



(12)

BREVET DE INVENȚIE

- (21) Nr. cerere: **a 2018 00758**
- (22) Data de depozit: **28/09/2018**
- (45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/03/2024** BOPI nr. **3/2024**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2020 BOPI nr. **3/2020**

(73) Titular:
• **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.D7, 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, ET.1, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DIMA ȘTEFAN OVIDIU, STR. ODOBEȘTI
NR.5 B, BL.M7-M7 B, SC.B-5C, ET.6, AP.72,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ZAMFIROPOL- CRISTEA VALENTIN,
DRUMUL TABEREI NR.78, BL.M40 BIS,
AP.49, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 129937 B1; CN 104892054 B

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A FERTILIZANȚILOR FOLIARI
ORGANO-MINERALI CU PENETRABILITATE FOLIARĂ
RIDICATĂ**



RO 133977 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a fertilizanților foliari organo-
2 minerali, cu penetrabilitate ridicată prin cuticula frunzelor, destinați aplicării în tehnologiile de
3 cultură a plantelor, pentru nutriția și biostimularea plantelor cultivate, în special a legumelor,
4 având aplicații în agricultură.

5 Sunt cunoscute diferite procedee de creștere a penetrabilității în interiorul frunzei a
6 componentelor fertilizanților foliari. Unul din aceste procedee este utilizarea adjuvanților de
7 stropire, care se adaugă de obicei în rezervorul echipamentelor de stropit, pentru a crește
8 performanțele produselor agrochimice aplicate prin pulverizare pe frunze. Adjuvanții de
9 stropire includ componente cu diferite roluri. În compozițiile de adjuvanți de stropire se
10 adaugă agenți de control ai derivei stropirii (driftului), care reduc formarea picăturilor fine cu
11 grad ridicat de dispersie, și agenți de hidratare, care reduc rata de evaporare a apei și a
12 compușilor activi de pe frunze. Diferite tipuri de solvenți hidrofobi, ca de exemplu uleiuri
13 minerale sau vegetale, acizi grași sau esterii alchilici ai acizilor grași, sunt utilizați în com-
14 pozițiile de adjuvanți de stropire datorită activității lor de stimulare a penetrării suspensiilor
15 apoase de produse agrochimice polare prin cuticula înalt hidrofobă a plantelor - sunt
16 denumiți și aditivi de translocare, datorită efectului de plastifiere a cuticulei. Activitatea de
17 reducere a tensiunii superficiale, exercitată de surfactanți/emulsifianți, de obicei din categoria
18 celor neionici, uzual etoxilați ai alcoolilor sau ai acizilor grași, îmbunătățește capacitatea de
19 udare și de acoperire a frunzelor.

20 Documentul brevet **RO129937 B1** se referă la un procedeu de obținere a unor
21 fertilizanți din vinasă. Procedeu conform invenției constă în separarea unui concentrat de
22 drojdie din vinasă, la care se adaugă zgură de oțelărie având un conținut de minimum 2,5%
23 oxid de mangan și 25% oxid de fier, în proporție de 2 părți zgură la 98 părți vinasă, după care
24 se adaugă și cărbune în proporție de 2 părți la 100 părți amestec vinasă zgură, se menține
25 amestecul sub agitare, pentru precipitarea acizilor humici, după care se supune filtrării, din
26 care rezultă un filtrat azotat care se utilizează ca fertilizant F1, precum și un reziduu care se
27 amestecă apoi cu cărbune vegetal, rumeguș de lemn și omogenizat de drojdie, în proporție
28 de 6:44:40:10, rezultând un fertilizant organomineral F2.

29 Brevetul **CN104892054 B** se referă la o metodă de producere a îngrășămintelor
30 fosfatice active prin utilizarea agenților bacterieni microbieni și melasă lichid rezidual de
31 alcool. Metoda cuprinde următoarele etape: (a) Filtrarea și separarea lichidului rezidual de
32 alcool de melasă prin ochiuri cu dimensiunea de 5-15 Mesh; (b) concentrarea la vid la
33 temperatură joasă a fazei lichide, conținutul de solid al concentratului fiind de 30%-50%; (c)
34 Uscarea prin pulverizare a concentratului obținut în etapa (b) pentru a obține o pulbere
35 uscată din melasă; (d) Adăugarea a 15%-30% bacterii solubilizante în fosfat (bacterii viabile
36 eficiente (cfu)/100 milioane/g \geq 200) la pulberea uscată din melasă preparată în etapa (c) în
37 funcție de raportul de masă și amestecarea uniformă pentru a obține un amestec de pulbere
38 uscată și bacterii solubilizante în fosfat; (e) Se adaugă amestecul de 10%-20% pulbere
39 uscată și bacterii solubilizatoare de fosfat în etapa (d) la 80-90% îngrășământ fosfat comun,
40 se amestecă și se agită uniform; (f) Uscarea amestecului obținut în etapa (e) la o tem-
41 peratură scăzută de $\leq 60^\circ\text{C}$ până la un conținut de umiditate de $12 \pm 2\%$, adică îngrășământ
42 fosfat activ sub formă de pulbere; (g) Trimiterea îngrășământului fosfat activ sub formă de
43 pulbere în etapa (f) într-un granulator pentru granulare; particulele preparate cu dimensiunea
44 particulelor de 1-4 mm $\leq 60^\circ\text{C}$ se usucă la o temperatură scăzută până când conținutul de
45 umiditate este mai mic de 10% și se obține îngrășământul granular fosfat activ.

46 Cererea de brevet **US 2018255772 A1** se referă la o compoziție de adjuvant de
47 stropire, care include diferite tipuri de gume vegetale (polizaharide) și, opțional, polioli, aditivi
de translocare/plasticizare, și agenți tensioactivi. Polizaharidele/gumele vegetale sunt un

RO 133977 B1

amestec de gumă xantan și konjack, carboxi-metil-celuloză (CMC) și hidroxi-propil-etil-celuloză, carrageenan și acid poligalacturonic, sau metil celuloză și pectina și/sau maltodextrină. Polioli utilizati sunt derivați polihidroxicici ai glucidelor - arabitol, eritritol, izomaltol, lactitol, maltitol, manitol, sorbitol, xilitol sau combinații ale acestora. Aditivii de translocare includ acid linoleic obținut prin hidroliza uleiului de in.

Agenții de emulsionare sunt derivați de amidon sau de gumă arabică, obținuți prin tratare cu acid octenil-succinic, extract de lemn de Panama (*Quillaja saponaria*), alcoolii grași din semințe etoxilați și propoxilați (ca de exemplu: Ecosurf™ SA-9), alchil poliglicozide (ca de exemplu: Glucopon® 425-N), sau combinații ale acestora.

Cererea de brevet **WO 9831223** descrie o compoziție care include esteri de acizi grași, etoxilați ai acizilor grași și un compus terpenic, care mărește suplimentar penetrabilitatea substanțelor active din produsele agrochimice, în special produse de protecția plantelor, prin cuticula plantelor.

Cerea de brevet **WO 9929171** prezintă o compoziție de adjuvant care include un ester al acizilor grași cu alcoolii inferiori și o combinație de surfactanți neionici și ionici.

Brevetul **SUA 6797673** revendică o compoziție de adjuvant în care exemplificarea invenției conține ulei vegetal metilat, alcool gras etoxilat/polioxileneter cu formula $H_{23}C_{11}(CH_2CH_2O)_5$ și un agent de control al derivatei picăturilor pe bază de lecitină.

Cererea de brevet **WO 2010049070** dezvăluie o compoziție de adjuvant agricol care conține esteri alchilici ai acizilor grași cu 16...22 atomi de carbon, exemplificați prin ulei etilat de floarea-soarelui cu conținut ridicat de acid oleic, surfactanți non-ionici derivați din polioli, exemplificați prin sorbitan mono/trioleat și C8-C10 alchil poliglucozide, și opțional polioli, reprezentați de glucoză sau sorbitol și/sau siliconi.

Dezavantajul unor astfel de compoziții care sunt destinate aplicării în rezervorul echipamentelor de stropit este determinat de riscul de in-compatibilitate fizico-chimică a adjuvanților cu formulele de fertilizanți foliari, care duc la precipitarea unor componente (**Webster et al. 2016. Journal of agricultural and food chemistry, 64, 6139-6147**). De asemenea, unii ioni, cum sunt de exemplu cei de zinc, nu își cresc penetrabilitatea în prezența componentelor adjuvanților de stropire (**Alexander și Hunsche, 2016, Agronomy, 6, 39**). Recent s-a demonstrat faptul că adjuvanții agricoli pot determina o creștere a transpirației frunzelor și a reducerii eficienței de utilizare a apei, datorită plastifierii stratului cuticular (**Räsch et al 2018. Plant Physiology and Biochemistry, 132, 229-237**).

O soluție alternativă de creștere a penetrabilității foliare, în special a micronutrienților, este prin chelatizare/complexare. Un exemplu este cel al compozițiilor de micronutrienți lichizi, care sunt preparate prin combinarea acidului fulvic extras din leonardit cu amoniac și săruri metalice, hidroxizi-acizi și/sau săruri metalice cu hidroxi-acizi. Compozițiile rezultate prezintă o absorbție foliară crescută (**EP 0284339 B1**).

Un alt exemplu este cel al compozițiilor care au ca agenți de chelatare proteine vegetale hidrolizate (**US 2005235718 A1**). Această soluție nu se poate aplica în cazul unor oligo-și macronutrienți, cărora nu le mărește suficient penetrabilitate foliară. De asemenea, întrucât complexarea ionilor pentru a fi eficientă în accelerarea trecerii prin bariera hidrofobă reprezentată de cuticulă se realizează cu agenți de chelatare hidrofobi, soluția aceasta de penetrare cuticulară prin chelatare nu funcționează decât pentru calea lipoidală de transport în simplast. Simplastul este cea parte a plantelor care are un metabolism intens, spre deosebire de apoplast (care include pereții celulari vegetali de exemplu) și care are un metabolism lent. Utilizarea nutrienților aplicați foliari necesită ajungerea în simplast, iar transportul în simplast se face pe două căi, calea lipoidală și cea apoasă (**Oosterhuis, 2009, Proceedings of the fluid forum, pp. 15-17**). În general, calea cea mai activă de transport în simplast este cea apoasă, în care difuzia este facilitată/activă, și nu cea lipoidală.

RO 133977 B1

1 O altă soluție de creștere a eficienței aplicării foliare este cea de nanoformulare. (Li
2 et al. 2016, RSC Advances, 73: 69465-69478). Exemplu ilustrativ este cel al nanoparticulelor
3 de silice, printre puținele forme de siliciu solubil care sunt eficiente ca nutrienți și biosti-
mulanți pentru plante în cazul aplicării foliare (Laane, 2018, Plants, 7:45).

5 Au fost brevetate o serie de procedee destinate obținerii de nanoparticule de siliciu
biogene. Brevetul **US 9403688 B1** prezintă un procedeu de obținere a nanoparticulelor de
7 silice biogene, care include următoarele etape: pre-tratamentul cojilor de semințe cu acid;
plasarea cojilor tratate cu acid într-o autoclavă la o temperatură mai mare de 100°C, timp de
9 aproximativ 2 h, sub o presiune; separarea cojilor de semințe și spălare cu apă; uscarea la
aer a cojilor de semințe, urmată de calcinarea cojilor la o temperatură cuprinsă între 500-
11 700°C, timp de cel puțin o oră, pentru a produce nanoparticule de silice biogene. Nanopar-
ticulele biogene de silice astfel obținut sunt amorfe și biocompatibile, având o dimensiune
13 a particulelor în intervalul de 25-75 nm.

15 Cererea de brevet **WO2017042011** se referă la un procedeu pentru extracția silicei
din material vegetal lignocelulozic, care cuprinde etapele de: a) fracționare a materiei
vegetale lignocelulozice în prezența unei soluții de acid astfel încât să se obțină o fracție
17 solidă cuprinzând celuloza; b) extragerea silicei din fracția solidă obținută în etapa a) cu o
soluție bazică, la un pH între 10 și 13, și la o temperatură cuprinsă între 70 și 90°C, astfel
19 încât să se obțină o fază lichidă conținând silice și o fază solidă, c) separarea fazei lichide
și a fazei solide care se obține în etapa b), d) precipitarea silicei care este cuprinsă în faza
21 lichidă, la un pH cuprins între 5 și 6 pH. Procedeele chimice de mai sus au dezavantajul unor
consumuri ridicate de acizi și baze, a căror producție are impact asupra mediului.

23 O problemă asociată nanoparticulelor este toxicitatea potențial ridicată a
nanostructurilor pentru plante și mediu înconjurător (**Pullagurala et al. 2018, Environmental**
25 **Pollution, 241, 1175-1181**). O soluție la această problemă a reprezentat-o nanoformularea
sulfatului de zinc și a chelatului de fier ca lipozomi cu stabilitate scăzută la stropire, pentru
27 a evita răspândirea în mediu (Karny, et al. 2018, Scientific reports, 8, 7589). Lipozomi
prezintă însă același dezavantaj al transportului în simplast doar prin calea lipoidală de
29 transport.

31 Problema tehnică pe care și-a propus să o rezolve invenție constă în realizarea unei
nano/micro-formulări versatile, care să asigure penetrarea prin cuticula hidrofobă și apoi să
permită transportul ionilor nutritivi în simplast atât pe calea lipoidală, cât și pe cea apoasă.
33 Este un alt obiect al acestei invenții de a compensa creșterea evaporării ca urmare a
plasticizării cuticulei sub influența agenților de translocare, prin efectele fiziologice ale
35 formulărilor de produs rezultate ca urmare a aplicării procedurii propuse.

Procedeu conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

37 - obținerea de proteină și de pereți celulari din drojdie de fermentație, de la fabricarea
berii sau a băuturilor distilate;

39 - obținerea din proteină de drojdie a unui gel plasteinic care conține micro-elemente
chelate;

41 - obținerea agenților de emulsifiere din pereți celulari de drojdie, nanoproteine și
hidrofobine;

43 - obținerea unui concentrat de betaină din melasă sau vinasă;

45 - amestecarea concentratului de betaină cu o soluție de fertilizant foliar NPK, în raport
de 1:9 g;

47 - dispersarea ca particule de microgel a plasteinei în soluția de betaină concentrată -
fertilizant foliar NPK, în raport de 1:9 g, prin ultrasonare 30 min cu 400 W;

RO 133977 B1

- microemulsionarea prin microfluidizare a soluției de plasteină - betaină concentrată - fertilizant foliar NPK într-un solvent hidrofob, ulei vegetal, esteri ai acizilor grași și amestec al acestora, în raport de 1 g amestec betaină - fertilizant foliar - plasteină cu 2 g solvent hidrofob, prin utilizarea ca emulsifiant a 2,5% din amestecul final a agenților de emulsifiere din pereți celulari de drojdie și a lecitinei co-surfactante, în raport de 3%.	1 3 5
Procedeele de obținere a proteinei și a pereților celulari de drojdie implică următoarele etape:	7
- plasmoliza unui concentrat de drojdie prin trecere printr-un omogenizator cu piston la înaltă presiune prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, 2 cicluri la 150 MPa;	9
- separarea pereților celulari de drojdie de proteine prin centrifugare la 8500xg.	
Obținerea din proteină de drojdie a unui gel plasteinic care conține micro-elemente chelatare implică următoarele etape:	11
- hidroliza materialului proteic cu un amestec de proteaze microbiene, endo-proteaze și amidopeptidaze, la pH neutru și temperatură de 55...60°C, procedeul de hidroliză enzimatică fiind continuat timp de 20...24 h, până când se atinge un randament maxim în di/tri-peptide;	13 15
- centrifugarea eventualelor resturi de material nereacționat, urmată de ultrafiltrarea hidrolizatului rezultat printr-una sau mai multe membrane care filtrează particulele cu o masă moleculară mai mare de 3 kDa;	17 19
- concentrarea prin evaporare la presiune redusă a hidrolizatului enzimatic până la 15% substanță uscată;	21
- adăugarea de săruri ale unor micro-elemente esențiale și ultrasonicarea cu 400 W a amestecului hidrolizat proteic enzimatic - compuși ai micro-elementelor esențiale, timp de 30 min la 45°C;	23
- concentrarea până la 30% a amestecului peptide - microelemente chelatare în peptide și platenizarea prin incubare cu endo-proteaze, timp de 4-5 ore la 35°C, până la formarea gelului plasteinic, urmată de încălzirea la temperatura de 95°C timp de 15 min pentru inactivarea endo-proteazei.	25 27
Fertilizantul foliar NPK este de tip 3:1:1, 2:1:1 sau 1:1:1.	29
Obținerea agenților de emulsifiere din pereți celulari de drojdie, manoproteine și hidrofobine și obținerea unui concentrat de betaină din melasă sau vinasă se fac prin metode cunoscute. Obținerea emulsifiantilor se realizează prin hidroliza cu glucanază, iar betaină este concentrată prin cromatografie de schimb ionic.	31 33
Procedeele, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:	
- determină formarea unui sistem ternar de tip nano/microemulsie hidrofil/hidrofobă, ca urmare a formulării dispersive secvențiale gel plasteinic - soluție de betaină-NPK - solvent hidrofob;	35 37
- stabilizează gelul amfifilic plasteinic datorită betainei, solat compatibil osmo-protectant;	39
- permite penetrarea prin cuticula hidrofobă datorită structurilor hidrofobe extinse, solvenți, gel plasteinic;	41
- asigură transportul ionilor nutritivi în simplast atât pe calea lipoidală, cât și pe cea apoasă;	43
- reduce rata de evaporare a apei și a compușilor activi din produsul aplicat pe frunze, datorită prezenței structurilor hidrofile, peptide și betaină;	45
- compensează creșterea evaporării apei din țesuturile plantei, ca urmare a plasticizării cuticulei sub influența agenților de translocare, prin efectele fiziologice ale betainei incluse în formula de produs rezultat;	47

RO 133977 B1

1 - formează după diluție picături cu drift redus și cu capacitate mare de udare a
frunzelor, datorită acțiunii combinate a emulsifianților din peretele celular de drojdie și a co-
3 surfactanților.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

5 Exemplul 1

7 Drojdia de la fabricarea berii se separă prin centrifugare și apoi se concentrează prin
filtrare, de exemplu, pe un filtru presă de laborator, cu plăci de polietilenă (Pure Process, Cari
Stuart Grup, Camberley, Marea Britanie). Concentratul de drojdie, cu circa 15% substanță
9 uscată, se omogenizează într-un omogenizator cu piston, GEA Niro Soavi Arriete NS2006
(GEA Niro Soavi, Parma, Italia) prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, două cicluri la 150
11 MPa. Omogenizarea la înaltă presiune determină inactivarea celulelor microbiene prin liză
indusă de variațiile de presiune și trecerea prin valva tip „muchie de cuțit”, cu exprimarea
13 componentelor citoplasmice, inclusiv a proteinelor de drojdie, și a pereților celulari de
drojdie.

15 Pereții celulari de drojdie se separă prin centrifugare, pe o centrifugă continuă de
laborator Westfalia Laboratory Separator, model SA 1-02-175 (GEA Westfalia Separator
17 Group, Oelde, Germania), care este operată la o viteză a discurilor de centrifugare de 10000
rpm, echivalent a 8500 x g; la o rată de alimentare de 1 L/min, cu separarea continuă a
19 vinasei clarificate și discontinuă a concentratului de pereți celulari, ajuns la o densitate de
1100 kg/m³.

21 În supernatantul rezultat substanța uscată este determinată după uscare la 105°C
pentru 4 h și cântărire la o balanță electronică. Un volum de supernatant corespunzând la
23 50 g de proteină substanță uscată este adăugat într-un balon de 1000 ml cu fund plat,
echipat cu condensatori de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru
25 monitorizarea temperaturii. Volumul se completează cu apă până la 250 ml, iar pH-ul este
corectat la 7 cu soluție 20% H₃PO₄. Suspensia de proteină de drojdie este încălzită la 60°C.
27 Se adaugă 0,025 g Alcalase AF 2.4 L (Novozyme, endopeptidază bacteriană din *Bacillus*
licheniformis, cu subtilizină/serin endo-peptidază ca principal component enzimatic), având
29 activitatea specifică de 2,4 unități Anson (AU) per gram. O unitate Anson este definită ca fiind
acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, digeră hemoglobina cu o viteză inițială
31 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. Se adaugă și
33 0,025 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
35 LAPU, unitate leucin-aminopeptidazică, este cantitatea de enzime care hidrolizează 1 μmol
de leucină-p-nitroanilidă per minut. Orice tip de combinație de endoproteaze și
37 amidopeptidaze/exo-proteaze poate fi folosită, cu condiția de a asigura o activitate
enzimatică similară în amestec. Amestecul suspensie de drojdie - enzime este menținut timp
39 de 16 h la 60°C și apoi este ultrafiltrat printr-o membrană de 3 kDa, folosind un sistem
Millipore Pelicon XL Biomax 5, 50 cm² with a Labscale TFF.

41 La 1 ml de permeat/ultrafiltrat sunt adăugați 3 ml de soluție 5% acid tricloracetic
(TCA). Nu rezultă un precipitat, iar aceasta demonstrează că în permeat sunt numai
43 aminoacizi liberi și di/ tri-peptide. Permeatul este concentrat prin evaporare sub vid până la
15% substanță uscată (determinată refractometric). Circa 200 de ml de hidrolizat enzimatic
45 concentrat la 15% este introdus într-un balon de 1000 ml cu fund plat, echipat cu con-
densatori de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru monitorizarea temperaturii.
47 Peste acest hidrolizat se adaugă ioni metalici. Se ține cont de faptul că reacția de
complexare aminoacizi - ioni metalici este în raport stoichiometric de 2 moli de aminoacizi
49 la 1 mol de compus al micro-elementului, și se consideră o masă moleculară medie a

RO 133977 B1

aminoacizilor din drojdie de 136 dal. Ceea ce înseamnă circa 220 mM de aminoacizi prezenți în cei circa 200 ml cu 15% - 30 g aminoacizi. Se adaugă în serie, treptat și sub agitare: 14,3 ml soluție FeSO₄ 0,5 M; 26,6 ml soluție MnSO₄ 0,25 M; 5,6 ml soluție CuSO₄ 0,1 M, 11 ml soluție H₃BO₃ 1M, 5 ml soluție MgSO₄ 1M, 10 ml soluție Na₂SeO₄, 9 ml soluție ZnSO₄ 0,1 M, 11 ml soluție Na₂MoO₄ 0,01 M. Suspensia este amestecată viguros cu un agitator magnetic și încălzită până la 45°C. Se scoate pâlnia și se introduce o sondă ultrasonică. Amestecul de hidrolizat proteic/peptide de drojdie și de săruri minerale este sonicat pentru 30 min la 400 W.

Amestecul de peptide - microelemente chelatare în peptide se trece într-un evaporator rotativ (Rotavapor® R-300, Büchi Labortechnik, Flawil, Elveția) și se concentrează până la 30%. Cei circa 100 ml se trec cantitativ în balon de 1000 ml cu fund plat, echipat cu condensatori de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru monitorizarea temperaturii. Se adaugă 0,05 g Alcalase AF 2.4 L (Novozyme) și se plasteinizează amestecul prin incubare, timp de 4-5 h la 35°C, până la formarea gelului plasteinic. Se încălzește la temperatura de 95°C timp de 15 min pentru inactivarea endo-proteazei. Se răcește la temperatura camerei.

În paralel se obțin agenți de emulsifiere din pereți celulari de drojdie, manoproteine și hidrofobine prin extracție enzimatică cu beta-glucanază. Printr-o metodă cunoscută (Cameron et al. 1988. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 1420-1425). 500 g de pereți celulari se aduc în balon în balon de 2500 ml cu fund plat, echipat cu condensatori de reflux, pâlnie de adăugare și termorezistență pentru monitorizarea temperaturii. Se adaugă 1500 ml apă pură miliQ și 0,2 g de beta-glucanază (EMLASE, endo-1,3-(3-D-Glucanază din *Trichoderma* sp. Megazyme, Bray, County Wicklow), cu 15 unități U per mg. O unitate de activitate endo-1,3-β-D-Glucanază este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care eliberează 1 μmol de glucide reducătoare echivalent glucoza per min din CM-Curdlan (5 mg/ml) în tampon acetat (200 mM) la pH 4,5 și 40°C. Se menține 24 h la 45°C. Se inactivează enzima prin încălzire la temperatura de 95°C timp de 15 min. Se separă prin centrifugare pereții celulari de drojdie nesolubiliți, iar supernatantul cu manoproteine și hidrofobine eliberate din peretele celular de drojdie se uscat prin pulverizare la 140...150°C temperatură de intrare și 80...85°C temperatură de ieșire, pe o instalație de uscare prin pulverizare (Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik). Se obțin 105-107 g de emulsifianți.

Obținerea unui concentrat de betaină din melasă se face printr-o metodă cunoscută (Kotsiopoulou et al. 2016. *Journal of Molecular Liquids*, **216**, 496-502), prin cromatografie de schimb ionic pe o coloană umplută cu Amberlite IR-100 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, US). Din 2,5 kg de melasă se obțin 125 g de betaină de puritate 90%.

Orice alte metode de obținere a agenților de emulsifiere din pereți celulari de drojdie sau de betaină cunoscută poate fi folosită, cu condiția de a permite obținerea cantităților necesare de compuși.

Se iau 100 g de betaină și se amestecă cu 900 g fertilizant NPK 3:1:1 echivalent cu N:P₂O₅:K₂O = 129,15:43,5:43,5. După dizolvarea totală se dispersează ca particule de microgel plasteină din soluția de betaină concentrată - fertilizant foliar NPK, în raport de 100 g plasteină concentrată la 900 g, prin omogenizare cu ultrasunete, pentru 30 min la 400 W.

Se preia cantitativ soluția de betaină concentrată - fertilizant foliar NPK - plasteină cu chelați metalici și se amestecă cu 2 kg solvent hidrofob, esteri etilici ai acizilor grași din semințe de rapiță, 75 g de agenților de emulsifiere din pereți celulari de drojdie și 90 g de lecitină (Thermolec® WFC, Archer Daniels Midland, Decatur, IL, SUA). Soluția rezultată se microemulsionează prin folosirea unui microfluidizator (LM20, Microfluidics, Westwood, MA, US), cu cameră diamantată în formă de Y.

RO 133977 B1

1 Rezultă în final o microemulsie stabilă, care este analizată din punct de vedere al
3 compoziției. Azotul total se determină după reducerea nitraților la amoniac cu fier metalic în
5 mediu acid și hidroliza azotului amidic, urmată de determinarea amoniacului. După digestia
7 cu acid sulfuric 30%, amoniacul pus în libertate cu o soluție alcalină este absorbit într-un
9 exces de soluție standard de acid sulfuric. Excesul de acid este titrat cu o soluție de hidroxid
11 de sodiu cu titru cunoscut, în prezența indicatorului mixt.

13 Fosforul total este analizat în două etape: extracția fosforului în solventul adecvat,
15 urmată de determinarea gravimetrică a fosforului extras. Metoda gravimetrică se bazează
17 pe reacția fosforului solubil din proba cu reactivul chinolinmolibdat de amoniu, în urma căreia
19 precipită acidul chinolinmolibdofosforic, care este filtrat, uscat și cântărit.

21 Determinarea potasiului total se realizează gravimetric. Precipitarea ionilor de potasiu
23 prezenți într-o cotă parte din soluția apoasă de probă, se realizează cu tetrafenilborat de
25 sodiu (STPB) în mediu slab alcalin. Întrucât STPB este un reactiv selectiv nu numai pentru
27 potasiu, ci și pentru amoniu, interferența ionilor de amoniu se
29 îndepărtează prin adăugarea de formaldehidă, pentru a forma hexametilentetramină, care
31 nu interfera în analiză.

33 Determinarea concentrației microelementelor se efectuează prin metoda ICP-OES
35 (Spectrometrie de Emisie Optică cu Plasma Cuplata Inductiv), după extracția în apă a probei.
37 Betaina este analizată prin cromatografie de lichide de înaltă performanță. Rezultatele sunt
39 prezentate în tabelul 1 de mai jos.

Compoziția probei de fertilizant foliar realizat conform exemplului 1

Tabelul 1

Nr. crt.	Analit	U.M.	Produs conf. exemplul 1
1	Azot total, N	g/L	52,85
2	Fosfor total	g/L, exprimat ca și P ₂ O ₅	18,30
3	Potasiu solubil apa	g/L, exprimat ca și K ₂ O	19,10
4	Betaină	g/L	8,35
5	Fier	g/L	0,20
6	Mangan	g/L	0,18
7	Cupru	g/L	0,09
8	Bor	g/L	0,06
9	Magneziu	g/L	0,06
10	Seleniu	g/L	0,03
11	Zinc	g/L	0,03
12	Molibden	g/L	0,01
13	pH	unități pH	4,37
14	Densitate	kg/L	1,082

RO 133977 B1

Exemplul 2

Se procedează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: se utilizează drojdie de fermentație de la fabricarea băuturilor alcoolice, se folosește vinasă ca sursă de betaină, se utilizează ulei vegetal de floarea-soarelui ca element de suspensie final.

Exemplul 3

Se procedează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe: se utilizează ulei vegetal de floarea-soarelui în amestec cu esteri etilici rezultați din ulei de floarea-soarelui, 50-50%.

1

3

5

7

Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a fertilizanților foliari organo-minerali cu penetrabilitate foliară ridicată, **caracterizat prin aceea că**, este alcătuit din următoarele etape: obținerea de proteină și de pereți celulari din drojdie de fermentație, de la fabricarea berii sau a băuturilor distilate; obținerea din proteină de drojdie a unui gel plasteinic care conține micro-elemente chelate; obținerea agenților de emulsifiere din pereți celulari de drojdie, manoproteine și hidrofobine; obținerea unui concentrat de betaină din melasă sau vinasă; amestecarea concentratului de betaină cu o soluție de fertilizant foliar NPK, în raport de 1:9 g; dispersarea ca particule de microgel a plasteinei în soluția de betaină concentrată - fertilizant foliar NPK, în raport de 1:9 g, prin ultrasonare 30 min cu 400 W; microemulsionarea prin microfluidizare a soluției de plasteină - betaină - fertilizant foliar într-un solvent hidrofob, ulei vegetal, esteri ai acizilor grași și amestec al acestora, în raport de 1 g amestec betaină - fertilizant foliar - plasteină cu 2 g solvent hidrofob, prin utilizarea ca emulsifiant a 2,5% din amestecul final a agenților de emulsifiere din pereți celulari de drojdie și a lecitinei co-surfactante, în raport de 3%.

5

7

9

11

13

15

17

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, obținerea din proteină de drojdie a unui gel plasteinic care conține micro-elemente chelate implică următoarele etape: hidroliza materialului proteic cu un amestec de proteaze microbiene, endo-proteaze și amidopeptidaze, la pH neutru și temperatură de 55...60°C, procedeul de hidroliză enzimatică fiind continuat timp de 20...24 h, până când se atinge un randament maxim în di/tri-peptide; centrifugarea eventualelor resturi de material nereacționat, urmată de ultrafiltrarea hidrolizatului rezultat printr-una sau mai multe membrane care filtrează particulele cu o masă moleculară mai mare de 3 kDa; concentrarea prin evaporare la presiune redusă a hidrolizatului enzimatic până la 15% substanță uscată; adăugarea de săruri ale unor micro-elemente esențiale și ultrasonizarea cu 400 W a amestecului hidrolizat proteic enzimatic - compuși ai micro-elementelor esențiale, timp de 30 min la 45°C; Concentrarea până la 30% a amestecului peptide - microelemente chelate în peptide și platenizarea prin incubare cu endo-proteaze, timp de 4-5 h la 35°C, până la formarea gelului plasteinic, urmată de încălzirea la temperatura de 95°C timp de 15 min pentru inactivarea endo-proteazei.

19

21

23

25

27

29

31

33

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, fertilizantul foliar NPK este de tip 3:1:1, 2:1:1 sau 1:1:1.

