



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **409138**

(22) Data zgłoszenia: **08.08.2014**

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

C02F 3/34 (2006.01)

C12P 1/02 (2006.01)

(54) **Nowy szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11,
sposób otrzymywania biopreparatu do fermentacji metanowej odpadów organicznych
z wykorzystaniem tego szczepu oraz sposób prowadzenia fermentacji metanowej
odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

15.02.2016 BUP 04/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.05.2018 WUP 05/18

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT AGROFIZYKI IM. BOHDANA
DOBRZAŃSKIEGO POLSKIEJ AKADEMII
NAUK, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAGDALENA FRĄC, Markuszów, PL
AGATA GRYTA, Lublin, PL
KAROLINA OSZUST, Kolonia Chruślina, PL
ANNA SICZEK, Majdan Kozic Górnych, PL
NINA BILIŃSKA, Lublin, PL
KRZYSZTOF ZIEMIŃSKI, Łódź, PL
ANNA PAWLIK, Lublin, PL
GRZEGORZ JANUSZ, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Magdalena Tarała

Opis wynalazku

Nowy szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11, sposób otrzymywania biopreparatu do fermentacji metanowej odpadów organicznych z wykorzystaniem tego szczepu oraz sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu.

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11 wytwarzający, w zoptymalizowanych warunkach prowadzenia hodowli, zwiększoną ilość enzymów litycznych. Przedmiot wynalazku stanowi także sposób otrzymywania biopreparatu do optymalizacji fermentacji metanowej mieszanki odpadów organicznych z wykorzystaniem płynu po hodowli tego szczepu, a także sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu.

Roślinna biomasa odpadowa powstająca podczas produkcji rolno-spożywczej i rolniczej jest problemem na skalę światową. Jednocześnie utylizacja odpadów tego typu może stanowić źródło energii odnawialnej. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych sposobów utylizacji organicznej masy odpadowej jest fermentacja metanowa. Proces polega na beztlenowym rozkładzie związków organicznych. Ubocznym produktem tego rozkładu jest mieszanina różnych gazów zwana biogazem. Ilość wytwarzanego biogazu zależy od kilku czynników wzajemnie się uzupełniających lub wpływających na siebie. Wydajność procesu jest w głównej mierze uzależniona od rodzaju i jakości substratu, który poddawany jest fermentacji, a w szczególności, od proporcji związków organicznych w 1 g suchej masy, zawartości azotu czy pH środowiska.

W procesie fermentacji metanowej najczęściej stosowana jest kofermentacja, która wykorzystuje mieszaninę bioodpadów pochodzących z różnych źródeł. Wspólna fermentacja pozwala na uzyskanie odpowiedniego uwodnienia masy fermentacyjnej, poprawę bilansu pierwiastków biogenych czy też wzrost ładunku łatwo biodegradowalnej materii, co przyczynia się do stabilniejszego przebiegu procesu, a także umożliwia uzyskanie efektu synergii, co zwiększa skuteczność rozkładu masy organicznej i w rezultacie wydajność biogazu.

Jednym z kluczowych etapów procesu fermentacji metanowej jest rozkład celulozy zawartej w biomacie roślinnej, w tym w bioodpadach. Ponieważ celuloza jest substratem wysokoenergetycznym, to brak rozkładu celulozy ogranicza produkcję metanu. Wysoki stopień hydrolizy celulozy występującej w bioodpadach wymagany jest do zwiększenia wydajności produkcji biogazu. Dlatego też poszukiwanie szczepów bakterii i grzybów, posiadających uzdolnienia do degradacji tego polimeru jest elementem strategicznym procesu fermentacji metanowej. Celuloza jest biopolimerem, w rozkładzie którego uczestniczy efektywny układ enzymatyczny, złożony z hydrolaz typu endo- i egzoglukanaz oraz β -glukozydazy.

Znanym efektywnym producentem celulaz są grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Oprócz celulaz, grzyby *Trichoderma* zdolne są do produkcji enzymów takich jak: ksylanazy, pektynazy, β -1,3-glukanazy, chitynazy i proteazy – M. Szczech, *Grzyby Trichoderma – dlaczego warto się nimi zainteresować?* 2010, publ.: http://trichoderma.inhort.pl/?d=informacie_o_trichoderma&id=117 (29/07/2014).

W publikacji „Aktywność celulolityczna wybranych szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma*” (R. Marecik, P. Cyplik, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu) z dnia 29/07/2014, dostępnej pod adresem <http://www.imp.gda.pl/BF2012/prezentacje/p112.pdf> przedstawiono wyniki analizy zdolności grzybów z rodzaju *Trichoderma* do rozkładu celulozy. Badaniom poddano 121 szczepów grzybów należących do gatunków: *T. viridescens*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride*, *T. koningi*, *T. pseudokoningi*, *T. citrinoviride*, *T. hamatum* i *T. harzianum*. Etap namnażania przeprowadzono na podłożu płynnym Potato dextrose broth (Conda pronadisa S.A.). Hodowlę prowadzono na wytrząsarce rotacyjnej (100 rpm) przez 5 dni w temperaturze 25°C. W etapie indukcji syntezy enzymów celulolitycznych poprzez wzrost grzybni na pożywce, jako jedyne źródło węgla, zastosowano 1% roztwór karboksymetylocelulozy (CMC). Hodowlę indukcyjną prowadzono przez okres 5 dni w warunkach analogicznych do warunków hodowli namnażającej. W efekcie przeprowadzonych doświadczeń wyselekcjonowano szereg szczepów o dużej aktywności celulolitycznej, przewyższającej aktywność szczepu referencyjnego, którym był *Trichoderma reesei*. Wśród badanych grzybów największą aktywność celulolityczną obserwowano dla szczepów należących do gatunków *T. harzianum* i *T. virens*. Dostrzeżono potencjał wybranych grzybów z rodzaju *Trichoderma* do zwiększenia wydajności produkcji biopaliw z materiału ligninocelulozowego.

W opisie patentowym JPS55156590 przedstawiono sposób przygotowywania celulazy poprzez zaszczepienie i hodowlę grzybów produkujących celulazę w osadzie z fermentacji metanowej substratów organicznych zawierających celulozę i oddzieleniu nagromadzonej celulazy od pozostałości.

Stosowano grzyby należące do rodzaju *Trichoderma* albo *Aspergillus* a wytwarzanie celulazy prowadzono na podłożu płynnym albo stałym.

W opisie patentowym CN102925365 przedstawiono zastosowanie szczepu *Trichoderma atroviride* B-8-1-34 do produkcji celulaz, wykorzystujące odpady przemysłowe i rolnicze w połączeniu z takimi surowcami jak otręby, zawiesina kukurydziana i mączka sojowa i stosując fermentację ciekłą albo stałą.

Znanymi substratami charakteryzującymi się wysoką wydajnością biogazu jest kiszonka kukurydzy i wywar zbożowy. Natomiast odpadem organicznym obecnym na lokalnym rynku w znacznych ilościach i przez to łatwo dostępnym przez cały rok są odpady pochodzące z przetwórstwa owocowego. Dla ich efektywnego wykorzystania w fermentacji metanowej potrzebna jest obecność enzymów pektynolitycznych, które przyspieszają ich degradację, ułatwiając rozwój bakterii metanogennych w masie fermentacyjnej.

Jednymi z najlepiej poznanych i szeroko opisanych producentów enzymów pektynolitycznych są szczepy grzyba *Aspergillus sp.* Jednakże praktyczne zastosowanie pektynolitycznych enzymów grzybowych wymaga znacznej intensyfikacji procesów biosyntezy, które są bezpośrednio związane z warunkami hodowli, a przede wszystkim ze składem podłoża hodowlanego.

Pomimo licznych publikacji, donoszących o szczepach mikroorganizmów, będących dobrymi producentami pożądaných enzymów, na krajowym rynku brakuje biopreparatów wykorzystujących ich możliwości do prowadzenia zoptymalizowanego procesu fermentacji metanowej. Dostępne biopreparaty wykazują wąskie spektrum działania, przez co stosownie ich w złożonym procesie fermentacji metanowej łatwo dostępnych odpadów jest utrudnione. Zakup biopreparatów zagranicznych wiąże się także z wysokim kosztem. Problemem jest ponadto to, że znane szczepy mikroorganizmów wykazujące najbardziej pożądaną aktywność celulolityczną, nie wykazują dostatecznej aktywności innych, również ważnych enzymów litycznych, bądź też nie są znane odpowiednie warunki prowadzenia ich hodowli, by te aktywności uzyskać.

Celem wynalazku było zatem dalsze poszukiwanie szczepu grzyba syntezującego odpowiednie enzymy lityczne o wysokiej aktywności, które przydatne byłyby do otrzymania biopreparatu do fermentacji metanowej odpadów łatwo dostępnych w dużych ilościach na lokalnym rynku, takich jak np. odpady przetwórstwa owocowego, które dostępne są na bieżąco przez cały rok. Wyselekcjonowany mikroorganizm powinien posiadać uzdolnienia do degradacji zawartych w poddawanych fermentacji substratach, złożonych związków organicznych, takich jak polisacharydy, w tym celulozy i pektyny oraz białka i tłuszcze. Celem wynalazku było także opracowanie sposobu otrzymywania biopreparatu stosującego enzymy produkowane przez wyselekcjonowany szczep grzyba, poprzez skomponowanie dla niego takiego podłoża hodowlanego oraz określenie takich warunków prowadzenia hodowli, które nasiliłyby produkcję pożądaných enzymów. Wynalazek miał ponadto na celu określenie sposobu prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu.

Nieoczekiwanie, w trakcie badań nad szczepami grzybów występującymi w osadach z oczyszczalni ścieków mleczarskich, które to osady stanowiły jeden z substratów mieszanki do prowadzenia fermentacji metanowej, okazało się, że wyizolowany i zidentyfikowany szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11, na odpowiednio skomponowanym podłożu i w odpowiednich warunkach prowadzenia hodowli nadaje się do jednoczesnej syntezy różnorodnych enzymów litycznych. Wyniki badań wykorzystano do opracowania biopreparatu do fermentacji metanowej odpadów organicznych z wykorzystaniem tego szczepu oraz określono sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu.

Istotę wynalazku stanowi nowy szczep *Trichoderma atroviride* G79/11 zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2056p, wyselekcjonowany z osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich, wytwarzający jednocześnie następujące enzymy lityczne o wysokiej aktywności: celulaz, ksylanaz i β -glukozydazy oraz towarzyszącej aktywności: laktazy, enzymów pektynolitycznych, amylazy i proteazy, stosowany do otrzymywania biopreparatu do optymalizacji fermentacji metanowej.

Szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11 przechowuje się w temperaturze 4°C na stałym podłożu PDA (Potato Dextrose Agar), korzystnie z comiesięcznym pasażowaniem. Dla długoterminowego przechowywania zamraża się dobrze zarodnikującą grzybnię wraz z podłożem PDA w temperaturze -55°C lub przechowuje się szczep w postaci zliofilizowanej. Grzybnia powinna być dwutygodniową hodowlą na pożywce stałej PDA. Taka grzybnia stanowi inokulum 1. Materiał wycina się

z płytki Petriego, umieszcza w kriowialkach i szczelnie zalewa sterylnym glicerolem. By inokulum 1 było dobrze zarodnikujące, hodowlę, od zaszczepienia poprzez jednorazowe wkłucie, należy prowadzić przez 17–20 dni w temperaturze 27°C.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania biopreparatu do fermentacji metanowej odpadów organicznych z wykorzystaniem szczepu grzyba z gatunku *Trichoderma atroviride*, polegający na hodowli tego szczepu na odpowiednio skomponowanym podłożu oraz prowadzeniu jej w zoptymalizowanych warunkach charakteryzujący się tym, że stosuje się szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11, który namnaża się w hodowli stacjonarnej – inokulum 2, w warunkach tlenowych, przy pH 4,8–5,1, w temperaturze 27°C w czasie 14–20 dni, korzystnie 17 dni. Hodowlę prowadzi się na podłożu zawierającym w 1,0 l: jako źródło węgla: laktozę w ilości 17–18 g/l, celulozę mikrokrystaliczną w ilości 11–12 g/l oraz mąkę sojową w ilości 17–18 g/l, jako źródło fosforu: KH_2PO_4 w ilości 6–7 g/l, natomiast jako źródło azotu: $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ w ilości 9–10 g/l i ponadto stosuje się $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,5–1 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,5–1 g/l, agar w ilości 25–35 g/l oraz roztwór mikroelementów w ilości 20 ml/l. Hodowlę korzystnie ekspozuje się na światło białe w drugim tygodniu, a następnie zaszczepia się tak namnożonym inokulum 2 z 1 płytki Petriego o średnicy 90 mm na 12 ml lub 9 płytek Petriego o średnicy 90 mm na 400 ml podłoże produkcyjne i prowadzi hodowlę we wglębnej hodowli wytrząsanej. Podłoże produkcyjne w 1,0 l ma skład: laktoza w ilości 4,5–5,5 g/l, celuloza mikrokrystaliczna – zawierająca minimum 50% cząstek o wielkości $>32 \mu\text{m}$ w ilości 9,5–10,5 g/l oraz mąka sojowa w ilości 19,5–20–5 g/l jako źródło węgla, KH_2PO_4 w ilości 6–7 g/l jako źródło fosforu, natomiast jako źródło azotu stosuje się NH_4NO_3 w ilości 2,50 g/l. Ponadto stosuje się $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,82 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ w ilościach analogicznych, jak przy hodowli stacjonarnej, oraz Tween 80 – 0,14–16%, roztwór mikroelementów w ilości 20 ml/l, wodę demineralizowaną w ilości do 1 l, emulsję Antifoam B – 4,5–5,5 ml/l. Hodowlę prowadzi się ponadto w warunkach tlenowych, przy pH 4,5, w temperaturze 22–27°C, korzystnie 25°C, w czasie 5–10 dni, korzystnie 6 dni, stosując szybkość obrotów wytrząsarki 120–160 rpm. Następnie, po oddzieleniu grzybni od płynu pohodowlanego zagęszcza się supernatant 20-krotnie.

Istotę wynalazku stanowi ponadto sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu, który charakteryzuje się tym, że do fermentacji stosuje się mieszkankę odpadów o składzie: odpady z przetwórstwa owoców – 23–27%, osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich – 23–27%, kiszonka kukurydziana – 11–13% oraz wywar zbożowy – 35–40%, przy czym biopreparat stosuje się w formie płynnej albo zliofilizowanej odpowiednio w dawkach nie mniejszych niż 0,01 cm^3/g s.m.o. lub 0,1 mg/g s.m.o. podawanych bezpośrednio do fermentorów, a fermentację prowadzi się w warunkach mezofilnych.

Wariantowo fermentację metanową odpadów przeprowadza się na mieszkance o analogicznym jak przedstawiono wyżej składzie, z tym, że przed wprowadzeniem do fermentorów, poddaje się ją wstępnej hydrolizie z dodatkiem biopreparatu w formie płynnej albo zliofilizowanej, odpowiednio w dawkach nie mniejszych niż 0,05 cm^3/g s.m.o. lub 0,1 mg/g s.m.o. i hydrolizę prowadzi się w temperaturze 36–50°C.

Wynalazek pozwala na dostarczenie biopreparatu zawierającego jednocześnie enzymy lityczne o wysokiej aktywności: celulaz, ksylanazy, β -glukozydazy oraz enzymów towarzyszących: laktazy, enzymów pektynolitycznych (pektynoesterazy i poligalaktouronazy), amylazy i proteazy. Stosowanie biopreparatu zapewnia wzrost wydajności biogazu oraz optymalizację procesu fermentacji metanowej. W zależności od typu, dawki oraz sposobu zastosowania preparatu uzyskuje się wzrostu wydajności biogazu od około 4% do około 18%. Szczególnie dobre efekty uzyskuje się przeprowadzając wstępną hydrolizę mieszaniny odpadów. Skład biopreparatu pozwala na utylizację i zagospodarowanie łatwo dostępnych odpadów, co znacząco wpływa na koszt produkcji jednostki biogazu – odpady występują w dużych ilościach, można je pozyskać całorocznie, nie ma potrzeby transportowania ich ze znacznych odległości.

Wynalazek uwidoczniony został w przykładach wykonania na rysunkach, gdzie:

Fig. 1 przedstawia szczep *Trichoderma atroviride* G79/11 zaszczepiony na podłożu PDA – inokulum 1;

Fig. 2 przedstawia szczep *Trichoderma atroviride* G79/11 zaszczepiony na podłoże sojowo-celulozowo-laktozowe, przygotowane według wynalazku – inokulum 2;

Fig. 3 przedstawia wpływ pH na działanie biopreparatu, oznaczone według aktywności celulolitycznych;

Fig. 4 przedstawia wpływ temperatury na działanie biopreparatu, oznaczone według aktywności celulolitycznych;

Fig. 5 przedstawia wpływ ekspozycji hodowli na światło białe na poziom aktywności celulolitycznej;
Fig. 6 przedstawia wpływ temperatury prowadzenia hodowli produkcyjnej na poziom uzyskanej aktywności celulolitycznej;

Fig. 7 przedstawia wpływ czasu prowadzenia hodowli we wglębnej hodowli wytrząsanej na podłożu produkcyjnym na poziom uzyskanej aktywności celulolitycznej.

P r z y k ł a d I

Izolacja i identyfikacja szczepu *Trichoderma atroviride* G79/11

Szczep *Trichoderma atroviride* G79/11 zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drob-noustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2056p, wyselekcjonowano z osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich Okręgowej Spółdzielni Mleczarskiej w Krasnymstawie. Wyizolowanie przeprowadzono znanymi metodami poprzez przeprowadzenie wysiewu rozcieńczeń na podłożu selektywnym z różem bengalskim do izolacji drożdży i pleśni oraz 7-dniową hodowlę w temperaturze 25°C. Następnie odszczepiono izolaty grzybów strzępkowych wyrosłe na podłożu i pasażowano je kilkakrotnie na pożywce potatowo-dextroze agar (PDA) uzyskując czyste kultury grzybów.

Szczep poddano badaniom morfologicznym, fizjologicznym i biochemicznym oraz poddano analizie genetycznej w celu ustalenia jego przynależności gatunkowej.

Szczep charakteryzuje się następującymi cechami:

- morfologicznymi – na podłożu PDA (Potato Dextrose Agar) charakteryzuje się wzrostem dywanowym, z zarodnikującą grzybnią koloru od żółto-zielonego do zielono-szarego – inokulum 1. Na podłożu sojowo-celulozowo-laktozowym tworzy powierzchniową, silnie zarodnikującą, niejednorodną grzybnię koloru ciemno-zielonego z białymi przebarwieniami – inokulum 2. Widoczne pod mikroskopem trzonki konidialne grzyba są wielokrotnie rozgałęzione i zebrane w grona. Konidia są jednokomórkowe, kuliste o zróżnicowanej wielkości, gładkie. Takie cechy są charakterystyczne dla grzybów z rodzaju *Trichoderma*.
- fizjologicznymi i biochemicznymi: optymalną temperaturą wzrostu wynoszącą 27°C oraz wzrostem w zakresie pH 3,5–10, optymalnym wzrostem przy pH podłoża 4,5. Szczep charakteryzuje się zdolnością do rozkładu następujących źródeł węgla: α -D-laktozy, L-arabinozy, D-trehalozy, D-mannozy, L-fukozy, D-ksylozy, D-mannitolu, D-rybozy, α -D-glukozy, urydyny, D-celobiozy, kwasu p-hydroksyfenylooctowego, kwasu n-hydroksyfenylooctowego, L-liksozy, kwasu D-galakuronowego, dekstryny, żelatyny, laminaryny, pektyny, D-arabinozy, D-arabitolu, arbutyny, l-erytritoli, gencjobiozy, palatynozy, D-rafinozy, kwasu 2-hydroksybenzoesowego, kwasu chinowego, kwasu sorbowego, dihydroksyacetonu; źródeł azotu: azotanów (III), azotanów (V), mocznika, L-alaniny, L-argininy, L-asparaginy, kwasu L-asparaginowego, kwasu L-glutaminowego, L-glutaminę, glicyny, L-leucyny, L-fenylalaniny, kwasu L-piroglutaminowego, L-proliny, L-seryny, L-waliny, D-waliny, L-homoseryny, L-ornityny, N-amylaminy, etanolaminy, agmatyny, acetamidu, formamidu, glukuronamidu, D,L-laktamidu, mannozoaminy, N-acetylo-D-glukozaaminy, adenozy, guaniny, guanozy, inozy, ksantyny, alantoiny, kwasu parabanowego, kwasu γ -amino N-masłowego oraz źródeł fosforu i siarki: cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu, cyklicznego cytydino-3',5'-monofosforanu, cyklicznego urydino-3',5'-monofosforanu, cyklicznego tymidino-3',5'-monofosforanu, O-fosforo-D-tyrozyny, co potwierdzono na podstawie analiz mikromacierzy fenotypowych (PM) z wykorzystaniem systemu Biolog.

Ponadto, szczep charakteryzuje się zdolnością wzrostu na następujących suplementach: L-glutaminie, kwasie D,L- α -hydroksymasłowym oraz D,L-karnitynie oraz wykazuje zahamowanie wzrostu w obecności: 9% i 10% NaCl, 6% NaCl z dodatkiem L-karnityny, 6% NaCl z dodatkiem trygoneliny, 4%, 5% i 6% mrówczanu sodu oraz 6% i 7% mocznika.

Szczep charakteryzuje się wrażliwością na następujące związki chemiczne: chlorowodorek prometażyny, bromek dodecylotrimetyloamoniowy, dichromian sodu, siarczan miedzi (II), trifluoperazynę, diamid, tiomocznik, chlorek cynku, hydroksamian kwasu L-glutaminowego, kofeinę, hydroksamian L-argininy, hydroksamian glicyny, jodek potasu, 3-amino 1,2,3-triazol, BAPTA, chlorek litu, kwas borowy, benzamidynę, octan talu (I), paromomycynę, chlorek benzetonium, chlorowodorek chlorpromazy, chlorek dekwalinium, chlorowodorek glicyny, chlorowodorek hydroksyloaminy, chlorek chromu (III) sześciowodny, chlorek kobaltu (II) sześciowodny, chlorek miedzi dwuwodny, metaboran sodu dwu-

wodny, nadjodan sodu, azydek sodu, azotan (III) sodu, selenian sodu, chlorowodorek tiurydazyny, ize-tonian pentamidyny, uwodniony chlorek metylu, siarczan glinu, hydroksymocznik, niaproof, fiolet tetra-zoliowy, chlorowodorek amitryptyliny, chlorowodorek mechloretaminy, 5-fluoro-2'-deoksyurydynę, cytry-nian klomifenu, ibuprofen oraz fluorouracyl. Niektóre z tych cech są typowe dla gatunku *Trichoderma atroviride*.

Na podstawie wyników analizy genetycznej, sekwencji zasad odcinka D2 LSU rDNA i porów-nania ich z sekwencjami grzybowych odcinków D2 LSU, z komercyjnej bazy sekwencji MicroSEQ potwierdzono w 99,98% przynależność taksonomiczną szczepu do gatunku *Trichoderma atroviride*.

Poniżej przedstawiono kolejność zasad odcinka D2 LSU rDNA szczepu *Trichoderma atroviride* G79/11:

```
GGTTAAACMGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTG
GGCGCGGCGGATCATCCGGGGTTCTCCCCGGTGC ACTTCGCCGTGTT CAGGCC
AGCATCAGTTCGGCGCGGGGGA AAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGG
AGTGTTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGCTGGACTGAGGACCGCGCATCT
GCAWGGATGCTGGCGTAATG
```

Przykład II

Sposób otrzymywania biopreparatu z wykazaniem z wykazaniem zdolności wytwarzania przez szczep enzymów litycznych

Przygotowano podłoże zawierające w 1,0 l: laktozę – 17,50 g, celulozę mikrokrystaliczną – 11,67 g, mąkę sojową – 17,50 g, KH_2PO_4 – 6,30 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 9,92 g, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,82 g, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,82 g, agar – 35 g, roztwór mikroelementów ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 513,00 mg/l, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 166,00 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,50 mg/l, $\text{CoCl} \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 204,00 mg/l, woda demineralizowana – do 1 l) – 20 ml, wodę demineralizowaną do 1 l, którego pH doprowadzono do 5,1 przez dodanie kwasu solnego, po czym sterylizowano w temperaturze 121°C, w czasie 20 minut, ochłodzono i roz-lano na płytki Petriego o średnicy 90 mm. Na tym podłożu namnożono inokulum (2) grzyba *T. atrovi-ride* G79/11 w warunkach tlenowych, w hodowli powierzchniowej w temperaturze 27°C, w czasie 17 dni, z ekspozycją na światło białe w drugim tygodniu hodowli. Następnie przygotowano podłoże produkcyjne właściwe o następującym składzie: laktoza – 5,00 g/l, celuloza mikrokrystaliczna – za-wierająca minimum 50% cząstek o wielkości $>32 \mu\text{m}$ – 10,00 g/l, mąka sojowa – 20,00 g/l, KH_2PO_4 – 6,30 g/l, NH_4NO_3 – 2,50 g/l, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,82 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,82 g/l, Tween 80 – 0,15%, roztwór mikroelementów ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 513,00 mg/l, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 166,00 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,50 mg/l, $\text{CoCl} \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 204,00 mg/l, woda demineralizowana – do 1 l) – 20 ml/l, woda deminerali-zowana do 1 l, emulsja Antifoam B – 5 ml/l, o pH 4,5, rozlano je do kolb Erlenmeyera o pojemności 50 ml po 12 cm³ podłoża do każdej kolby, wysterylizowano w temperaturze 121°C w czasie 20 minut i ochłodzono. Tak przygotowane podłoże hodowlane zaszczerpiono inokulum (2), używając zarodni-ków z 1 dobrze zarodnikującej 17-dniowej hodowli *T. atroviride* G79/11 i prowadzono hodowlę wy-trząsaną na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej przy szybkości obrotów 150 rpm, w warunkach tleno-wych, w temperaturze 25°C, w czasie 6 dni. Po hodowli grzybnię oddzielono od płynu pohodowlana-go poprzez wielokrotne filtrowanie. Następnie zwirowano zawiesinę płynu pohodowlanego w wa-runkach 4000 rpm, w czasie 20 minut, w celu pozbycia się resztek grzybni. Supernatant zagęszczono 20-krotnie na kolumnie filtracyjnej 10 kDa (Prep/Scale TFF 10 kDa Millipore) w celu uzyskania bio-preparatu w formie płynnej.

Rezultaty otrzymanej hodowli były następujące:

- skład biopreparatu był następujący: celulazy, ksylanazy, β -glukozydaza oraz enzymy towa-rzyszące: laktaza, poligalaktouronaza, pektynoesteraza, amylaza i proteaza, co oznaczono na podstawie oceny aktywności poszczególnych wyżej wymienionych enzymów w bioprepa-racie znanymi metodami kolorymetrycznymi;
- aktywność celulaz, ksylanaz i β -glukozydazy kształtowała się odpowiednio na poziomie: 16 FPU/ml, 6763 U/ml, 208 U/ml, preparat charakteryzował się towarzyszącymi aktywnościami pektynoesterazy, poligalaktouronazy, amylazy, laktazy i proteazy, odpowied-nio: 8,75 nU/ml, 18,53 nU/ml, 26 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$, 0,31 U/ml, 2,22 U/ml. Aktywność enzyma-tyczną oznaczono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem następujących substratów:

celulaz metodą FPU z bibułą filtracyjną Whatmana, ksylanaz z ksylanem, β -glukozydazy z p-nitrofenylo- α -D-glukopiranozydem (pNPG), pektynoesterazy z pektyną, poligalaktouronazy z kwasem poligalaktouronowym, amylazy ze skrobią, laktazy z o-nitrofenylo- β -D-galaktozydem (ONPG) i proteazy z kazeiną;

- optimum działania biopreparatu oznaczona względem enzymów celulolitycznych: 50°C, pH 5,1.

Przykład III

Sposób otrzymywania biopreparatu z wykazaniem zdolności wytwarzania przez szczep enzymów litycznych

Przygotowano podłoże zawierające w 1 l laktozę – 17,50 g, celulozę mikrokrystaliczną – 11,67 g, mąkę sojową – 17,50 g, KH_2PO_4 – 6,30 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 9,92 g, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,82 g, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,82 g, agar – 25 g, roztwór mikroelementów ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 513,00 mg/l, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 166,00 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,50 mg/l, $\text{CoCl} \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 204,00 mg/l, woda demineralizowana – do 1 l) – 20 ml, wodę demineralizowaną do 1 l, którego pH doprowadzono do 4,8, po czym sterylizowano w temperaturze 121°C, w czasie 20 minut, ochłodzono i rozlano na płytki Petriego o średnicy 90 mm. Na tym podłożu namnożono inokulum (2) grzyba *T. atroviride* G79/11 w warunkach tlenowych, w hodowli powierzchniowej w temperaturze 27°C, w czasie 17 dni, z ekspozycją na światło białe w drugim tygodniu hodowli. Następnie przygotowano podłoże produkcyjne właściwe o następującym składzie: laktoza – 5,00 g/l, celuloza mikrokrystaliczna – zawierająca minimum 50% cząstek o wielkości > 32 μm – 10,00 g/l, mąka sojowa – 20,00 g/l, KH_2PO_4 – 6,30 g/l, NH_4NO_3 – 2,50 g/l, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,82 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,82 g/l, Tween 80 – 0,15%, roztwór mikroelementów ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 513,00 mg/l, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 166,00 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,50 mg/l, $\text{CoCl} \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 204,00 mg/l, woda demineralizowana – do 1 l) – 20 ml/l, woda demineralizowana do 1 l, emulsja Antifoam B – 5 ml/l, o pH 4,5, rozlano je do kolb Erlenmeyera o pojemności 1000 ml po 400 cm^3 podłoża do każdej kolby, wy sterylizowano w temperaturze 121°C w czasie 20 minut i ochłodzono. Tak przygotowane podłoże hodowlane zaszczerpiono inokulum (2), używając zarodników z 9 dobrze zarodnikujących 17-dniowej hodowli *T. atroviride* G79/11 i prowadzono hodowlę wytrząsaną na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej przy szybkości obrotów 130 rpm, w warunkach tlenowych, w temperaturze 25°C, w czasie 6 dni. Po hodowli grzybnię oddzielono od płynu pohodowlanego poprzez wielokrotne filtrowanie przez gazę. Następnie zwirowano zawiesinę płynu pohodowlanego w warunkach 4000 rpm, w czasie 20 minut, w celu pozbycia się resztek grzybni. Supernatant zagęszczono 20-krotnie na kolumnie filtracyjnej 10 kDa (Prep/Scale TFF 10 kDa Millipore) w celu uzyskania biopreparatu w formie płynnej.

Rezultaty otrzymanej hodowli były następujące:

- skład biopreparatu: celulazy, ksylanazy, β -glukozydaza oraz enzymy towarzyszące: laktaza, poligalaktouronaza, pektynoesteraza, amylaza i proteaza, co oznaczono na podstawie oceny aktywności poszczególnych w/w enzymów w biopreparacie znanymi metodami kolorymetrycznymi;
- aktywność celulaz, ksylanaz i β -glukozydazy kształtowała się odpowiednio na poziomie: 16 FPU/ml, 6763 U/ml, 208 U/ml, preparat charakteryzował się towarzyszącymi aktywnościami pektynoesterazy, poligalaktouronazy, amylazy, laktazy i proteazy, odpowiednio: 8,75 nU/ml, 18,53 nU/ml, 26 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$, 0,31 U/ml, 2,22 U/ml. Aktywność enzymatyczną oznaczono analogicznie jak w przykładzie II;
- optimum działania biopreparatu oznaczona względem enzymów celulolitycznych: 50°C, pH 5,1.

Przykład IV

Sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu

Do przeprowadzenia procesu fermentacji metanowej odpadów organicznych wykorzystano biopreparat otrzymany sposobem według wynalazku, jako płyn pohodowlany ze szczepu *Trichoderma atroviride* G79/11. Fermentacji metanowej poddano mieszaninę odpadów organicznych o następującym składzie mieszaniny odpadowej: odpady z przetwórstwa owoców 25%, osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich 25%, kiszonka kukurydziana 12% oraz wywar zbożowy 38%. Bioodpady po ich wstępnym rozdrobieniu i ujednoczeniu mieszano w odpowiednich proporcjach. Wykorzystano osad beztlenowy pobrany z biogazowni rolniczej. Przez 2 miesiące osad adaptowano do warunków prowadzenia procesu, przetrzymując go w temperaturze 37°C oraz zasilając go mieszaniną badanej biomasy. Czas reencji w okresie adaptacji wynosił 40 dni. Po tym czasie osad zagęszczono grawitacyjnie i wykorzystano

jako inokulum. W celu zaszczepienia biomasy mikroorganizmami do wszystkich prób dodano osad bez-tlenowy w ilości 20% wsadu bioreaktora. Z układu usunięto powietrze i rozpoczęto dobowy pomiar ilości powstającego biogazu. Czas prowadzenia fermentacji wyniósł 36 dni.

Fermentację prowadzono w układzie okresowym w zamkniętych reaktorach o objętości $0,5 \text{ dm}^3$ w warunkach mezofilnych w temperaturze 37°C . W serii pierwszej prowadzono fermentację mieszaniny bioodpadów w warunkach mezofilnych bez dodatku biopreparatu. W serii drugiej do fermentorów, w których fermentacji poddawano badaną mieszaninę odpadów wprowadzono biopreparat. Dawkę biopreparatu ustalono na podstawie ilości cukrów redukujących powstałych w wyniku hydrolizy badanego odpadu. Badaną biomasę uzupełniono biopreparatem w dawkach 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 oraz $0,2 \text{ cm}^3/\text{g}$ s.m.o. Tak przygotowaną mieszaninę przetrzymywano w temperaturze prowadzenia fermentacji: 37°C . Czas hydrolizy wyniósł 24 godziny. Po tym czasie oznaczano zmiany stężenia cukrów redukujących w zależności od dawki enzymu. Do fermentorów razem z poddawaną fermentacji biomasą wprowadzono biopreparat w ilości 0,01; 0,02 oraz $0,05 \text{ cm}^3/\text{g}$ s.m.o.

Rezultaty wprowadzenia biopreparatu do komory fermentacyjnej:

Wydajność biogazu uzyskana w wyniku fermentacji 1 kg s.m.o. mieszaniny odpadów wyniosła $493,4 \text{ dm}^3$, a zawartość metanu stanowiła 71% składu biogazu. Dodatek do komory fermentacyjnej biopreparatu w ilości $0,01 \text{ cm}^3/\text{g}$ s.m.o. spowodował wzrost wydajności biogazu o ok. 4% w stosunku do fermentacji mieszaniny odpadów bez biopreparatu. Kolejne dawki biopreparatu wprowadzane do fermentora: 0,02 oraz $0,05 \text{ cm}^3/\text{g}$ s.m.o. spowodowały poprawę wydajności biogazu w stosunku do próby kontrolnej o ok. 7,0% oraz 9,38%. Analiza ilości oznaczonych kwasów organicznych, po zakończonym procesie fermentacji pozostawała w korelacji z jej efektami.

Przykład V

Sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu

Sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu prowadzono analogicznie, jak w przykładzie 4 – czyli dla mieszanki o takim samym składzie i przy identycznych parametrach, z tym, że w serii pierwszej prowadzono fermentację mieszaniny bioodpadów w warunkach mezofilnych bez dodatku biopreparatu, natomiast w serii drugiej badaną biomasę przed wprowadzeniem do fermentorów poddano wstępnej hydrolizie z dodatkiem biopreparatu w następujących dawkach: 0,05; 0,1; $0,15 \text{ cm}^3/\text{g}$ s.m.o. Badania przeprowadzono w temperaturach: 37°C oraz 50°C . Po 24-godzinnej hydrolizie oznaczano stężenie cukrów redukujących. Tak wstępnie przygotowaną biomasę poddano fermentacji metanowej.

Rezultaty fermentacji metanowej po wstępnej hydrolizie biomasy z wykorzystaniem opracowanego biopreparatu określono poniżej. Dawka biopreparatu w ilości $0,05 \text{ cm}^3/\text{g}$ s.m.o. dodana do bioodpadów przed wprowadzeniem do fermentora po jednodobowej hydrolizie w temperaturze 37°C spowodowała wzrost wydajności biogazu o 9,38% w stosunku do fermentacji bioodpadów bez dodatku preparatu. Korzystniejsze wyniki uzyskano poddając substrat hydrolizie w temperaturze 50°C , którą określono jako optymalną dla stosowania biopreparatu. Porównując najniższą stosowaną dawkę biopreparatu w ilości $0,05 \text{ cm}^3/\text{g}$ s.m.o. stwierdzono, że w stosunku do fermentacji odpadu nie wzbogaconego dodatkiem biopreparatu uzyskano wzrost wydajności biogazu o 10,5%. Natomiast porównując efekty fermentacji odpadu poddanego hydrolizie w temperaturze 37°C i 50°C stwierdzono, że przy najniższej stosowanej dawce różnica w wydajności biogazu wynosi ok. 1%. Podczas fermentacji mieszaniny odpadów poddanych wstępnej hydrolizie przy zastosowaniu najwyższej testowanej dawki preparatu stwierdzono, że dawka biopreparatu w istotny sposób wpływa na ilość uzyskiwanego biogazu. W porównaniu z próbą bez wstępnej hydrolizy dla prób poddanych hydrolizie w temperaturze 37°C odnotowano wzrost wydajności biogazu o 11,6%, natomiast dla temperatury hydrolizy 50°C wartość ta była wyższa o 17,18%. Potwierdzeniem tych danych były również wyniki analizy kwasów organicznych po zakończonym procesie fermentacji.

Zastrzeżenia patentowe

1. Nowy szczep grzyba *Trichoderma atroviride* G79/11 zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie pod numerem KKP 2056p, wyselekcjonowany z osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich, wytwarzający jednocześnie następujące enzymy lityczne o wysokiej

- aktywności: celulaz, ksylanaz i β -glukozydazy oraz towarzyszącej aktywności: laktazy, enzymów pektynolitycznych, amylazy i proteazy, stosowany do otrzymywania biopreparatu do optymalizacji fermentacji metanowej.
2. Sposób otrzymywania biopreparatu do fermentacji metanowej odpadów organicznych z wykorzystaniem gatunku *Trichoderma atroviride*, polegający na jego hodowli na odpowiednio skomponowanym podłożu zawierającym źródło węgla, fosforu i azotu oraz związki mineralne, prowadzonej w zoptymalizowanych warunkach: pH podłoża, temperatury hodowli i szybkości wytrząsania i następnie oddzieleniu grzybni od płynu pohodowlanego i jego zagęszczeniu, **znamienny tym**, że stosuje się szczep grzyba, jak określono w zastrz. 1, który namnaża się w hodowli stacjonarnej – inokulum 2, w warunkach tlenowych, przy pH 4,8–5,1 w temperaturze 27°C w czasie 14–20 dni, na podłożu zawierającym w 1,0 l:
 - jako źródło węgla: laktozę w ilości 17–18 g/l, celulozę mikrokrystaliczną w ilości 11–12 g/l oraz mąkę sojową w ilości 17–18 g/l,
 - jako źródło fosforu: KH_2PO_4 w ilości 6–7 g/l,
 - natomiast jako źródło azotu: $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ w ilości 9–10 g/l,
 - i ponadto stosuje się $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,5–1 g/l, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ w ilości 0,5–1 g/l, agar w ilości 25–35 g/l oraz roztwór mikroelementów w ilości 20 ml/l, a następnie zaszczenia się tak namnożonym inokulum 2 podłoże produkcyjne i prowadzi hodowlę we wgłębnej hodowli wytrząsanej, przy czym podłoże produkcyjne zawiera w 1,0 l:
 - jako źródło węgla: laktozę w ilości 4,5–5,5 g/l, celulozę mikrokrystaliczną – zawierającą minimum 50% cząstek o wielkości $>32 \mu\text{m}$ w ilości 9,5–10,5 g/l oraz mąkę sojową w ilości 19,5–20,5 g/l,
 - jako źródło fosforu: KH_2PO_4 w ilości 6–7 g/l,
 - natomiast jako źródło azotu: NH_4NO_3 w ilości 2,50 g/l,
 - i ponadto stosuje się $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ w ilościach analogicznych, jak przy hodowli stacjonarnej, oraz Tween 80 – 0,14–0,16%, roztwór mikroelementów w ilości 20 ml/l, wodę demineralizowaną w ilości do 1 l, emulsję Antifoam B w ilości 4,5–5,5 ml/l, a hodowlę prowadzi się w warunkach tlenowych, przy pH 4,5, w temperaturze 22–27°C, w czasie 5–10 dni, stosując szybkość obrotów wytrząsarki 120–160 rpm.
 3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że namnażanie szczepu *Trichoderma atroviride* G79/11 w hodowli stacjonarnej trwa 17 dni.
 4. Sposób według zastrz. 2 albo 3, **znamienny tym**, że w drugim tygodniu hodowli stacjonarnej, hodowlę eksponuje się korzystnie na światło białe.
 5. Sposób według zastrz. 2 do 4, **znamienny tym**, że temperatura prowadzenia hodowli we wgłębnej hodowli wytrząsanej na podłożu produkcyjnym wynosi korzystnie 25°C.
 6. Sposób według zastrz. 2 do 5, **znamienny tym**, że czas prowadzenia hodowli we wgłębnej hodowli wytrząsanej na podłożu produkcyjnym wynosi korzystnie 6 dni.
 7. Sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z biopreparatu zastosowaniem, jak określono w zastrz. 1, **znamienny tym**, że do fermentacji stosuje się mieszanke odpadów o składzie: odpady z przetwórstwa owoców – 22–28%, osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich – 22–28%, kiszonka kukurydziana – 11–13% oraz wywar zbożowy – 35–40%, przy czym biopreparat stosuje się w formie płynnej albo zliofilizowanej odpowiednio w dawkach nie mniejszych niż 0,01 cm^3/g s.m.o. lub 0,1 mg/g s.m.o. podawanych bezpośrednio do fermentorów, a fermentację prowadzi się w warunkach mezofilnych.
 8. Sposób prowadzenia fermentacji metanowej odpadów organicznych z zastosowaniem biopreparatu, jak określono w zastrz. 1, **znamienny tym**, że do fermentacji stosuje się mieszanke odpadów o składzie: odpady z przetwórstwa owoców – 22–28%, osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich – 22–28%, kiszonka kukurydziana – 11–13% oraz wywar zbożowy – 35–40%, przy czym mieszanke, przed wprowadzeniem do fermentorów, poddaje się wstępnej hydrolizie z dodatkiem biopreparatu w formie płynnej albo zliofilizowanej odpowiednio w dawkach nie mniejszych niż 0,05 cm^3/g s.m.o. lub 0,1 mg/g s.m.o. i hydrolizę prowadzi się w temperaturze 36–55°C.

Rysunki

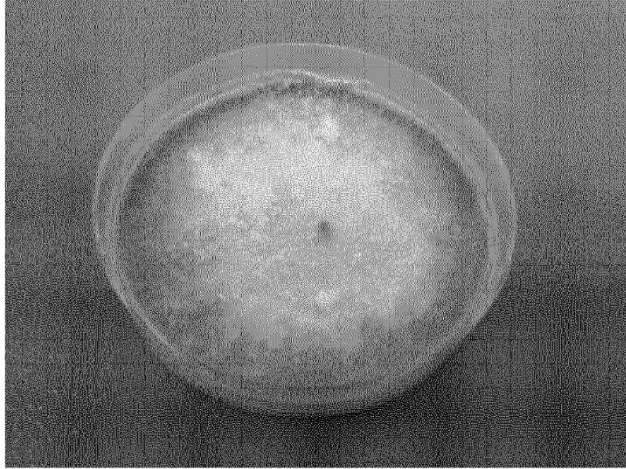


Fig.1



Fig.2

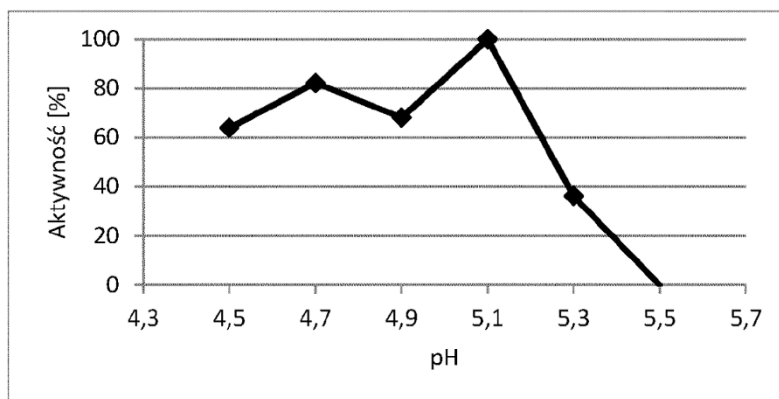


Fig.3

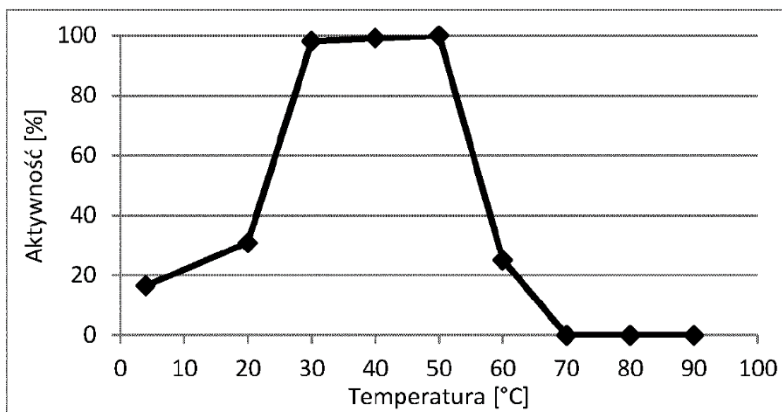


Fig.4

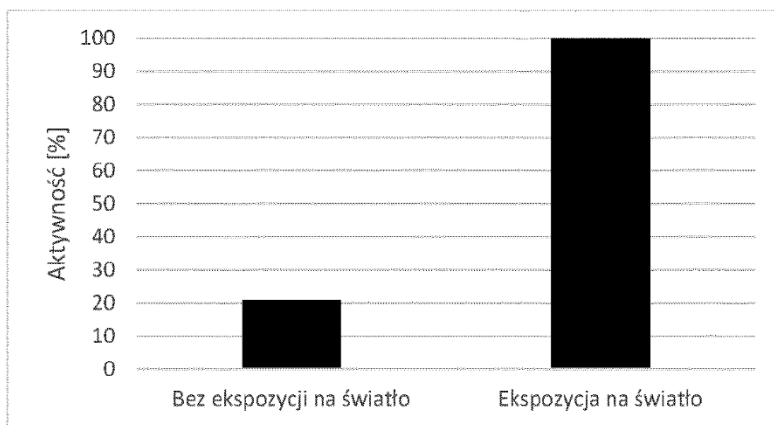


Fig. 5

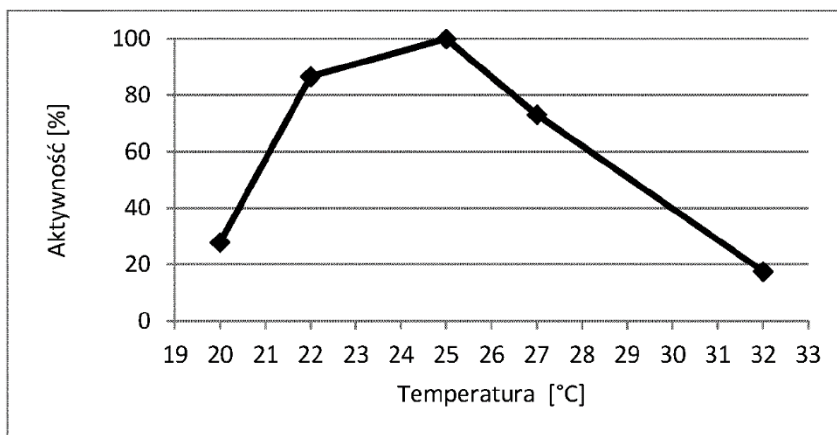


Fig. 6



Fig.7