



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00806

(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;
• AGSIRA S.R.L.,
STR. NICOLAE BĂLCESCU NR. 54, HALA
NR. 2 SAT ISALNIȚA, COMUNA ISALNIȚA,
DJ, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NEGRILĂ RADIAN NICOLAE,
STR.AMARADIA NR.81, AP.4, CRAIOVA,
DJ, RO;
• CONSTANTINESCU- ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU NR.297, BL.15A, SC.A,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• TRITEAN NAOMI, STR.PERFEȚIONĂRII,
NR.11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) BIOSTIMULANT PENTRU PLANTE PE BAZĂ DE DROJDIE
DE BERE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTUIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de biostimulant pentru plante pentru aplicare foliară și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția, conform invenției, este constituită din 38,2...41,4% hidrolizat de proteine, 44,8...47,3% oligozaharide, 4,5% poloxamer, 3,4...3,7% compuși anorganici totali, 0,3...0,4% polifenoli totali și în rest, apă reziduală. Procedeu, conform invenției, cuprinde etapele: normalizare la o concentrație de 16% substanță uscată a drojdiei de bere epuizată de la fabricarea berii, hidroliza pereților celulari cu un amestec de enzime care conține endo- și exo(1,3)-β-D-glu-canaze și endo-chitinază, adăugarea de tribloc

co-polimer cu structură amfilă, lizarea celulară, hidroliza enzimatică prin tratarea cu endo- și exo-proteaze microbiene și uscarea prin pulverizare a amestecului, rezultând o compoziție de biostimulant care prezintă o activitate de inducere a pompei de protoni pe plante de test de tomate de min 175% față de martor și de inducere a polifenoxidazei pe plante de test de *Arabidopsis thaliana* de min. 140% față de martor.

Revendicări: 2



BIOSTIMULANT PENTRU PLANTE PE BAZĂ DE DROJDIE DE BERE ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE A ACESTUIA

Prezenta invenție se referă la o compoziție pe bază de drojdie recuperată de la fabricarea berii, destinată aplicării foliare ca biostimulant pentru plantele cultivate, ca și la un procedeu de obținere a respectivei compoziții. Invenția este destinată aplicării în industria (bio)produselor destinate nutriției, protecției și/sau biostimulării culturilor agricole / horticole.

Sunt cunoscute diferite compoziții pe bază de drojdie-de-bera, și/sau procedee de obținere a acestora și/sau procedee de utilizare a acestora, pentru nutriția, protecția sau biostimularea culturilor de câmp sau a culturilor horticole. Compozițiile destinate nutriției plantelor cultivate furnizează plantelor nutrienți, respectiv elemente care au următoarele caracteristici definitorii: (i) carența / lipsa unui element / nutrient face imposibilă pentru plante realizarea unui ciclu complet de viață; (ii) simptomele carenței sunt specifice pentru fiecare element / nutrient; (iii) elementul este implicat în nutriția plantelor, făcând parte din situs-ul activ al unor enzime și/sau din compoziția unui metabolit esențial (Mengel et al 2001, *Plant nutrients*, în *Principles of Plant Nutrition*, pp. 1-13, Springer, Dordrecht). Compozițiile pentru protecția plantelor protejează plantelor de cultură prin limitarea pagubelor produse de agenții de dăunare (artropode, agenți fitopatogeni, buruieni) și includ pesticide, substanțe cu o toxicitate (relativ) selectivă pentru acești agenți de dăunare (Enserink et al 2013, *Science*, 341, 729-765) și elicitori, activatori ai sistemului de apărare din plante (Jamiołkowska, A. 2020, *Agronomy*, 10, 173). Biostimulanții pentru plante măresc eficiența preluării și utilizării nutrienților, cresc toleranța plantelor față de agenții biotici și abiotici și îmbunătățesc calitatea recoltei. (Du Jardin, 2015, *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14).

Brevetul ES2329750 B1 descrie un procedeu pentru obținerea unui produs fertilizant din drojdia rezultată de la producerea berii, caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: (a) supunerea drojdiei reziduale la tratament alcalin la un pH de 10,5-13, urmată de filtrare pentru a obține o soluție proteică (b) supunerea soluției proteice obținute în etapa (a) unui tratament acid la un pH de 2,5-4,5, urmată de filtrare pentru a obține un concentrat proteic și (c) supunerea concentratului proteic obținut în etapa (b) hidrolizei, pentru a obține un produs fertilizant. Această procedură permite obținerea mai multor produse fertilizante care pot fi utilizate în tratamente agricole, precum și utilizarea acestor deșeuri industriale care altfel ar putea cauza probleme de

mediu, datorită încărcăturii lor biologice ridicate. Hidroxidul folosit este hidroxid de potasiu, iar acidul folosit este acid fosforic. Rezultă în final un fertilizant care include toate cele trei macroelemente necesare plantelor. Invenția are dezavantajul că nu valorifică pereții celulari de drojdie, soluția proteică fiind cea care este hidrolizată pentru obținerea fertilizantului. Cererea de brevet WO2006049201A1 prezintă un digestat de pereți celulari care este aplicat pentru inducerea sistemului de apărare din plante. Această invenție nu valorifică drojdia de bere în întregime, ci numai pereții celulari.

Brevetul FR2894771 B1 revendică utilizarea unei compoziții pe bază de pereți celulari de drojdie pentru combaterea bolilor foliare ale plantelor de cultură. Această compoziție, pusă pe piață sub denumirea de cerevisane, s-a dovedit a avea un efect de inducere a genelor care codifică pentru: (i) enzime implicate în metabolismul hormonilor plantelor (de exemplu, acid salicilic, jasmonat și etilenă) și răspunsurile fiziologice conexe din celulele vegetale; (ii) compuși de apărare (adică protein PR / asociate patogenzei, respectiv fenilalaniamoniac-liază, stilbensintază, lipoxigenază, kinaze proteice pentru receptorii cu conținut ridicat de leucină, superoxid dismutaze și glutatión S-transferaze implicate în răspunsul la stresul oxidativ, etc.), (iii) metaboliți secundari (adică polifenoli, terpenoide, lignină) și (iv) procese fotosintetice (proteine de legare a clorofilei a/b și componente ale fotosistemelor). (De Miccolis Angelini, et al. 2019, *Pest Management Science*, 75, 2020-2033). Aceste efecte sunt specifice elicitorilor răspunsului de apărare din plante și sunt datorate combinației de chitină și β -glucan din peretele celular al drojdiilor (Li, 2020, *Langmuir*, 36, 6169-6177). Nici această invenție nu valorifică biomasa de drojdie în întregime, ci doar pereții celulari.

Oligomerii de chitină și de β -glucan care se formează din pereții celulari de drojdie sunt recunoscuți de receptorii din plante ca elicitori din categoria tipare moleculare asociate prezenței microorganismelor (patogene) – MAMPs / PAMPs (Guarnizo et al. 2020, *Molecules*, 25, 5972; Newman et al., 2013, *Frontiers in Plant Science*, 4, 139; Zipfel & Robatzek 2010, *Plant Physiology*, 154, 551-554).

Cererea de brevet US2019322599A1 protejează aplicarea unei compoziții sinergice de drojdie inactivă și/sau derivați de drojdie și cel puțin o sursă de azot. Brevetul EP2752399 B1 se referă la un procedeu obținere a unui extract enzimatic din drojdie-de-bere epuizată de la fabricarea berii, care se realizează printr-o succesiune de reacții într-un singur reactor și care cuprinde etapele de: (a) adăugarea la drojdia-de-bere sub formă de suspensie a unei baze concentrate pentru ajustarea pH-ul acestuia; (b) supunerea amestecului obținut în etapa (a) la o presiuni și temperaturi ridicate; și (c)

supunerea amestecului obținut în etapa (b) la o hidroliză enzimatică pentru a obține un extract de enzimatic. Prin aceste invenții se valorifică și pereții celulari de drojdie și proteinele din drojdie și se obține un amestec care are caracteristici de biostimulant pentru plante, datorită combinației de pereți celulari de drojdie și hidrolizat proteic de drojdie. Pereții celulari de drojdie sunt elicitori. Hidrolizatele proteice acționează ca ingrediente active pentru biostimulanți întrucât modulează fiziologia plantelor și microbiomul benefic (Colla et al. 2017, *Frontiers in Plant Science*, 8, 2202).

Deși majoritatea compozițiilor sunt destinate aplicării foliare, nu sunt descrise soluții pentru rezolvarea problemei aplicării unor ingrediente hidrofile pe o suprafață hidrofobă, ca și a preluării componentelor active hidrofile de prin barierele de permeabilitate hidrofobe. Principala problemă tehnică a biostimulanților pentru plante / produselor agrochimice pe bază de drojdie (care sunt hidrofile) aplicați foliari (pe o suprafață hidrofobă) este asigurarea concomitentă a unei umectări optime a frunzelor și a unui transport facilitat prin barierele de permeabilitate hidrofob-hidrofile.

Cererea de brevet RO133977 A2 oferă o soluție tehnică la această problemă a penetrabilității foliare. Procedul conform invenției constă în etapele de plasmoliză a unui concentrat de drojdie, separarea prin centrifugare a pereților celulari de drojdie de proteine de drojdie prin centrifugare, prepararea de agenți de emulsionare și a unui gel plasteinic care conține microelemente chelatare, prepararea unui concentrat de betaină din melasă și vinasă, amestecarea acestuia cu o soluție de fertilizant foliar NPK, ultrasonarea și microemulsionarea soluției de plasteină-betaină-fertilizant foliar într-un solvent hidrofob, prin utilizarea ca emulsionant a 2,5% din amestecul final de agenți de emulsionare din pereții celulari de drojdie și a lecitinei co-surfactant. Dezavantajul procedurii conform invenției de mai sus este că include prea multe etape și că utilizează un gel plasteinic care are tendința de separare din compoziție la diluarea cu apă dură standard. Compozițiile care sunt aplicate foliar necesită o foarte bună stabilitate la diluare cu apă dură. Aplicarea lor se face în timp îndelungat, iar separarea fazelor modifică total dozele aplicate în diferite zone ale aceleași parcele. Întrucât diluarea se face în câmp, de obicei cu apă dură (apă de fântână), produsele trebuind să fie stabile la diluarea cu apă dură – Castro et al. 2014, *Environmental Chemistry Letters*, 12, 85-95. Gelul plasteinic rezultat din plasteinizarea proteinelor interacționează cu ionii de calciu și magneziu din apa dură, datorită conținutului ridicat de resturi de glutamil și aspartil, aminoacizi acizi, și precipită / se separă de restul componentelor. Funcționarea gelului plasteinic ca surfactant nu se mai realizează în apă dură.

De asemenea, în cererea de brevet RO133977 A2, ca și în alte documente relevante pentru stadiul cunoașterii actuale, nu sunt descrise compoziții și/sau procedee care să valorifice pentru obținerea de biostimulanți pentru plante polifenolii (inclusiv pe cei terpenoidici, rezultați din hamei), care se regăsesc în drojdia de bere, compuși care au o activitate biologică ridicată (León-González et al 2018, *Food Chemistry*, 267, 246-254; Zhang et al 2021, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 4343–4356). În general, procedeele descrise elimină polifenolii, compuși cu masă moleculară mică, în cadrul diferitelor etape de separare și/sau hidroliză alcalină.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție pe bază de drojdie epuizată de la fabricarea berii, în care să se regăsească toate componentele bioactive existente în drojdie, inclusiv polifenolii, și care să aibă o bună penetrabilitate foliară și o bună compatibilitate cu apa dură standard. Este un alt obiect al acestei invenții realizarea unui procedeu cu un număr redus de etape prin care să se obțină compoziția conform invenției.

Biostimulantul pentru plante este alcătuit din următoarele componente: hidrolizat de proteine 38,2 – 41,4%, oligozaharide 44,8 – 47,3%, poloxamer 4,5%, compuși anorganici totali 3,4 – 3,7%, polifenoli totali 0,3 - 0,4 %, apă reziduală până la 100% și are o activitate de inducere a pompei de protoni pe plante de test de tomate de min. 175% față de martor și de inducere a polifenoloxidazei pe plante test de *Arabidopsis thaliana* de min. 140% față de martor.

Procedeu de obținere a compoziției de biostimulant pentru plante mai sus este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Normalizarea la o concentrație de 16% substanță uscată a drojdiei de bere epuizată de la fabricarea berii, aducerea pH la valoarea 5,5 unități pH și tratarea cu un amestec de enzime care conține endo- și exo (1,3)-beta-D-glucozidaze și endo-chitinază, în raport de 150-200 unități beta-glucozidaze și 640-800 unități endo-chitinază la 1 kg de drojdie substanță uscată, timp de 8 ore la temperatura de 50°C;
- ✓ Adăugarea de tribloc co-polimer cu structură amfifilă, care are masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22, în proporție de 0,8% și lizarea celulară prin omogenizare la înaltă presiune, 5 treceri la 750 - 1200 bari;
- ✓ Aducerea pH la valoarea 7.0 și hidroliza enzimatică prin tratare cu endo- și exo-proteaze microbiene, în raport de 12 unități Anson endo-proteaze și de 2500 unități leucin amino-peptidazice la 1 kg de drojdie, la temperatura de 65°C, timp de 12 ore;

✓ Inactivarea proteazelor prin încălzirea hidrolizatului la 90-95°C, timp de 10 min, urmată de răcire la 60°C, ajustarea pH-ului la valoarea 7,0 cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric și uscarea prin pulverizare la o temperatură de intrare de 140°C și o temperatură de ieșire de 85-90°C.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Valorifică în întregime drojdia de bere reziduală de la fabricarea berii, convertind principalele componente în ingrediente active ale biostimulanților pentru plante, oligozaharide cu rol de elicitori din categoria MAMPs / PAMPs și hidrolizate proteice;
- Recuperează și protejează polifenoli prin includerea în micelle de tribloc co-polimer cu structură amfifilă, care funcționează ulterior și pentru eliberarea lor controlată;
- Are o bună penetrabilitate foliară datorită acțiunii surfactante combinate a oligomanopeptidelor și tribloc co-polimer cu structură amfifilă;
- Compoziția rezultată este compatibilă cu apa dură standard pentru că tribloc co-polimerul cu structură amfifilă, principalul component surfactant, nu reacționează cu ionii de calciu și magneziu, fiind o moleculă neionică;
- Procedul de obținere a compoziției conform invenției are un număr redus de etape.

În continuare se prezintă exemple de realizare a invenției care o ilustrează fără însă a-i limita domeniul de aplicare.

Exemplu 1. Într-un vas de reacție de inox de 150 litri, prevăzut cu agitare, capac și manta de termostatare se aduc 100 litri suspensie de drojdie epuizată de la fabricarea berii, de tip lager (*Saccharomyces pastorianus*), a cărei concentrație a fost normalizată la 16% substanță uscată (prin utilizarea unui refractometru digital de laborator RX- 5000, Atago, Yushima, Japonia). Se aduce pH-ul la valoarea 5,5 unități pH prin adăugare de acid clorhidric 1 N.

Suspensia de drojdie se tratează cu un amestec de enzime care conține endo- și exo (1,3)-beta-D-glucanaze și endo-chitinază, în raport de 150 unități beta-glucanazice și 640 unități endo-chitinază la 1 kg de drojdie substanță uscată, timp de 8 ore la temperatura de 50°C. Un exemplu de amestec de enzime comerciale care se poate folosi este Vinotaste Pro (Novozyme, Bagsværd, Danemarca), care este un amestec complex de enzime litice, produs de tulpini selectate de *Trichoderma harzianum* și *Aspergillus niger*, și care are o activitate exo-β-(1,3)-glucanazică (EC3.2.1.56) și endo-β-(1,3)-glucanazică (EC 3.2.1.6) de 75 unități glucanazice (BGUX) per gram și de 320 unități endo-chitinazice per gram. Acest amestec se aplică în cantitate de 2 grame la fiecare kg

de substanță uscată - în acest caz 32 grame de enzime. O unitate glucanazică BGUX este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru a produce 1 μmol de glucoză pe minute dintr-o soluție care conține 2,5 g/l laminarină, la pH 5,5 și la temperatura de 45°C. O unitate endo-chitinazică este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea a 1 μmol de *p*-nitrofenol pe minut din *p*-nitrofenil- β -tri-acetil-chito-trioza (2,5 mM) în tampon MES (100 mM), pH 6,2 la 40°C. Se poate folosi orice fel de amestec similar, cu aceleași caracteristici, de astfel de enzime dezvoltate inițial pentru maturarea vinului (Uzuner & Cekmecelioglu 2019, în *Enzymes in Food Biotechnology*, pp. 29-43, Elsevier).

Peste suspensia de drojdii al căror perete a fost semnificativ fragilizat prin tratamentul enzimatic cu β -glucanaze și chitinaze, se adaugă 0,8064 kg poloxamer 407, un Poloxamer 407, un tribloc co-polimer cu structură amfifilă, care are masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-lipofilă (HLB) de 22 (ceea ce corespunde unei proporții de 0,8%). Formula chimică a Poloxamerului 407 este $\text{HO}[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}]_x [\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{O}]_y [\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}]_x \text{OH}$, în care y este mai mare de 14. Poloxamer 407 este un compus recunoscut de Farmacopeea Europeană ca fiind netoxic și este disponibil comercial sub denumirile de mărci înregistrate de Pluronic F127® (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Germania) și Synperonic F127® (ICI, Wilton, Marea Britanie). Se lizează drojdiile din amestecul rezultat cu ajutorul unui omogenizator cu pistoane, ca de ex. Pony 2006 Lab Homogenizer (Gea, Düsseldorf, Germania), realizându-se 5 treceri la 750 bari. Numărul de treceri și presiunea au fost stabilite pe baza unor experimente de optimizare prin metoda suprafețelor de răspuns, pentru a se obține o bună liză celulară, concomitent cu omogenizarea polifenolilor din drojdie în interiorul micelilor de Poloxamer 407.

Lizatul celular se aduce într-un vas de reacție de inox de 150 litri, prevăzut cu agitare, capac și manta de termostatare, se corectează pH-ul la valoarea 7.0 și se hidrolizează enzimatic proteinele prin tratare cu endo- și exo-proteaze microbiene, în raport de 18 unități Anson endo-proteaze și de 2500 unități leucin amino-peptidazice la 1 kg de drojdie, la temperatura de 65°C, timp de 12 ore. Exemple de proteaze comerciale care se pot folosi sunt Alcalase® AF 2,4 L și Flavourzyme 1000 L (Novozymes, Bagsværd). Alcalase este o serin endo-peptidază de tip subtilizina A, produsă de *Bacillus licheniformis* (Tacias-Pascacio et al. 2020, *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143-2196). Endo-proteaza care se utilizează are o activitate de 2,4 unități Anson per gram. O unitate Anson este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care eliberează 1,0 μmol L-tirozină din hemoglobină pe minut la 25°C, pH 7,5. Se adaugă

5 grame de enzimă la fiecare kg de drojdie – în acest caz 80 grame preparat enzimatic. Un alt amestec de enzime care se folosește este Flavourzyme® (Novozymes, Bagsværd), un amestec de peptidaze, aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-peptidaze produs de *Aspergillus oryzae* (Merz et al. 2015, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 23, 5682–5693). Activitatea amestecului enzimatic folosit este de 1000 unități leucin amino-peptidazice (LAPU) per gram. O LAPU este acea cantitate de enzimă care hidrolizează 1 μmol de L-leucină-p-nitroanilidă pe minut. Se adaugă 2,5 grame enzime la 1 kg de drojdie pentru a atinge doza de 2500 LAPU per kg drojdie – în acest caz 40 grame enzime. Orice fel de amestec de enzime cu aceleași caracteristici se poate folosi.

După trecerea celor 12 ore se inactivează enzimele prin încălzirea extractului la 90-95°C, timp de 10 min, urmată de răcire la 60°C și ajustarea pH-ului la valoarea 7,0 cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric. Amestecul complex rezultat după neutralizare se usucă prin pulverizare la o temperatură de intrare de 140°C și o temperatură de ieșire de 85-90°C, folosind un uscător prin pulverizare de laborator (de ex. Niro Mobile Minor® Spray-Dryer, GEA Group, Düsseldorf, Germany).

În produsul rezultat se determină: peptidele solubile totale cu metoda biuret (Liu et al. 2017, *Food Chemistry*, 224, 289-293); polizaharidele și oligozaharidele totale prin metode colorimetrice cu antronă și fenol-acid sulfuric, folosind etaloane de glucoză și manoză (Dallies, 1998. *Yeast*, 14, 1297-1306); cenușa totală, gravimetric, după calcinare la 850°C, conform SR EN ISO 2171:2010; Poloxamer 407, cromatografic, conform metodei descrise în monografia USP29-NF24; polifenolii totali cu reactiv Folin-Ciocalteu, folosind acidul galic ca etalon (Sánchez-Rangel et al. 2013, *Analytical Methods*, 5, 5990-5999). Biostimulantul pentru plante rezultat din aplicarea procedurii conform exemplului de mai sus este alcătuit din hidrolizat proteic 38,2; oligozaharide 47,3%; poloxamer 4,5%; compuși anorganici totali 3,7%; polifenoli totali 0,3%, apă reziduală până la 100%.

Se utilizează plantele test de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv. Micro Tom) și se determină la plantule 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 175,45% față de martor. Produsul se aplică prin stropire pe plante test de *Arabidopsis thaliana Col0* și se determină inducerea polifenoloxidazei (Xue et al. 2017, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-10). Se determină o activitate a polifenoloxidazei la plantele tratate care este 148,7% din cea a plantelor martor, netratate.

Exemplu 2. Se lucrează la fel ca în exemplu 1, cu următoarele diferențe. Drojdia epuizată de la fabricarea berii care se folosește este drojdie de tip ale, *S. cerevisiae*. Biostimulantul pentru plante rezultat din aplicarea procedurii conform exemplului de mai sus este alcătuit din hidrolizat proteic 41,4%; oligozaharide 44,8%; poloxamer 4,5%; compuși anorganici totali 3,4%; polifenoli totali 0,4%, apă reziduală până la 100%.

Se utilizează plantele test de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv. Micro Tom) și se determină la plantule 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 183,54% față de martor. Produsul se aplică prin stropire pe plante test de *Arabidopsis thaliana* Col0 și se determină inducerea polifenoloxidazei (Xue et al. 2017, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-10). Se determină o activitate a polifenoloxidazei la plantele tratate care este 140,2% din cea a plantelor martor, netratate.

Revendicări

1. Compoziție de biostimulant pentru plante conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele componente: hidrolizat de proteine proteic 38,2 – 41,4%, oligozaharide 44,8 – 47,3%, poloxamer 4,5%, compuși anorganici totali 3,4 – 3,7%, polifenoli totali 0,3 - 0,4 %, apă reziduală până la 100% și are o activitate de inducere a pompei de protoni pe plante de test de tomate de min. 175% față de martor și de inducere a polifenoloxidazei pe plante test de *Arabidopsis thaliana* de min. 140% față de martor.

2. Procedeu de obținere a compoziției conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: normalizarea la o concentrație de 16% substanță uscată a drojdiei de bere epuizată de la fabricarea berii, aducerea pH la valoarea 5,5 unități pH și tratarea cu un amestec de enzime care conține endo- și exo (1,3)-beta-D-glucanaze și endo-chitinază, în raport de 150-200 unități beta-glucanazice și 640-800 unități endo-chitinază la 1 kg de drojdie substanță uscată, timp de 8 ore la temperatura de 50°C; adăugarea de tribloc co-polimer cu structură amfifilă, care are masa moleculară de 12,600 daltoni și o balanță hidrofil-liofilă (HLB) de 22, în proporție de 0,8% și lizarea celulară prin omogenizare la înaltă presiune, 5 treceri la 750 - 1200 bari; aducerea pH la valoarea 7.0 și hidroliza enzimatică prin tratare cu endo- și exo-proteaze microbiene, în raport de 12 unități Anson endo-proteaze și de 2500 unități leucin amino-peptidazice la 1 kg de drojdie, la temperatura de 65°C, timp de 12 ore; inactivarea proteazelor prin încălzirea hidrolizatului la 90-95°C, timp de 10 min, urmată de răcire la 60°C, ajustarea pH-ului la valoarea 7,0 cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric și uscarea prin pulverizare la o temperatură de intrare de 140°C și o temperatură de ieșire de 85-90°C.