



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2018 01012**

(22) Data de depozit: **03/12/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI
PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

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

• **CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **BĂRBIERU OTILIA GABRIELA,
STR.GHEORGHE DOJA, NR.5, BL.7A, SC.4,
ET.1, AP.62, GALAȚI, GL, RO;**
• **DIMITRIU LUMINIȚA,
ALEEA BARAJULUI BICAZ, NR.9, BL.M31,
SC.B, ET.2, AP.408, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TRITEAN NAOMI, STR.PERFEȚIONĂRII,
NR.11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **BIOSTIMULANT PE BAZĂ DE OLIGOZAHARINE
SINERGIZATE, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biostimulant pentru plante, pe bază de oligozaharine sinergizate. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de măcinare umedă a substratului epuizat de ciuperci lignocelulozice, amestecarea cu tampon fosfat, ajustarea pH la valoarea de 6...6,2, aducerea la temperatura de 30°C, adăugarea de surfactant amfifil neionic, cu agitare timp de 15 min la temperatura de 30°C pentru a facilita extracția de hidrofobine, tratarea cu un amestec de enzime litice și incubarea timp de

24 h la temperatura de 45°C pentru eliberarea de oligozaharine și peptide bioactive, separarea prin centrifugare a substratului ne-extras de extractul apos, concentrarea supernatantului și uscarea prin pulverizare, rezultând un bioproduct având un conținut de minimum 10% oligozaharine, respectiv 5% peptide, 0,5% surfactanți, inclusiv hidrofobine.

Revendicări: 6



33

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRC
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>2018 01012</u>
Data depozit <u>03-12-2018</u>

BIOSTIMULANT PE BAZĂ DE OLIGOZAHARINE SINERGIZATE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la un biostimulant pentru plante pe bază de oligozaharine, extrase din substrat epuizat de *Pleurotus*, și sinergizate prin utilizarea de hidrolizate proteice și proteine amfifile, ca și la un procedee de obținerea a acestuia.

Sunt cunoscute utilizări ale substratului epuizat de la cultura ciupercilor în tehnologiile de cultura plantelor, în special pentru ameliorarea caracteristicilor solului / substratelor de cultură. Aceste procedee urmăresc valorificarea superioară a unui co-produs agro-industrial produs în cantități din ce în ce mai mari. Pentru 1 kg de ciuperci se generează 5 kg de substrat epuizat, producția anuală de substrat epuizat depășind cu mult 5 milioane de tone (Mohd Hanafi et al. 2018. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 20: 1383-1396). Sistemele enzimatic implicate în degradarea lignocelulozei, laccaze, xilanaze, lignin-peroxidaze, celulaze și hemicelulaze, prezente în cantități mari în substratul epuizat de la cultura ciupercilor lignocelulozite, au efecte de accelerare a formării humusului și de degradare a unor contaminanți de tipul hidrocarburilor aromatice sau reziduurilor de pesticide (Phan și Sabaratnam, 2012, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 863-873). Chitina din substratul epuizat determină o creștere a activității microorganismelor chitinolitice din sol, cu suprimarea bolilor plantelor (Parada et al. 2012, *Journal of Phytopathology*, 160: 390-396). Chitosanul format prin deacetilarea chitinei are efecte de biostimulant de creștere, cu activarea sistemelor de rezistență și stimularea creșterii plantelor (Kwak et al. 2015, *Mycobiology*, 43: 311-318). Substratul epuizat de la cultura ciupercilor a fost folosit și pentru producerea de biopreparate de uz agricol, prin cultivare în regim de fermentație (semi)solidă a tulpinilor entomopatogene de *Bacillus thuringiensis* (Wu, et al. 2014, *Journal of Economic Entomology*, 107: 137-143); antagoniste de *Trichoderma viride* (Brevet RO126363 B1, cu formarea de composturi / soluri supresive pentru fungii micotoxigeni din grupul *Fusarium graminearum*), solubilizatoare de fosfor *Pichia farinose* (Zhu et al. 2012, *Bioresource Technology*, 111: 410-416).

Întrucât utilizarea în practică a substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor lignocelulozice pentru tratamentul solului prezintă o serie de dezavantaje, determinate determinată de dificultatea distribuirii uniforme a unui material înalt heterogen (paie

parțial degradate, înglobate randomizat în miceliu de ciuperci) pe suprafața solului, sau de lipsa activității biologice, au fost propuse soluții tehnice de compactare și/sau biofortifiere. Cererea de brevet RO131931 A2 se referă la obținerea unor pelete, bioactivate cu microorganisme, din substrat epuizat de la cultura ciupercilor lignocelulozice, în special *Pleurotus*. Peletele bioactivate sunt destinate tratamentului solului și/sau resturilor vegetale care acoperă solul, în cazul sistemelor de agricultură conservativă.

Dezavantajul major al unor astfel de procedee de peletizare și biofortifiere pentru utilizarea substratului epuizat de la cultivarea ciupercilor, sunt determinate de costurile energetice mari necesare stabilizării prin uscare, care nu sunt de obicei acoperite de valoarea de utilizare a bioprodusului rezultat ca amendament / ameliorator de sol.

Substratul epuizat de la producerea ciupercilor lignocelulozice conține un amestec de compuși valoroși, polizaharide bioactive, inclusiv chitină și polizaharide anionice, celuloză parțial degradată, enzime oxo-hidro-degradative (Phan et al. 2012, *Applied Microbiology and Biotechnology* 96: 863-873). Printr-un proces de hidroliză enzimatică din substratul epuizat de *Pleurotus* s-ar putea recupera oligozaharine, respectiv oligozaharide cu funcție reglatoare la plante (Albersheim 1992. *Accounts of Chemical Research*, 25: 77-83). Oligozaharinele sunt implicate în reglarea diferitelor procese din plante, de la reglarea creșterii și dezvoltării (Creelman et al. 1997, *The Plant Cell*, 9: 1211-1223), până la amorsarea sistemului de apărare (Larskaya și Gorshkova, 2015, *Biochemistry (Moscow)* 80: 881-900) și creșterea toleranței la frig (Zabotin, et al. 2005, *Plant Biosystems*, 139: 36-41).

Endo-semnalele bioactive de tipul oligozaharinelor, care accelerează răspunsul plantelor la factorii de stres, sunt utile pentru a realiza noua generație de biostimulanți pentru plante, caracterizată prin sinergismul componentelor (Rouphael și Colla, 2018, *Frontiers in Plant Science*, 9, 1655). Biostimulanții pentru plante sunt o nouă clasă de produse utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, care determină: creșterea eficienței de preluare și utilizare a nutrienților de către plante, mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici și îmbunătățirea calității recoltei (du Jardin, 2015. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14). Interesul crescut pentru biostimulanți este determinat de faptul că această nouă clasă de inputuri agricole asigură o intensificare sustenabilă a

producțiilor agricole în condițiile schimbărilor climatice (Calvo et al. 2014, *Plant and Soil*, **383**, 3-41).

Substratul epuizat de *Pleurotus* (SPS), constituit din material lignocelulozic parțial degradat, întretesut cu miceliu de *Pleurotus*, reprezintă o sursă semnificativă de precursori pentru biostimulanți pentru plante, respectiv chitină – chitosan; proteine – peptide bioactive; polizaharide anionice – oligozaharine (oligozaharide cu rol de semnal pentru celulele vegetale). Recent a fost demonstrată acțiunea biostimulantă pentru plante a SPS (Oancea et al., 2017, *Acta Horticulturae* 1164: 55-62).

Structura complexă a substratului epuizat de *Pleurotus* ar permite obținerea prin hidroliză enzimatică a majorității oligozaharinelor implicate în modularea proceselor fiziologice din plante, oligozaharine pectice / conținând acizi uronici (Dumville și Fry, 2000, *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 125-140); xiloglucan-oligozaharide (Pavlova et al. 1996, *Russian Journal of Plant Physiology*, 43: 242-246. N-glican oligozaharine, (Field, 2009, în *Plant-derived natural products*, pp. 349-359. Springer, New York), chitin și chitosan oligozaharine (Yin et al. 2016, *Frontiers in Plant Science*, 7: 522). De asemenea hidroliza enzimatică ar permite eliberarea și de peptide bioactive, care ar acționa sinergic cu oligozaharinele (Colla et al. 2017. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2202; Yakhin et al. 2017, *Frontiers in Plant Science*, 7, 2049).

Un astfel de biostimulant pentru plante realizat ar trebui aplicat foliar, întrucât oligozaharinele sunt rapid degradate în sol. O primă problemă tehnică este însă legată de penetrabilitatea foliară redusă, prin cuticula hidrofobă, a unor structuri amfifile, cu o masă moleculară relativ ridicată. Sunt cunoscute diferite procedee de creștere a penetrabilității în interiorul frunzei a componentelor hidrofile. Unul din aceste procedee este utilizarea adjuvanților de stropire, care se adaugă de obicei în rezervorul echipamentelor de stropit, pentru a crește performanțele produselor agrochimice aplicate prin pulverizare pe frunze. Adjuvanții de stropire includ componente cu diferite roluri. În compozițiile de adjuvanți de stropire se adaugă agenți de control ai derivei stropirii (driftului), care reduc formarea picăturilor fine cu grad ridicat de dispersie, și agenți de hidratare, care reduc rata de evaporare a apei și a compușilor activi de pe frunze. Diferite tipuri de solvenți hidrofobi, ca de ex. uleiuri minerale sau vegetale, acizi grași sau esterii alchilici ai acizilor grași, sunt utilizați în compozițiile de adjuvanți de stropire datorită activității lor de stimulare a penetrării suspensiilor apoase de produse

agrochimice polare prin cuticula înalt hidrofobă a plantelor – sunt denumiți și aditivi de translocare, datorită efectului de plastifiere a cuticulei. Activitatea de reducere a tensiunii superficiale, exercitată de surfactanți / emulsifianți, de obicei din categoria celor neionici, uzual etoxilați ai alcoolilor sau ai acizilor grași, îmbunătățește capacitatea de udare și de acoperire a frunzelor.

Cererea de brevet US 2018255772 A1 se referă la o compoziție de adjuvant de stropire, care include diferite tipuri de gume vegetale (polizaharide) și, opțional, polioli, aditivi de translocare / plasticizare, și agenți tensioactivi. Polizaharidele / gumele vegetale sunt un 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 utilizați sunt derivați polihidroxicilici 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*), alcooli grași din semințe etoxilați și propoxilați (ca de ex. Ecosurf™ SA-9), alchil poliglicozide (ca de ex. Glucopon® 425-N), sau o combinații ale acestora.

Cererea de brevet WO9831223 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 WO9929171 prezintă o compoziție de adjuvant care include un ester al acizilor grași cu alcooli inferiori și o combinație de surfactanți neionici și ionici. Brevetul SUA 6,797,673 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 derivei picăturilor pe bază de lecitină. Cererea de brevet WO2010049070 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 adjuvanți 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).

Substratul epuizat de ciuperci lignocelulozice conține cantități semnificative din proteine amfifile – hidrofobine: POH1, POH2, POH3 (Asgeirsdottir et al. 1998, *Microbiology*, 144, 2961-2969), Vmh2 (Gravagnuolo et al. 2016. *Biomacromolecules*, 17, 954-964) și PN1 (Zhang et al. 2015. *European Journal of Plant Pathology*, 143, 823-831) la *Pleurotus*, Hyd la *Flammulina velutipes* (Kim et al. 2016. *Mycoscience*, 57, 320-325), cu 8 punți de cisteină conservate evolutiv la *Phlebia brevispora*, *Ganoderma* sp. și *Bjerkandera adusta* (Mgbeahuruike et al. 2013, *Mycologia*, 105, 1471-1478). Unul din funcțiile fiziologice majore ale hidrofobinele este de a asigura trecerea prin bariera hidrofobă a frunzelor (Skamnioti și Gurr 2008, *Plant Signaling & Behavior*, 3: 248-250). Hidrofobinele sunt percepute de plante ca fiind un tipar molecular asociat microbilor (MAMPs), deci au o acțiune de activare a răspunsului de apărare din plante, și implicit, un efect complementar / sinergic cu oligozaharinele.

Însă în cazul utilizării unui cocktail enzimatic, care să realizeze eliberarea majorității tipurilor de oligozaharine, ca și a peptidelor bioactive, hidrofobinele ar fi și ele hidrolizate și nu ar mai putea fi utilizate pentru a facilita penetrarea compușilor hidrofilii, oligozaharine și peptide bioactive, prin cuticula foliară sau pentru a sinergiza activarea răspunsului de apărare din plante.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a dezvolta un procedeu prin care să se elibereze oligozaharine și peptide bioactive din substratul epuizat de la cultivarea ciupercilor lignocelulozice, fără însă a fi afectate hidrofobinele.

Biostimulantul pentru plante pe bază de hidrofobine sinergizate conține min. 10% oligozaharine, min. 5% peptide și cel puțin 0,5% surfactanți, inclusiv hidrofobine, și este

obținut din substrat epuizat de ciuperci lignocelulozolitice tratat cu un cocktail enzimatic care conține celulaze, β 1-3 și β 1-6 glucanaze, proteaze și chitinaze.

Substratul epuizat provine de la ciupercile *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus eryngii*; *Filammulina velutipes*; *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*.

Procedeeul de obținere a biostimulantului pe bază de oligozaharine este alcătuit din următoarele etape:

- Măcinarea umedă a substratului epuizat, cu reducerea dimensiunii particulelor la mai puțin de 1 mm;
- Amestecarea substratului măcinat cu 0,1 M tampon fosfat, în raport de 1 kg substrat epuizat umed la 19 L de tampon fosfat
- Ajustarea pH-ului la valori de 6,0 – 6,2, aducerea la temperatura de 30°C, și adăugarea 0,1- 0,3% a unui surfactant amfifil ne-ionic;
- Agitarea timp de 15 min, la temperatura de 30°C, pentru a facilita extracția hidrofobinelor în interiorul structurilor purtător amfifile;
- Adăugarea unui amestec de enzime litice produse de *Trichoderma harzianum*, care include celulaze, β 1-3 și β 1-6 glucanaze, proteaze și chitinaze, și incubarea timp de 24 ore la temperatura de 45°C, pentru eliberarea de oligozaharine și peptide bioactive;
- Separarea prin centrifugare la 3500 x g a substratului ne-extras de extractul apos;
- Concentrarea supernatantului până la 5% substanță uscată și uscarea prin pulverizare blândă, la o temperatură de intrare a aerului de 140 – 145°C și o temperatură de ieșire de 70 - 75°C;

Surfactanții folosiți sunt: eter alchilic de polioxietilen; tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hidrofob de polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol, sau combinații ale acestora.

Enzimele folosite au rolul principal de a liza pereții celulari ai miceliului ciupercilor lignocelulozice din substratul epuizat și de a activa enzimele existente în acesta, laccaze, xilanaze, lignin-peroxidaze, celulaze și hemicelulaze.

Raportul în care se introduce cocktailul enzimatic este de 20 ml complex de enzime care lizează peretele celular, produs de *Trichoderma harzianum*, cu 1,5 mg/ml proteină și minimum 200 unități β -glucan Botrytis per g, la 1 kg de substrat epuizat umed.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Protejează hidrofobinele prin înglobare în structuri micelare, neaccesibile apei, și în care deci nu pot acționa proteazele
- ✓ Activează enzimele existente în substratul epuizat, laccaze, xilanaze, lignin-peroxidaze, celulaze și hemicelulaze, sub acțiunea cocktailului enzimatic care conține enzime destinate lizei pereților celulari;
- ✓ Eliberează diferite tipuri de oligozaharine implicate în modularea proceselor fiziologice din plante, oligozaharine pectice / conținând acizi uronici, xiloglucan-oligozaharide, N-glican oligosaharine, chitin și chitosan oligozaharine;
- ✓ Sinergizează acțiunea de biostimulant pentru plante a oligozaharinelor prin asocierea cu peptide bioactive și cu hidrofobine elicitor al răspunsului de apărare;
- ✓ Facilitează penetrarea prin cuticula hidrofobă a amestecului hidrofil de oligozaharine și peptide bioactive.

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

Exemplu 1. Substratul epuizat umed de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus ostreatus* este măcinat pe o moară cu cuțite (Willey model 4, Thomas, Thermo Fischer, Waltham, MA, SUA), prevăzută cu o sită de 1 mm. Se cântărește 1 kg din materialul vegetal măcinat umed, care se trece într-un vas de sticlă Simax[®] de 30 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, și agitare mecanică, împreună cu 9 litri de soluție 0,1 M tampon fosfat, cu pH-ul ajustat la 5,6. Se incubă sub agitare timp de 15 min la 30°C. Se aduce la temperatura de 30°C. Se introduc 19 g de eter etilic de polioxietilen (20) (Brij[®] 98, Croda International, Snaith, Marea Britanie). Se agită timp de 15 min, la temperatura de 30°C, pentru a facilita extracția hidrofobinelor în interiorul structurilor purtător amfifile. Se ridică temperatura la 45°C și se adaugă 20 ml complex de enzime care lizează peretele celular, produs de *Trichoderma harzianum*, cu 1,5 mg/ml proteină și minimum 200 unități β-glucan *Botrytis* per g.

Complexul de hidrolaze folosit este Glucanex 200 G (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Danemarca), un amestec de enzime litice din *Trichoderma harzianum*, care include celulaze, β 1-3 și β 1-6 glucanaze, proteaze și chitinaze. 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. Se incubă timp de 24 ore, și se separă prin centrifugare continuă pe o centrifugă continuă de laborator Westfalia Laboratory Separator, model SA 1-02-175 (GEA Westfalia Separator Group, Oelde, Germania), care este operată la o viteză a discurilor de centrifugare de 5000 rpm, echivalent a 3500 x g; la o rată de alimentare de 1 litru/min, cu separarea continuă a extractului apos clarificat și discontinuă a substratului ne-extras de extractul apos. Supernatantul apos este concentrat prin evaporare până la 5 % substanță uscată prin folosirea unui Evaporator 25l/h Simax[®] (Kavalier). Se usucă prin pulverizare blândă, pe un uscător cu pulverizare (Mini Spray-Dryer, Buchi), la o temperatură de intrare a aerului de 140 – 145°C și o temperatură de ieșire de 70 - 75°C. In produsul uscat se determină prin lichid cromatografie de înaltă presiune conținutul de oligozaharine, peptide și surfactanți. Bioproductul rezultat conține min. 10% oligozaharine, min. 5% peptide și cel puțin 0,5% surfactanți, inclusiv hidrofobine.

Substratul epuizat provine de la ciupercile *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus eryngii*; *Filammulina velutipes*; *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*.

Exemplul 2. Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Substratul epuizat este de la cultura ciuperci *Pleurotus eryngii*. Surfactantul ne-ionic utilizat este un tribloc co-polimer, cu o masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22, fiind cunoscut sub denumirea comercială de Pluronic[®] F127 (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Germania). Acesta se adaugă într-o concentrație de 0,3%, respectiv 27,6 g. pH-ul se ajustează la valoarea 6.2.

Exemplul 3. Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Substratul epuizat este de la cultura ciuperci *Filammulina velutipes*. Surfactantul ne-ionic utilizat este amestec, de tribloc co-polimer, cu o masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22, cunoscut sub denumirea comercială de Pluronic[®] F127 (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Germania) și de eter etilic de polioxietilen (20) (Brij[®] 98, Croda International, Snaith, Marea Britanie). Acesta se adaugă într-o concentrație de 0,2%, respectiv 18,4 g. pH-ul se ajustează la valoarea 6.0.

Exemplul 4. Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Substratul epuizat este de la cultura ciuperci *Ganoderma lucidum*.

Exemplul 5. Se procedează la fel ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Substratul epuizat este de la cultura ciuperci *Lentinus edodes*.

Revendicări

1. Biostimulant pentru plante pe bază de hidrofobine sinergizate conform invenției **caracterizat prin aceea că** include min. 10% oligozaharine, min. 5% peptide și cel puțin 0,5% surfactanți, inclusiv hidrofobine, și este obținut din substrat epuizat de ciuperci lignocelulozolitice tratat cu un cocktail enzimatic care conține celuleze, β 1-3 și β 1-6 glucanaze, proteaze și chitinaze.

2. Biostimulant pentru plante pe bază de hidrofobine sinergizate conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** Substratul epuizat provine de la ciupercile *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus eryngii*; *Filammulina velutipes*; *Ganoderma lucidium*, *Lentinus edodes*.

3. Procedul de obținere a biostimulantului pe bază de oligozaharine sinergizate conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: măcinarea umedă a substratului epuizat, cu reducerea dimensiunii particulelor la mai puțin de 1 mm; amestecarea substratului măcinat cu 0,1 M tampon fosfat, în raport de 1 kg substrat epuizat umed la 19 L de tampon fosfat; ajustarea pH-ului la valori de 6,0 – 6,2, aducerea la temperatura de 30°C, și adăugarea 0,1- 0,3% a unui surfactant amfifil ne-ionic; agitarea timp de 15 min, la temperatura de 30°C, pentru a facilita extracția hidrofobinelor în interiorul structurilor purtător amfifile; adăugarea unui amestec de enzime litice produse de *Trichoderma harzianum*, care include celuleze, β 1-3 și β 1-6 glucanaze, proteaze și chitinaze, și incubarea timp de 24 ore la temperatura de 45°C, pentru eliberarea de oligozaharine și peptide bioactive; separarea prin centrifugare la 3500 x g a substratului ne-extras de extractul apos; concentrarea supernatantului până la 5% substanță uscată și uscarea prin pulverizare blândă, la o temperatură de intrare a aerului de 140 – 145°C și o temperatură de ieșire de 70 - 75°C.

4. Procedul de obținere a biostimulantului pe bază de oligozaharine sinergizate conform revendicării 3 **caracterizat prin aceea că** surfactanții folosiți sunt: eter alchilic de polioxietilen; tribloc co-polimer, format dintr-un bloc central hde polipropilenglicol, flancat de două blocuri hidrofile de polietilenglicol, sau combinații ale acestora.

5. Procedul de obținere a biostimulantului pe bază de oligozaharine sinergizate conform revendicării 3 **caracterizat prin aceea că** enzimele folosite au rolul principal de a liza pereții celulari ai miceliului ciupercilor lignocelulozice din substratul

epuizat și de a activa enzimele existente în acesta, laccaze, xilanaze, lignin-peroxidaze, celulaze și hemicelulaze.

6. Procedul de obținere a biostimulantului pe bază de oligozaharine sinergizate conform revendicării 3 **caracterizat prin aceea că** raportul în care se introduce cocktailul enzimatic este de 20 ml complex de enzime care lizează peretele celular, produs de *Trichoderma harzianum*, cu 1,5 mg/ml proteină și minimum 200 unități β -glucan Botrytis per g, la 1 kg de substrat epuizat umed.