Este cunoscut faptul că hidroliza completă a resturilor celulozice din plante și lemn este un proces dificil, nerezolvat pînă în prezent, în special datorită structurii complexe a celulozei, dar și asocierii ei cu alți compusi (în special lignina). Pentru hidroliza acestora există procedee fizice, chimice, enzimatice sau combinate. În prezent se utilizează diverse preparate enzimatice care, în funcție de enzimele componente, realizează diferite grade de hidroliza a materialelor lignocelulozice.

Problema pe care o rezolvă invenția de față este de a stabili succesiunea etapelor de procedeu, precum și a condițiilor tehnice de realizare a acestora astfel încît să se obțină un preparat enzimatic hidrolitic complex, capabil să degradeze componentele existente în plantele energetice, astfel încît, glucidele rezultate în urma hidrolizei să conducă la mărirea randamentului în biogaz, bioetanol.

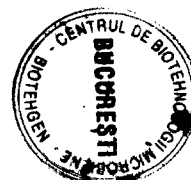
Procedeu, conform invenției, constă în aceea că cuprinde următoarele etape:

- cultivarea submersă, în sistem discontinuu a 10% , în volum, de inocul vegetativ de *Trichoderma reesei* înregistrată în Colectia de Microorganisme a Centrului de Biotehnologii Microbiene-București sub nr. 28 pe un mediu de cultura ce conține, 2,0 % uruiala de porumb (stiulete de porumb tocat integral pînă la dimensiunea particulei de 0,5-1mm), 1,0% srot de soia, 0,3% azotat de sodiu, 0,2 % fosfat acid de potasiu, 0,1% sulfat de magneziu, 0,05% clorura de potasiu, 0,01% sulfat de feros, procente în volum, în condiții de temperatură: 30-31°C, agitare constantă la 220 rpm, aer și presiune variabile, astfel încît conținutul de oxigen dizolvat în mediu să nu scadă sub 50% timp de 96 ore de la inoculare.

- prelucrarea mediului de cultura care include separarea biomasei și concentrarea prin ultrafiltrare a lichidului enzimatic pe un modul cu un randament al activității amilolitice de 80-82%, celulozolitice de 88-90% și xilanazice de 86-88%, rezultând un concentrat enzimatic din care la faza de condiționare prin precipitare cu sulfat de amoniu, la 70% saturatie, se obține preparatul enzimatic brut de *Trichoderma reesei*, la un randament de 33% , de culoare alb gri, netoxic, cu activitate celulozică, amilazică și xilanazică după cum urmează:

- activitate celulozică specifică de 2,1 U/mg proteină
- activitate xilanazică specifică de 17,35 U/mg proteină
- activitate amilazică specifică de 2,66 U/mg proteină

Preparatul enzimatic obținut este activ în domeniul de pH 5,5-6,5 și temperatura: 35-50°C.



SA

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

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

Exemplu

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

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

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

b) Prelucrarea mediului de cultura

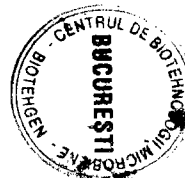
La sfirsitul bioprocesului dupa 90-96 ore cultivare a producatorului se efectueaza prelucrarea mediului de cultura in urmatoarele faze:

b1) Separarea biomasei de *Tricoderma reesei* prin filtrare pe filtru Nutsche, cu adaugare de adjuvant de filtrare 0,1%(Perlita), viteza medie de filtrare $30 \text{ l/m}^2/\text{h}$

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

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

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



SPY

Revendicare

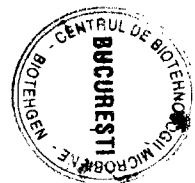
Procedeu de obtinere a unui preparat enzimatic hidrolitic (celulaze, amilaze, xilanaze) din culturi de *Trichoderma reesei*, caracterizat prin aceea ca, cuprinde urmatoarele etape:

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

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

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

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



S. M. I.