



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00888

(22) Data de depozit: 27.11.2012

(41) Data publicării cererii:
30.10.2013 BOPI nr. 10/2013

(71) Solicitant:
• SOCTECH S.A., BD. THEODOR PALLADY
NR. 287, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;

• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• VLĂDULESCU CONSTANTIN MARIUS,
STR.VORONEȚ NR.3, BL.D4, SC.1, ET.1,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE PENTRU TRATAMENTUL CULTURILOR
AGRICOLE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție pentru tratamentul culturilor agricole, care stimulează creșterea plantelor, ameliorează rezistența plantelor la stres, în special la stresul hidric, și, în cazul adăugării de seleniu, chelatat în aminoacizi, îmbunătățește răspunsul plantelor la stresurile abiotice și/sau biofortificază recolta, și la un procedeu de obținere a acestei compoziții din biomasa de microalge, cu adăugarea unui compus cu seleniu. Compoziția conform invenției este alcătuită din 79,3...83,4 părți hidrolizat de proteine algale, conținând 5,9...6,3 părți prolină, sau, respectiv, 55,8...58,7 părți hidrolizat proteic din alge, conținând 4,2...4,4 părți prolină și 23,5...24,7 părți hidrolizat de proteine algale în care este chelatat seleniu, conținând 1,2...1,25 părți seleniu, în cazul suplimentării cu seleniu chelatat,

2...2,1 părți betaine totale, 0,1...0,11 părți citochinine, echivalent activitate kinenină, 8,2...8,7 părți carbohidrați, apă până la 100 de părți. Procedeu conform invenției constă în liza biomasei microalgale printr-un tratament combinat, cu amestec de hidrolaze microbiene și ultrasunare, concentrarea osmoprotectanților și fitohormonilor din extract prin ultrafiltrare tangențială, hidroliza proteinelor din retentat cu proteaze, chelatarea seleniului într-o parte din hidrolizatul proteic în cazul suplimentării cu seleniu, amestecarea concentratului de la osmoprotectanți și fitohormoni cu hidrolizatul proteic, eventual și cu cel suplimentat cu seleniu, și uscarea prin pulverizare a amestecului.

Revendicări: 6



acizi nucleici, care au o masă moleculară cuprinsă între 1 KDa și 1000 KDa. Brevetul US2012094831 revendică un procedeu prin care sunt folosite celule de *Chlorella*, și/sau fragmente din biomasă de *Chlorella* obținute prin orice mijloace, pentru a modifica sau îmbunătăți calitatea, starea de sănătate, fertilitatea, aspectul estetic sau culoarea plantelor. Procedeu este exemplificat prin pulverizarea gazonului cu celule de *Chlorella*, și deși sunt revendicate și compoziții conținând cantități efective de pigmenți, coloranți, componenți ai coloranților, fragmente sau particule de biomasă de *Chlorella*, sau orice parte de materie din *Chlorella* obținută prin mijloace cunoscute, nu este prezentată o compoziție în care să fie precizate respectivele cantități considerate efective, din compuși bio-activi precizați, care să asigure efecte reproductibile ale tratamentelor asupra culturilor agricole și/sau ornamentale.

Biomasa de micro-alge conține cantități semnificative de fitohormoni, inclusiv citochinine (Ordog *et al.*, 2004, J. Phycol. 40:88-95), ca și de osmoprotectanți, ca de ex. glicinbetaină (Spielmayer *et al.*, 2011, Mar. Chem., 124:48-56). Aplicarea de tratamente cu glicinbetaină crește rezistența plantelor la stresul abiotic, în special la stresul hidric (Chen și Murata, 2008, Trends Plant Sci. 13:499–505). În biomasa de alge se acumulează și proteine, care conțin prolină, un aminoacid care are și el acțiune osmoprotectantă, manifestată și în cazul aplicării ca tratament al culturilor agricole (Ashrat și Foola, 2007, Environ. Exp. Bot, 59:206-216), astfel încât hidrolizatele proteinelor din microalge, inclusiv datorită prezenței prolinei, au o acțiune complementară celorlalți osmoprotectanți existenți în extractele de biomasă de alge. Hidrolizatele proteice reprezintă ele însele un biostimulator pentru culturile agricole (a se vedea de ex. trecerea în revistă Maini 2006, Fertilitas agrorum, 1:29-43), nu numai datorită prolinei, ci și altor aminoacizi, precursori pentru auxine și poliamine (poliaminele fiind și ele implicate în rezistența plantelor la stresurile abiotice – a se vedea de ex. trecerea în revistă Alcazar, 2010, Planta, 231:127-1249). Studiile din ultimii 15 ani au dovedit că seleniul, deși nu este larg recunoscut ca un micro-element esențial pentru plante, stimulează creșterea plantelor (Hartikainen și Xue, 1999, J. Environ. Qual. 28:1372–1375) și are un rol semnificativ în protecția plantelor față de stresul oxidativ (Xue *et al.*, 2001, Plant Soil 237:55–61) și în reducerea stresului hidric (Wang, 2011, J. Plant Nutr. Soil Sci., 174: 276-282; Wang *et al.*, 2011, J. Plant Growth Regul., 30:436-444), deci adăugarea unor mici cantități de seleniu ar potența acțiunea de stimulare a creșterii plantelor și de ameliorare a rezistenței

plantelor la stres, în special la stresul hidric combinat cu cel oxidativ (care apare inclusiv în cazul secetei asociate temperaturilor ridicate). Pentru manifestarea optimă a interacțiilor pozitive dintre compușii bioactivi prezenți în extractele de micro-alge, fitohormoni și osmoprotectanți, și hidrolizatele proteice din alge conținând prolină, și eventual și seleniu ca microelement anti-oxidant, este necesară definirea unor compoziții în care diferitele ingrediente active să se regăsească în rapoarte și limite precizate, care la aplicare să asigure realizarea dozelor care determină efecte reproductibile în culturile agricole tratate.

Problema tehnică pe o rezolvă invenția constă în obținerea unei compoziții bine caracterizate din biomasă de micro-alge, cu efecte reproductibile atunci când sunt utilizate pentru tratamentul culturilor agricole, pentru a stimula creșterea plantelor, a ameliora rezistența plantelor la stres, în special la stresul hidric, și, în cazul suplimentării cu seleniu, și pentru a biofortifica recolta prin tratamente în timpul vegetației.

Este un alt obiect al soluției tehnice de a dezvălui un procedeu prin care să se obțină respectivele compoziții din biomasă de micro-alge, asigurând regăsirea ingredientelor bioactive în concentrații bine precizate. Este un obiect derivat al soluției tehnice de obținere de a descrie un procedeu prin care să se asigure, atunci când se suplimentează compoziția cu seleniu, formarea unor chelați ai seleniului în care acesta să fie prezent exclusiv în formă chelată.

Compoziția conform invenției este alcătuită din 79,3...83,4 părți hidrolizat de proteine algale, conținând 5,9... 6,3 părți prolină, sau respectiv 55,8...58,7 părți hidrolizat proteic din alge conținând 4,2 ... 4,4 părți prolină, și 23,5 ... 24,7 părți hidrolizat de proteine algale în care este chelatat seleniu, conținând 1,2 ...1,25 părți seleniu, în cazul suplimentării cu seleniu chelatat, 2,0...2,1 părți betaine totale, 0,1...0,11 părți citochinine, echivalent activitate kinetină, 8,2 .. 8,7 părți carbohidrați, apă până la 100 părți.

Procedeu conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- Separarea biomasei de mediul de cultură prin filtrare și lizarea celulelor printr-un tratament combinat, cu amestec de hidrolaze microbiene și ultrasonare, și eliminarea debriurilor celulare prin centrifugare;
- Absorbția pigmentilor clorofilieni din supernatant cu cărbune activat și separarea prin centrifugare a adaosului de cărbune activ;
- Concentrarea osmoprotectanților și a fitohormonilor din extract prin ultrafiltrare pe o membrană cu limită de excludere de 1 KDa, până la atingerea

unei concentrații de circa 1% betaine totale în permeat, controlată prin dozarea prin cromatografie de înaltă presiune a glicinbetainei, și verificarea ulterioară a activității citochininelor cu ajutorul unui biotest;

- Hidroliza enzimatică a proteinelor reținute în retentat, cu un amestec de proteaze microbiene, endo-proteaze și amidopeptidaze, până la atingerea unui randament maxim în aminoacizi liberi și di/tri-peptide și separarea prin ultrafiltrare a aminoacizilor liberi și a oligopeptidelor;

- Concentrarea prin evaporare la presiune redusă a hidrolizatului proteic din permeat, până la 10% substanță uscată, adăugarea acestui concentrat de hidrolizat peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, și uscarea prin pulverizare a amestecului;

- În cazul suplimentării compoziției cu seleniu chelatat în aminoacizi, prelevarea a 30% din concentratul de hidrolizat proteic, complexarea aminoacizilor din hidrolizat cu seleniu eliberat treptat dintr-un compus insolubil, într-o reacție accelerată prin ultrasonicare, centrifugarea excesului de compus insolubil al seleniului și adăugarea soluției de seleniu chelatat în hidrolizat proteic, împreună cu restul de 70% din concentratul de hidrolizat proteic, peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, și uscarea prin pulverizare a amestecului

Aspectele preferate pentru realizarea procedurii de mai sus sunt:

- Obținerea unei biomase umede care conține 10% substanță uscată prin filtrare din mediul de cultură și liza biomasei umede cu amestec de enzime litice din *Trichoderma harzianum*, care include β-glucozidază, celuloză și proteaze, aplicate în doză de 0,1 g de enzimă, cu activitatea de 200 unități β-glucozid Botrytis per g, pentru 1 kg de biomasă umedă și ultrasonarea amestecului cu 400 W timp de 45 min la 45°C, urmată de eliminarea debriurilor prin centrifugare la 7000 x g;

- Adăugarea peste supernatant de cărbune activ, în proporție de 4%, pentru absorbția pigmentilor clorofilieni și separarea prin centrifugare la 5000 x g a adaosului de cărbune activat;

- Hidroliza materialului proteic din retentat, cu un amestec de proteaze microbiene, 0,1 g endo-proteaze având activitatea specifică de 2,4 unități Anson (AU) per gram și 0,1 g amidopeptidaze, cu o activitate de 500 LAPU/g adăugate la 1000 ml de retentat, la pH neutru și temperatură de 55 ... 60°C, timp de 16...20 ore, urmată de ultrafiltrarea hidrolizatului cu îndepărtarea moleculelor cu o masă moleculară mai mare de 1 kDa;

- Concentrarea prin evaporare la presiune redusă a hidrolizatului enzimatic până la 10% substanță uscată, adăugarea acestui concentrat de hidrolizat peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, în raport de 8 părți concentrat de hidrolizat proteic la 2 părți concentrat de osmoprotectanți și fitohormoni, și uscarea prin pulverizare a amestecului, la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.

In cazul suplimentării cu seleniu a compoziției procedeul include următoarele completări, cu următoarele aspecte preferate de realizare:

- Din concentratul de hidrolizat proteic se prelevează 30%, care se aduce peste selenit de magneziu hexahidrat, în raport de 100 ml hidrolizat la 1,37 g de selenit de magneziu hexahidrat, se ultrasonează amestecul cu 400 W timp de 30 min la 55°C, se centrifughează excesul de compus insolubil al seleniului, supernatantul de seleniu chelatat în hidrolizat proteic se adaugă împreună cu restul de 70% din concentratul de hidrolizat, peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, în raport de 24 părți soluție seleniu hidratat la 56 părți concentrat de aminoacizi și 20 părți concentrat de osmoprotectanți și fitohormoni, amestecul rezultat fiind uscat prin pulverizare a amestecului la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Asigură reproductibilitatea efectelor asupra plantelor de cultură datorită unei compoziții definite, cu rapoarte precizate între ingredientele active, fitohormoni, și în special citochine, osmoprotectanți, betaine și prolină din hidrolizatul de proteine algale, aminoacizi precursori de auxine și poliamine din hidrolizatul de proteine algale, eventual seleniu chelatat în aminoacizi, adăugat în cazul suplimentării cu seleniu;

- Stimulează creșterea plantelor, datorită conținutului de fitohormoni și a aminoacizilor precursori de fitohormoni;

- Ameliorează rezistența plantelor la stres, în special la stresul hidric, datorită compușilor osmoprotectanți, betaine și prolină din hidrolizatul de proteine algale, și a aminoacizilor precursori de poliamine, din hidrolizatul de proteine algale;

- Valorifică potențialul de compuși osmoprotectanți din alge prin hidroliză enzimatică a proteinelor algale, din care se eliberează prolină, compus cu acțiune osmoprotectantă complementară glicin-betainei;

- In cazul suplimentării cu seleniu ameliorează răspunsul plantelor la stresul hidric combinat cu cel oxidativ și biofortifică recolta;

- Suplimentarea cu seleniu se realizează cu seleniu chelatat în aminoacizi, care prezintă o biodisponibilitate crescută și o toxicitate mai redusă;
- Procedul de chelatare, care utilizează seleniu eliberat treptat dintr-un compus insolubil, asigură regăsirea ulterioară a seleniului exclusiv sub formă chelată;
- În unele situații oligozaharidele formate în cursul procesului de liză celulară sub acțiunea enzimelor litice din *T. harzianum*, concentrate împreună cu fitohormonii și osmoprotectanții în prima etapă de ultrafiltrare, activează sistemele de apărare din plante.

În continuare invenția va fi descrisă prin prezentarea unor exemple de realizare.

Exemplu 1. Biomasa de micro-alge este separată de mediul de cultură prin filtrare. În sedimentul rezultat substanța uscată este determinată după uscare la 105°C pentru 4 ore și cântărire la o balanță electronică. Biomasa umedă se aduce la 10% (masă/volum) substanță uscată prin adăugare de apă. Un volum de biomasa de alge de 1 litru, corespunzând la 100 g de substanță uscată algală este adăugat într-un balon de 2500 ml cu fund plat, echipat cu condensatori de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru monitorizarea temperaturii. pH-ul este corectat la 4,5 cu soluție 6 M HCl. Se adaugă Glucanex 200 G (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Danemarca), un amestec de enzime litice din *Trichoderma harzianum*, care include β-glucanază, celulaze și proteaze, în doză de 100 mg enzimă, cu activitatea de 200 unități β-glucan Botrytis per g. O unitate β-glucan Botrytis este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, la 30,0°C, pH 4,4, timp de 10 min, eliberează 1 mmol de grupări reducătoare carbohidrați (calculate ca glucoză) per min. Suspensia este amestecată energetic cu un agitator magnetic, și încălzită până la 45°C. Se scoate pâlnia de adăugare și se introduce o sondă ultrasonică. Suspensia de alge cu enzimă este sonicată timp de 45 min cu 400 W timp la 45°C. După finalizarea ciclului de sonicare, se trece cantitativ biomasa în tuburi de centrifugă și se separă lizatul de debriurile celulare prin centrifugare la 7000 x g. Supernatul se reia, se măsoară, se trece într-un flacon erlenmeyer de 2000 ml și se adaugă cărbune activat (Darco® G-60, Norit Americas, Marshall, TX, SUA), în proporție de 4%, masă / volum, pentru absorbția pigmentilor clorofilieni. Se agită timp de 30 min cu agitator magnetic la temperatura camerei și apoi se trece în cupe de centrifugă și se separă prin centrifugare la 5000 x g cărbunele activat.

Supernatantul se reia și este ultrafiltrat tangențial pe un sistem de ultrafiltrare tangențială Prostat (Merck Millipore, Billerica, MA, SUA) prevăzut cu o membrană Ultracel PLAC (Merck Millipore) din celuloză regenerată, cu limită de excludere de 1 kDa. Concentrarea osmoprotectanților și a fitohormonilor în permeat este continuată până la atingerea unei concentrații de 1% (masă / volum) betaine totale în permeat, controlată prin dozarea prin cromatografie de înaltă presiune a betainelor. Din permeat se prelevează probe în care se analizează periodic conținutul de betaine folosind metoda descrisă de MacKinnon *et al.*, 2010, J. Appl. Phycol., 22:489-494, pe un sistem Agilent 6224 Accurate Mass TOF LC/MS-MS (Agilent, Santa Clara, CA, SUA). Ultrafiltrarea se oprește la atingerea nivelului de concentrație de 1% betaine totale în permeat. În permeat se verifică conținutul în citochinine, prin folosirea biotestului pe cotiledoane de *Amaranthus caudatus* propus de Kubota *et al.*, 1999, J. Plant Physiol., 155:133-155, folosind kinetina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA) ca standard, și se obține o valoare de 50 mg%(masă / volum) echivalent kinetină în concentrat.

Retentatul de la ultrafiltrare se trece într-un balon de 2500 ml cu fund plat, echipat cu condensatori de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru monitorizarea temperaturii. pH-ul este corectat la 7 cu soluție 6 M NaOH. La 1000 ml retentat se adaugă 0,1 g Alcalase AF 2.4 L (Novozyme), endopeptidază bacteriană din *Bacillus licheniformis*, cu subtilizină/serin endo-peptidază ca principal component enzimatic, având activitatea specifică de 2,4 unități Anson (AU) per gram și 0,1 g de Flavourzyme 500 MG (Novozyme), un complex de amidopeptidaze / exopeptidaze și endo-proteaze, obținut din *Aspergillus oryzae*, cu o activitate de 500 LAPU/g. O unitate Anson este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, digeră hemoglobina cu o viteză inițială care produce într-un minut o cantitate de compuși solubili în acid tricloracetic care dau aceeași culoare cu reactivul Folin-Ciocalteu ca și 1 miliechivalent de tirozină. O unitate LAPU, unitate leucină aminopeptidazică, este cantitatea de enzimă care hidrolizează 1 μmol de leucin-*p*-nitroanilid/min. Orice tip de combinație de endoproteaze și amidopeptidaze/exo-proteaze poate fi folosită, cu condiția de a asigura o activitate enzimatică similară în amestec. Amestecul suspensie de proteine algale – enzime este menținut timp de 16 ore, la 60°C, este răcit la 40°C și apoi este ultrafiltrat printr-o membrană de 1 kDa, Prostat (Merck Millipore) prevăzut cu o membrană Ultracel PLAC (Merck Millipore) din celuloză regenerată.

La 1 ml de permeat/ultrafiltrat sunt adăugați 3 ml de soluție 5% acid tricloroacetic acid (TCA). Nu rezultă un precipitat, iar aceasta demonstrează că în permeat sunt numai aminoacizi liberi și di/ tri-peptide. Permeatul este concentrat prin evaporare sub vid până la 10% substanță uscată (determinată refractometric). Acest concentrat de hidrolizat se adaugă peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, în raport de 8 părți concentrat de hidrolizat proteic la 2 părți concentrat de osmoprotectanți și fitohormoni, și se usucă prin pulverizare amestecul, la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.

În produsul uscat final se determină aminoacizii totali cu ninhidrină (Lee și Takahashi, 1966, Anal Biochem. 14:71-77), prolina (Abraham *et al.*, 2010, în R. Sunkar ed., Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology 639:317-331, Springer, Berlin) și carbohidrații totali cu antronă (Hedge și Hofreiter, 1962 în: Whistler R.L. și Be Miller J. N. eds, Carbohydrate Chemistry **17**, Academic Press New York), ca și betainele totale și activitatea citochininelor folosind metodele deja prezentate. Rezultatul aplicării invenției conform acestui exemplu este o compoziție alcătuită din 79,3...83,4 părți hidrolizat de proteine algale, conținând 5,9... 6,3 părți prolina, 2,0...2,1 părți betaine totale, 0,1...0,11 părți citochinine, echivalent activitate kinetina, 8,2 .. 8,7 părți carbohidrați, apă până la 100 părți.

Exemplu 2. Se procedează la fel ca în exemplul 1 până la obținerea concentratului de hidrolizat proteic. Din acest concentrat de hidrolizat proteic se prelevează 30%, care se aduce peste selenit de magneziu hexahidrat, în raport de 100 ml hidrolizat la 1,37 g de selenit de magneziu hexahidrat. Cristalele cubice de $MgSeO_3 \cdot 6 H_2O$, insolubile în apă, se prepară prin adăugare lentă și treptată, sub agitare, a 44 ml acid selenios, H_2SeO_3 , puritate 98%, densitate 3,004 g/ml, și a 204 ml soluție 10% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ peste 95 ml soluție 10% Na_2CO_3 . Precipitatul format se filtrează, se spală pe filtru cu apă bidistilată până când conductivitatea apei este de sub 2 mS/cm și se usucă la etuvă sub vid la 45°C timp de 72 ore. Din compusul insolubil astfel obținut se cântăresc cu precizie 4,11 g care se transferă cantitativ într-un balon cu trei găuri de 1000 ml. Peste cele 4,11 g se adaugă 300 ml suspensie, care este amestecată energetic cu un agitator magnetic și încălzită până la 45°C. Se scoate pâlnia și se introduce o sonda ultrasonică. Hidrolizatului și selenitul de magneziu hexahidrat sunt sonicate pentru 60 min la 400 W. Datorită folosirii unui compus insolubil riscul ca Se^{+4} să fie redus la seleniu elementar Se^0 , insolubil și fără biodisponibilitate, este foarte redus. Lipsa apariției culorii roșii

specifice seleniului Se^0 în timpul reacției de complexare reprezintă dovada neformării seleniu elementar. După finalizarea reacției se separă prin centrifugare la 5000 x g excesul de compus insolubil al seleniului. Supernatantul de seleniu chelatat în hidrolizat proteic se adaugă împreună cu restul de 70% din concentratul de hidrolizat, peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, în raport de 24 părți soluție seleniu hidratat la 56 părți concentrat de aminoacizi și 20 părți concentrat de osmoprotectanți și fitohormoni, amestecul rezultat fiind uscat prin pulverizare a amestecului la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.

În produsul uscat final se determină aminoacizii totali, prolina, carbohidrații betainele și activitatea citochininelor folosind metodele deja prezentate. În plus se determină și seleniul, prin spectrofotometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri (Tinggi *et al.*, J. Food Comp. Anal. 5, 269-280). Compoziția care rezultă este alcătuită din 55,8...58,7 părți hidrolizat proteine din alge conținând 4,2 ... 4,4 părți prolina, și 23,5 ... 24,7 părți hidrolizat de proteine algale în care este chelatat seleniu, conținând 1,2 ... 1,25 părți seleniu, 2,0...2,1 părți betaine totale, 0,1...0,11 părți citochinine, echivalent activitate kinetină, 8,2 .. 8,7 părți carbohidrați, apă până la 100 părți.

Exemplu 3. Compozițiile realizate conform ex. 1 și ex.2 au fost testate în condiții de seră, pe plante de tomate. Plantele de tomate (*Lycopersicum esculentum* cv. Cristal F1), răsaduri de 60 zile, au fost transplantate în vase de vegetație de 25 cm și 50 cm înălțime, în care s-au introdus câte 5 litri de substrat de creștere îmbogățit cu nutrienți pentru primele săptămâni de creștere (Canna Terra Professional Plus, Canna International BV, Oosterhout, Olanda). Vasele de vegetație au fost menținute în condiții de seră, la 22±2°C în timpul zilei și 17±2°C în timpul nopții, cu o fotoperioadă de 12 ore, suplimentată cu lumină cu intensitatea de 160 mcE/m²/s, provenită din lămpi cu halogen, atunci când intensitatea luminoasă scădea sub 500 mcE/m²/s. Experimentul a durat 56 zile. Substratul conținea rezerve de nutrienți inițiale, astfel încât plantele au fost fertilizate numai o singură dată, după 28 zile de la transplantare, prin aplicarea a 100 ml de soluție nutritivă 1 g/l de îngrășământ 20-8-20 (N-P₂O₅-K₂O, Eurofertil, TimacAgro Romania). Experimentul a fost organizat în bloc randomizat cu câte 4 repetiții pentru fiecare variantă, fiecare repetiție incluzând câte 5 plante. Variantele testate experimental au inclus și martori stropiți cu apă, stresat hidric și nestresat, și un produs de referință, Maxicrop Original (MaxiCrop, Corby, Marea Britanie),

care conține 8% substanță uscată extrasă din *Ascophyllum nodosum*. Aceste variante experimentale au fost:

V₁ – martor nestresat hidric, tratat cu apă; 2 tratamente x 2 ml per plantă echivalent 100 l/ha;

V₂ – martor stresat hidric, tratat cu apă, 2 tratamente x 2 ml per plantă echivalent 100 l/ha;

V₃ – nestresat hidric, tratat cu Maxicrop Original, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,48% per plantă, echivalent 6 litri cu 8% s.u. în 100 l/ha

V₄ – stresat hidric, tratat cu Maxicrop Original, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,48% per plantă, echivalent 6 litri cu 8% s.u. în 100 l/ha;

V₅ – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,5% per plantă, echivalent 0,5 kg în 100 l/ha

V₆ – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,5% per plantă, echivalent 0,5 kg în 100 l/ha;

V₇ – nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.2, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,5% per plantă, echivalent 0,5 kg în 100 l/ha

V₈ – stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.2, 2 tratamente x 2 ml soluție 0,5% per plantă, echivalent 0,5 kg în 100 l/ha.

Tratamentele s-au aplicat în a 2-a și a 29-a zi după transplantare, prin stropirea fiecărei plante cu ajutorul un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare, Somerset, PA, SUA). Martorul nestresat hidric a fost udat o dată la cinci zile la 100% capacitate de câmp, iar variantele stesate hidric au fost udate la două săptămâni la 100% capacitate de câmp. La sfârșitul celor 8 săptămâni de la transplantare s-a desființat experiența, determinându-se parametri morfologici ai plantelor, respectiv înălțimea plantelor, lungimea rădăcinii, numărul de frunze și suprafața frunzelor, ca și masa de fructe coapte per plantă. În recolta de roșii s-a determinat seleniul, prin spectrofotometrie de absorbție atomică cu generare de hidruri (Tinggi *et al.*, J. Food Comp. Anal. 5, 269-280). Datele s-au prelucrat prin analiza variantei (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos. Compozițiile realizate conform invenției stimulează creșterea plantelor și ameliorează rezistența plantelor de tomate la stresul hidric.

Tab. 1. Influența tratamentelor cu compoziții realizate conform invenției asupra plantelor de tomate, stresate și nestresate hidric*.

VARIANTĂ EXPERIMENTALĂ	ÎNĂLȚIME PLANTE (cm)	LUNGIME RĂDĂCINI (cm)	NUMĂR FRUNZE	SUPRAFAȚĂ FRUNZE (mm ²)	PRODUCȚIE MEDIU** (g FRUCTE COAPTE / PLANTĂ)	CONȚINUT MEDIU SELENIU FRUCTE (mcg/kg s.p.)
V ₁ martor nestresat hidric, tratat cu apă	58.15±1.74b	56.42±0.84b	32.00±5.2b	679.47±6.12b	325±42,4b	0,29±0,06c
V ₂ martor stresat hidric, tratat cu apă	44.02±3.64c	38.75±3.12c	25.50±2.2c	537.50±2.92c	192±32,6c	0,44±0,06b
V ₃ nestresat hidric, Maxicrop Original, 2x 0,48% echiv. 6 litri cu 8% s.u. în 100 l/ha	64.30±3.42a	55.50±2.39b	34.00±2.1b	687.58±2.92ab	383±28,2a	0,37±0,07b
V ₄ stresat hidric, Maxicrop Original, 2x 0,48% echiv. 6 litri cu 8% s.u. în 100 l/ha	56.50±2,89b	54.20±1.93b	33.20±3.8b	673.16±5.84ab	312±38,6b	0,38±0,04b
V ₅ nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2x 0,5% echiv. 0,5 kg în 100 l/ha	65.25±1.49a	59.25±1.22a	47.50±4.4a	719.21±4.59a	374±22,4a	0,32±0,05bc
V ₆ stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.1, 2x 0,5% echiv. 0,5 kg în 100 l/ha;	54.50±4.64b	55.20±1.82b	34.01±2.6b	672.16±8.24b	309±35,6b	0,36±0,06b
V ₇ nestresat hidric, tratat cu produs cf. ex.2, 2x 0,5% per plantă, echivalent 0,5 kg în 100 l/ha	67.52±3.49a	58.85±1.34a	47.50±4.6a	719.21±4.59a	394±30,9a	0,55±0,04a
V ₈ stresat hidric, tratat cu produs cf. ex.2, 2x 0,5% echivalent 0,5 kg în 100 l/ha	54.50±4.64b	54.60±2.12b	35.20±2.4b	681.16±7.42b	318±25,6b	0,59±0,06b

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05; **Producția pe 30 zile ciclu de înflorire - fructificare

Compoziția conform ex.1 are o activitate la nivelul produsului comercial utilizat ca referință, iar adaosul de seleniu îmbunătățește răspunsul la stresul hidric, probabil datorită unei mai bune protecții anti-oxidante. Nivelul de seleniu din producția utilă a plantele tratate prin aplicarea unei soluții de 0,5% compoziție cu seleniu, echivalent cu o doză de 0,5 kg de compoziție cu adaos de seleniu, respectiv la 6,0 ... 6,75 g Se/ha, aplicată într-o normă de stropire de 100 l/ha, crește semnificativ, dar nu influențează în mod semnificativ contribuția adusă de consumul de roșii în necesarul zilnic de seleniu, care este de 50 mcg/zi pentru femei și de 70 mcg/zi pentru bărbați.

REVEDICĂRI

1. Compoziție conform invenției **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 79,3...83,4 părți hidrolizat de proteine algale, conținând 5,9... 6,3 părți prolină, sau respectiv 55,8...58,7 părți hidrolizat proteic din alge conținând 4,2 ... 4,4 părți prolină, și 23,5 ... 24,7 părți hidrolizat de proteine algale în care este chelatat seleniu, conținând 1,2 ...1,25 părți seleniu, în cazul suplimentării cu seleniu chelatat, 2,0...2,1 părți betaine totale, 0,1...0,11 părți citochinine, echivalent activitate kinetină, 8,2 .. 8,7 părți carbohidrați, apă până la 100 părți.
2. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: separarea biomasei de mediul de cultură prin filtrare și lizarea celulelor printr-un tratament combinat, cu amestec de hidrolaze microbiene și ultrasonare, și eliminarea debriurilor celulare prin centrifugare; absorbția pigmentilor clorofilieni din supernatant cu cărbune activat și separarea prin centrifugare a adaosului de cărbune activ; concentrarea osmoprotectanților și a fitohormonilor din extract prin ultrafiltrare pe o membrană cu limita de excludere de 1 kDa, până la atingerea unei concentrații de circa 1% betaine totale în permeat, controlată prin dozarea prin cromatografie de înaltă presiune a glicinbetainei, și verificarea ulterioară a activității citochininelor cu ajutorul unui biotest; hidroliza enzimatică a proteinelor reținute în retentat, cu un amestec de proteaze microbiene, endo-proteaze și amidopeptidaze, până la atingerea unui randament maxim în aminoacizi liberi și di/tri-peptide și separarea prin ultrafiltrare a aminoacizilor liberi și a oligopeptidelor; concentrarea prin evaporare la presiune redusă a hidrolizatului proteic din permeat, până la 10% substanță uscată, adăugarea acestui concentrat de hidrolizat peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, și uscarea prin pulverizare a amestecului; în cazul suplimentării compoziției cu seleniu chelatat în aminoacizi prelevarea a 30% din concentratul de hidrolizat proteic, complexarea aminoacizilor din hidrolizat cu seleniu eliberat treptat dintr-un compus insolubil, într-o reacție accelerată prin ultrasonicare, centrifugarea excesului de compus insolubil al seleniului și adăugarea soluției de seleniu chelatat în hidrolizat proteic, împreună cu restul de 70% din concentratul de hidrolizat proteic, peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, și uscarea prin pulverizare a amestecului.

3. Etapa de liză a biomasei umede conform procedului din revendicarea 2, **caracterizată prin aceea că** este realizată cu un amestec de enzime litice din *Trichoderma harzianum*, care include β -glucanază, celulaze și proteaze, aplicate în doză de 0,1 g de enzimă, cu activitatea de 200 unități β -glucan Botrytis per g, pentru 1 kg de biomasă umedă și ultrasonarea amestecului cu 400 W timp de 45 min la 45°C, urmată de eliminarea debriurilor celulare prin centrifugare la 7000 x g.
4. Etapă de hidroliza materialului proteic din retentat conform procedului din revendicarea 2, **caracterizată prin aceea că** este realizată cu un amestec de proteaze microbiene, 0,1 g endo-proteaze având activitatea specifică de 2,4 unități Anson (AU) per gram și 0,1 g amidopeptidaze, cu o activitate de 500 LAPU/g adăugate la 1000 ml de retentat, la pH neutru și temperatură de 55 ... 60°C, timp de 16...20 ore, urmată de ultrafiltrarea hidrolizatului cu îndepărtarea moleculelor cu o masă moleculară mai mare de 1 kDa.
5. Etapă de adăugare a concentratului de hidrolizat peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, conform procedului din revendicarea 2, **caracterizată prin aceea că** este realizată în raport de 8 părți concentrat de hidrolizat proteic la 2 părți concentrat de osmoprotectanți și fitohormoni, și este urmată de uscarea prin pulverizare a amestecului, la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.
6. Etapă eventuală de suplimentare cu seleniu a compoziției conform procedului din revendicarea 2, **caracterizată prin aceea că** este realizată prin prelevarea a 30% din concentratul de hidrolizat proteic, care se aduce peste selenit de magneziu hexahidrat, în raport de 100 ml hidrolizat la 1,37 g de selenit de magneziu hexahidrat, ultrasonarea amestecului cu 400 W timp de 30 min la 55°C, centrifugarea excesului de compus insolubil al seleniului, fiind urmată de adăugarea supernatantului conținând seleniu chelatat în hidrolizat proteic împreună cu restul de 70% din concentratul de hidrolizat, peste concentratul de osmoprotectanți și fitohormoni, în raport de 24 părți soluție seleniu hidratat la 56 părți concentrat de aminoacizi și 20 părți concentrat de osmoprotectanți și fitohormoni, și de uscarea prin pulverizare a amestecului format la o temperatură de intrare de 140... 145°C și o temperatură de ieșire de 80 ... 85°C.