



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00805

(22) Data de depozit: 29/12/2021

(41) Data publicării cererii:
30/06/2022 BOPI nr. 6/2022

(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,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• FARAON VICTOR, STR. BAIA MARE
NR. 4, BL. 5, SC. 2, ET. 2, AP. 43,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• MIHĂILĂ ELIZA GABRIELA,
BD.RÂMNICU SĂRAT, NR.6, BL.21B, SC.A,
ET.7, AP.45, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) BIOSTIMULANT PENTRU PLANTE PE BAZĂ
DE HIDROLIZAT DE KERATINĂ ȘI SOLVENȚI EUTECTICI
ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTUIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de biostimulant pentru plante și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția, conform invenției, este constituită din 47,03...51,96% keratină solubilă, 30,34...33,46% 2,3-butanol, 15,67...17,28% clorură de colină, 2,02...2,23% apă și are o activitate de inducere a pompei de protoni pe plante de test de tomate de min 175% față de martor. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: obținerea solventului eutectic din

clorură de colină, 2,3-butandiol izomer 2R, 3R și apă, extracția keratinei din lână sau pene, filtrarea sub presiune, ultrafiltrare pentru recuperarea din filtrat a solventului eutectic, recuperarea retentatului care este utilizat ca biostimulant pentru plante prin tratarea semințelor.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



BIOSTIMULANT PENTRU PLANTE PE BAZĂ DE HIDROLIZAT DE KERATINĂ ȘI SOLVENȚI EUTECTICI ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTUIA

Prezenta invenție se referă la un biostimulant pentru plante pe bază de keratină și solvenți eutectici, destinat tratamentului la sămânță pentru creșterea eficienței de preluare și de utilizare a nutrienților și pentru ameliorarea toleranței plantelor la factorii de stres biotici și abiotici.

Sunt cunoscute diferite compoziții pe bază de keratină, destinate tratamentului plantelor de cultură. Cererea de brevet WO2021221567 A1 descrie un substrat de creștere pentru plante pe bază de keratină, alcătuit dintr-un derivat de keratină și un biopolimer natural, în care derivatul de keratină și biopolimerul natural sunt reticulate. Compoziția se formează printr-un procedeu care cuprinde (i) amestecarea unei soluții de derivat de keratină cu o soluție de biopolimer natural, ca de exemplu celuloză nanofibrilată, și (ii) uscarea soluției rezultate din etapa anterioară pentru a obține substratul pe bază de keratină.

Cererea de brevet WO2016182515A1 prezintă un procedeu de preparare a unui fertilizant pe bază de keratină și acizi humici coloidal, care se obține hidroliza cu hidroxid de potasiu a materialelor keratinice, urmată de neutralizarea cu acid citric, acid formic sau acid acetic și amestecarea cu săruri minerale.

Cererea de brevet CN111848291A se referă la un îngrășământ organic cu eliberare lentă care este acoperit și cu hidrolizat de keratină. Procedeu include următoarele etape: 50 părți-100 părți dintr-o granulă de îngrășământ se acoperă cu 15 părți peliculă de etil celuloză și 30 de părți - 60 de părți dintr-un film de acoperire din stratul exterior hidrolizat de keratină.

Cererea de brevet RO133338 A2 revendică un fertilizant pe bază de hidrolizat de keratină utilizat pentru nutriția plantelor de cereale, floarea soarelui sau rapiță și un procedeu de obținere al acestuia. Procedeu, conform invenției, constă în degresarea keratinei din lână de ovine și hidroliza alcalină cu 10% hidroxid de sodiu, timp de 4 h la 80°C, se ajustează pH la valoarea 8, când rezultă un hidrolizat de keratină cu masă moleculară medie 11000...25000 Da sau se continuă hidroliza enzimatic, la temperatura la 60°C cu 1% Alcalase 2,5 l sau 0,5% Protamex, timp de 3 h, când rezultă un hidrolizat de keratină cu masa moleculară medie 2000...6000 Da, iar hidrolizatele se filtrează și/sau concentrează prin evaporare și sunt compatibile cu hidrolizat de colagen, macronutrienți sau microelemente anorganice din formulările de fertilizanți.

Sunt cunoscute doar puține compozițiile în care se exploatează caracteristicile de biostimulant pentru plante ale keratinei / hidrolizatorilor de keratină. Cererea de brevet RO133240 (A2) se referă la o compoziție de biostimulant pentru plante care conține lână și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția conform invenției este constituită, în procente masice, din 36...38% lână, 40% paie de grâu, 9,75...11,7% vinasă concentrată, 0,9% acid lactic și, în rest, apă reziduală. Procedeu conform invenției constă în tocarea și uscarea paielor de grâu și a lânii până la o umiditate de maximum 10%, amestecarea acestora cu amestec de vinasă și acid lactic 80% la 45...60°C, timp de 4...6 h, urmată de granularea prin uscare a amestecului, la 90°C, timp de 2 h, și vid de 0,5 bari, și compactarea prin presare, rezultând pelete cu o densitate de minimum 750 kg/mc.

O astfel de compoziție nu este însă utilizabilă ca tratament al seminței pentru formarea de filme bioactive, ci doar pentru tratamentul în brazdă la momentul recoltării. Cererea de brevet EP3507262 A1 protejează un îngrășământ și/sau un ameliorator de sol, care are efect de stimulare a plantelor, și care se obține prin desfacerea matricei de lână prin utilizarea unui solvent eutectic pe bază de clorură de colină și uree. O astfel de compoziție ar putea fi studiată și pentru utilizarea ca tratament al seminței. Dezavantajul acestei compoziții este că utilizează solvenți eutectici naturali (NaDES) care s-au dovedit toxici. Deși sunt formați din componente naturale, (cito)toxicitatea NaDES este mai ridicată decât cea a componentelor (Hayyan et al. 2013. *Chemosphere*, 90, 2193-2195). NaDES formați din clorură de colină sau betaină, în combinație cu etilen-glicolul, acidul citric sau uree, în care au fost extrași polifenoli din boască de struguri, s-au dovedit a fi toxici pentru râme și a avea o toxicitate moderată pentru plante (Samori et al. 2019, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7, 15558-15567).

Comportamentul deosebit al solvenților eutectici este datorită faptului că structura lor stabilizată prin legături de hidrogen ionice se hidratează lent, cu menținerea unor nanostructuri de solvent eutectic (Posada et al. 2019. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 196-203). Aceste nanostructuri afectează stabilitatea sistemului celular de membrane pentru că modifică legăturile de hidrogen din apă, care stabilizează entropic interacțiile hidrofobe responsabile pentru menținerea straielor bilipidice membranare. Destabilizarea membranelor determină formarea de specii reactive de oxigen și azot stres nitrosativ / oxidativ (Weidinger & Kozlov 2015. *Biomolecules*, 5, 472-484), cu efecte fiziopatologice. Analiza structură – ecotoxicitate a dovedit că toxicitatea maximă este cea a amestecurilor NaDES care conțin acizi, că este intermediară pentru compușii care conțin amide (cum

este de exemplu ureea) și este redusă la NaDES care conțin alcooli și zaharuri - Halder, & Cordeiro 2019, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(12), 10649-10660.

Un alt dezavantaj al NaDES pe bază de clorură de colină și uree este dat de vâscozitatea ridicată a amestecului, care face ca procesul de extragere a keratinei să fie dificil, necesitând presiuni și/sau timpi de prelucrare mari.

Cererea de RO135022 A2 dezvăluie o compoziție de solvenți eutectici cu ecotoxicitate redusă pentru formularea produselor agrochimice. Compoziția, conform invenției este constituită din clorură de betaină sau clorură de colină, ca acceptori de legături de hidrogen și 2,3-butandiol racemic sau izomerul 2R, 3R, ca donori de legături de hidrogen, în rapoarte molare cuprinse între 1 mol acceptor de hidrogen la 1 până la 3 moli donori de hidrogen, de preferință 1, 1,5, 2, 2,5 și 3 M. Dezavantajul acestei compoziții este că are o capacitate redusă de solubilizare a proteinelor.

Nu au fost descrise până în prezent compoziții pe bază de keratină destinate explicit tratamentului la sămânță. O astfel de utilizare ar valorifica concomitent caracteristicile peliculizante ale keratinei, ca și pe cele de biostimulant de creștere și de reținere a apei.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție pe bază de keratină și solvenți eutectici, realizată prin desfacerea matricei de lână prin utilizarea unui solvent eutectic care nu prezintă ecotoxicitate, care are un efect sinergic cu keratina, și care are o capacitate ridicată de solubilizare. Este un al obiect al acestei invenții descrierea unui procedeu prin care să se obțină compoziția destinată tratamentului la sămânță.

Inventatorii au găsit că solventul eutectic format din clorură de colină, 2,3-butandiol izomer 2R, 3R și apă, în raportul molar 1:3:1 are o capacitate ridicată de solubilizare a keratinei din subprodusele keratinoase, ca de ex. lână sau pene.

Compoziția este alcătuită din 47,03- 51,96% keratină solubilă, 30,34%-33,46% 2,3 butandiol, 15,67%-17,28% clorură de colină, 2,02%- 2,23% apă și are o activitate de inducere a pompei de protoni pe plante de test de tomate de min. 175% față de martor.

Procedeul de obținere a compoziției conform invenției este constituit din următoarele etape.

- Obținerea solventului eutectic format din clorură de colină, 2,3-butandiol izomer 2R, 3R și apă, în raportul molar 1:3:1;
- Extracția keratinei din lână sau pene într-o moară cu bile, într-un raport de 1 parte material keratinic la 19 părți solvent eutectic, la 100 rpm, timp de 4 ore;

- Separarea fracției ne-extrase de cea extrasă prin filtrarea la presiune, la 0,6 MPa;
 - Recuperarea din filtrat a 94-95% din solventul eutectic prin ultrafiltrare timp de 2 ore, la o presiune de 2 bari și la 40°C, cu utilizarea unor membrane ceramice cu un prag de excludere de 5 kDa;
 - Recuperarea retentatului care conține proteine keratinice și solvent eutectic asociat acestora și utilizarea ca biostimulant pentru plante prin tratarea semințelor.
- Invenția prezintă următoarele avantaje.
- Utilizează un solvent eutectic care are o ecotoxicitate redusă față de micro- și macro-fauna din sol și care include componente cu efect biostimulant asupra plantelor, cum este de exemplu 2,3-butandiol (Fincheira & Quiroz, 2018, *Microbiological Research*, 208, 63-75).
 - Vâscozitatea solventului eutectic este semnificativ redusă față de alți reduși, pentru că include polioli și apă.
 - Extrage cantități semnificative de keratină, care-și menține capacitate ridicată de formare a filmelor polimerice cu capacitate ridicată de absorbție a apei.
 - Efectul biostimulant al keratinei este complementar celui exercitat de componentele solventului eutectic, ca de exemplu 2,3 butandiol.

În cele ce urmează sunt prezentate exemple de realizare a invenției, care o ilustrează fără a-i limita domeniul de aplicare.

Exemplul 1. Se iau circa 200 grame clorură de colină și 400 grame 2,3 butandiol, care se usucă la etuvă cu vid (ca de ex. VDL 23, Binder, Tuttlingen, Germania. Se cântăresc cu precizie 139,62 grame de clorură de colină (ChCl) uscată și 270,36 grame de 2,3 butanediol izomer 2R, 3R (2,3BD). Se adaugă cantitativ ChCl și 2,3BD într-un balon de sticlă de 1 litru, cu fund plant și 2 gături. În balon se introduce o bară agitator magnetic și i se atașează un refrigerent vertical (pentru a minimiza pierderile prin evaporare de 2,3 BD) și un termometru. Se adaugă peste amestec 18,01 grame de apă pură (tip I, produsă de ex. într-un sistem PQDIUVM1, Elga Veolia, Lab Water, High Wycombe, Marea Britanie). Prin adăugarea acestor cantități se realizează un raport molar ChCl – 2,3 BD – H₂O de molar de 1:3:1. Formarea DES are loc prin încălzirea amestecului. Pentru încălzire uniformă se folosește o baie de ulei. Se încălzește la temperatura de 40°C, cu agitare 600 rpm, timp de două ore. După încheierea reacției de formare a amestecului eutectic, se obține o soluție transparentă, incoloră, cu vâscozitate medie, perfect omogenă. Spectru FTIR relevă modificări la 3322 cm⁻¹, specifică vibrației de întindere a grupărilor -OH, ceea ce demonstrează formarea unor legături de hidrogen

cu intensitate crescută. Solventul eutectic rezultat, $\text{ChCl}:2,3\text{BD}:\text{H}_2\text{O}$ 1:3:1, este utilizat pentru a extrage keratina din lână. Într-o moară cu bile (de ex. Retch PM400, Verder Scientific, Haan, Germania), cu mortar de agat și bile de agat, se adaugă 20 grame de lână și 380 grame de solvenți eutectici. După 4 ore se separă materialul lignocelulozic recalcitrant de extractul în NaDES cu apă, prin filtrare pe un filtru cu presiune (RPF T01, BHS-Sonthofen, Sonthofen, Germania), la 0,6 MPa. Se recuperează filtratul.

Se recuperează din filtrat solventul eutectic prin ultrafiltrare pe membrane ceramice cu un prag de excludere de 5 kDa. Se folosește o instalație de ultrafiltrare cu membrane ceramice (ca de ex. Pall® Membralox® XLAB 5, Port Washington, NY, SUA), Instalația include un rezervor de alimentare termostatat la 40°C, o coloană pe care sunt fixate membranele de ultrafiltrare, o pompă de alimentare a coloanei de ultrafiltrare și rezervor de primire a permeatului. Din rezervorul de alimentare termostatat la 40°C, pompa preia soluția de keratină în solvent eutectic și o trece la o presiune de 2 bari prin coloana de ultrafiltrare. Membrana ceramică reține macromoleculele de keratină și lasă să treacă solventul eutectic. Retentatul este întors în bazinul de alimentare. Se operează instalația de ultrafiltrare timp de 2 ore. Se recuperează 361 grame de solvent eutectic. Se recuperează și cca 40 grame retentat întors în vasul de alimentare. În retentat se determină conținutul de proteină solubilă conform metodei Bradford (*Analytical Biochemistry*, 72, 248-254), conținutul de ChCl prin lichid-cromatografie de înaltă presiune (Hefni et al. 2015, *Food Analytical Methods*, 8, 2401-2408) și 2,3 BD prin gaz-cromatografie (Teunissen et al. 1989, *Journal of Microbiological Methods*, 10, 247-254). Apa se consideră a fi diferența. Compoziția rezultată este alcătuită din 17,28% clorură de colină, 33,46% 2,3 butandiol, 2,23% apă și 47,03 keratină solubilă.

Se realizează teste de toxicitate față de plantele terestre, *Sorghum saccharatum* (Sorg), *Lepidium sativum* (năsturel) și *Sinapis alba* (muștar), conform standardului ISO 18763. Se folosește kit-ul de testare TK62 de la MicroBioTest (Gent, Belgia). Nu se constată efecte fitotoxice după tratamentul la sămânță, ci efecte de stimulare a creșterii. Se testează toxicitatea față de râme, *Eisenia foetida*, conform ISO 11268-1:2012. Nu se constată efecte toxice față de râme.

Se determină efectul compoziției rezultate față de dinamica creșterii unor tulpini de microorganisme benefice din rizosferă, *Bacillus velezensis* FZB42 (DSM23117) și *Trichoderma atroviridae* P1 (ATTC 74058™), conform metodei recent descrise de testare a ecotoxicității solvenților eutectici (Torregrosa-Crespo et al. 2020, *Science of the Total*

Environment, 704, 135382). Nu se constată semnificative diferențe între variantele tratate cu până la 5% concentrație produs în mediu și varianta martor.

Se utilizează plantele test de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv. Micro Tom) și se determină la plantele inducerea pompei de protoni (Zandonadi et al., 2016, *Scientia Agricola* 73, 24-28), activitate specifică biostimulanților pe bază de hidrolizate proteice. Compoziția rezultată are o activitate medie de stimulare a pompei de protoni de 175,38% față de martor.

Exemplul 2. Se lucrează ca în exemplul 1, cu singura diferență că se folosesc pene de pui de găină și nu lână. Compoziția care rezultă în final este alcătuită din 15,67% clorură de colină, 30,34% 2,3 butandiol, 2,02% apă și 51,96% keratină, Compoziția testată nu este fitoxică, ci biostimulantă, pentru plantele terestre, *Sorghum saccharatum* (Sorg), *Lepidium sativum* (năsturel) și *Sinapis alba* (muștar), conform standardului ISO 18763. Compoziția nu este toxică față de râme, *Eisenia foetida*, conform ISO 11268-1:2012 și nu are efecte de inhibare a dinamicii creșterii unor tulpini de microorganisme benefice din rizosferă, *Bacillus velezensis* FZB42 (DSM23117) și *Trichoderma atroviridae* P1 (ATTC 74058™). La această compoziție se determină o activitate de inducere a pompei de protoni pe plante de test de tomate de 179,23% față de martor.

Revendicări

1. Compoziție de biostimulant pentru plante **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 47,03- 51,96% keratină solubilă, 30,34%-33,46% 2,3 butandiol, 15,67%-17,28% clorură de colină, 2,02%- 2,23% apă și și are o activitate de inducere a pompei de protoni pe plante de test de tomate de min. 175% față de martor.
2. Procedeu de obținere a compoziției conform invenției **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele etape: obținerea solventului eutectic format din clorură de colină, 2,3-butandiol izomer 2R, 3R și apă, în raportul molar 1:3:1; extracția keratinei din lână sau pene într-o moară cu bile, într-un raport de 1 parte material keratinic la 19 părți solvent eutectic, la 100 rpm, timp de 4 ore; separarea fracției ne-extrase de cea extrasă prin filtrarea la presiune, la 0,6 MPa; recuperarea din filtrat a 94-95% din solventul eutectic prin ultrafiltrare timp de 2 ore, la o presiune de 2 bari și la 40°C, cu utilizarea unor membrane ceramice cu un prag de excludere de 5 kDa; recuperarea retentatului care conține proteine keratinice și solvent eutectic asociat acestora și utilizarea ca biostimulant pentru plante prin tratarea semințelor.