



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2023 00633**

(22) Data de depozit: **31/10/2023**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2024 BOPI nr. **3/2024**

(71) Solicitant:

- **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE TEXTILE ȘI PIELĂRIE-SUCURSALA INSTITUTUL DE CERCETARE PIELĂRIE-ÎNCĂLȚĂMINTE, STR. ION MINULESCU NR.93, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ DIN BUCUREȘTI - USAMVB, BD.MĂRĂȘTI, NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **MARCOSER S.R.L., STR.PRINCIPALĂ, NR.1A1, COMUNA MATCA, GL, RO**

(72) Inventatori:

- **STANCA MARIA, STR. SERG. MAJ. CARA ANGHEL, NR.9, BL.C56, SC.2, ET.7, AP. 99, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **GAIDAU CARMEN, STR.ALEXANDRU PAPIU ILARIAN NR.6, BL.42, SC.2, ET.6, AP.53, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **NICULESCU MIHAELA-DOINA, ALEEA BARAJUL CUCUTENI NR.8, BL.M 7 A, SC.2, ET.1, AP.25, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ALEXE COSMIN-ANDREI, STR. DEZROBIRII NR.18-38, BL.33, SC.4, AP.148, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

- **JURCOANE ȘTEFANA, STR. BODEȘTI NR.5, BL.K8, SC.A, ET.5, AP.24, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **BĂLAN DANIELA, STR. TUTUNARI NR. 4, BL. 90A, SC. 2, AP. 58, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **LUȚĂ GABRIELA, STR. HRISOVULUI NR. 30, BL. 5, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **ISRAEL- ROMING FLORENTINA, STR. HAGI GHIȚĂ NR. 77, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CORNEA PETRUȚA CALINA, STR.BRAȘOV, NR.25L, BL.A1, AP.53, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **JERCA IONUȚ OVIDIU, STR. ESTACADEI, NR.4, BL.N25, SC.2, ET.3, AP.27, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **CRISTEA STELICĂ, INTRAREA BISERICA ALBĂ, NR.3, ET.5, AP.9, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
- **PETRACHE ADELINA, STR. PRINCIPALĂ, NR.1A1, COMUNA MATCA, GL, RO;**
- **MIHALCEA ANTOANETA, STR.ROȘIORI, NR.21, TECUCI, GL, RO;**
- **MARIN GEORGIANA- VIOLETA, STR. MILCOV, NR.90, COMUNA MATCA, GL, RO**

(54) BIOSTIMULATORI PE BAZĂ DE GELATINĂ PENTRU TRATAREA PLANTELOR ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor biostimulatori pe bază de gelatină cu sau fără hidrolizat de collagen aditivat cu macro, mezo și/sau microelemente utilizate pentru stimularea plantelor de tomate. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: extragere a gelatinei din piele de bovină decalcificată, prin încălzire la temperatura de 75...95°C, decantare și uscare la etuvă până la un conținut de proteină de 90...95%, eventual, aditivare cu hidrolizat de collagen, 20...40% masic raportat la substanța uscată (s.u.) a bio-

stimulatorului, precum și 5...25% macro elemente (P și K) și mezo elemente (Ca și Mg), respectiv, amestec de mezo elemente și complex de microelemente (Cu, Zn, Mo, B) chelatare cu EDTA, rezultând biostimulatori pe bază de gelatină având un conținut de 14,17...23,60% s.u., 1,93...2,81% azot total, 10,88...15,8% proteină și 6,77...7,5 unități pH, sub formă de gel sau ca produs diluat pentru aplicare foliară sau radiculară.

Revendicări: 4

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).



BIOSTIMULATORI PE BAZA DE GELATINA PENTRU TRATAREA PLANTELOR SI PROCEDEU DE OBTINERE

Inventia se refera la obtinerea unor produse pe baza de gelatina cu sau fara hidrolizat de collagen obtinute din deseuri necromate de piele bovina din tabacarie aditivate cu macro, mezo si microelemente, care pot fi utilizate pentru biostimularea plantelor de tomate sau a altor plante, in etapa de inflorire, in scopul diminuarii consumului de fertilizanti de sinteza si a cresterii calitatii fructelor.

Problema pe care o rezolva prezentul brevet de inventie este realizarea unor geluri biostimulatoare pe baza de gelatina cu sau fara hidrolizat de collagen aditivate cu macro si mezo si/sau microelemente, cu efecte de biostimulare a infloririi plantelor de tomate si crestere a rezistentei plantelor la factorii de stres abiotici si biotici (fungi, etc) ce permit reducerea cantitatii de pesticide folosite in tratamentele clasice. Utilizarea produsulelor prezentate in brevet reprezinta un mod eficient de utilizare a subproduselor industriei de pielarie si de reducere a poluarii generata de utilizarea fertilizantilor de sinteza in agricultura.

Este cunoscut efectul deficientei de potasiu in nutritia tomatelor, asociat cu un numar mai mic de inflorescente, si de asemenea cu randament mai mic de productie [1]. Fertilizarea cu potasiu este importanta pentru a mentine concentratii adecvate de potasiu in planta, astfel incat sa creasca rezistenta culturilor la factorii abiotici de stres si randamentul de productie, precum si eficientizarea consumului de apa. Datorita rolului sau esential in reglarea conductantei stomatice, K poate minimiza cantitatea de apa care se pierde prin transpiratie. Cresterea concentratiei de potasiu in celulele de garda conduce la cresterea turgescentei, deschizand astfel stomatele, iar cu excluderea K din celulele de garda are loc inchiderea stomatelor [2]. In plus, fluxul de potasiu in celulele de garda, in reactiile ciclului Calvin, conduce la deschiderea stomatelor favorizand absorbtia dioxidului de carbon in frunze, ceea ce conduce la o mai buna asimilare a carbonului si, prin urmare, la cresterea randamentului de productie [3]. Una dintre functiile esentiale ale potasiului este depozitarea carbohidratilor in floem si transportul acestora catre organele plantei [4]. O concentratie crescuta de potasiu in frunzele plantelor de tomate a condus la obtinerea de fructe de calitate superioara si continut mai mare de vitamina C [5].

Deficienta de calciu favorizeaza modificari anatomice cum ar fi supradevoltarea floemului si ingrosarea tesutului mezofilic al frunzelor, leziuni in regiunea corticala a tulpinii primare cu pereti celulari hipertrofiati sau prabusiti si radacini laterale mai mici in raport cu radacina laterala primara. Aceste deficiente anatomice provocate de deficienta de calciu sunt mai

evidente in etapa de fructificare [6]. Transferul scazut a ionilor de Ca de-a lungul cailor de semnalizare in cazurile cronice de deficiente de calciu conduce la ofilirea uniforma a plantelor. Micronutrienii precum Fe si Mn au, de asemenea, un rol esential in dezvoltarea armonioasa a plantelor de tomate, deficiente in aceste elemente conduce la aparitia clorozei. Deoarece in cazul deficientei de Fe, acestea prezinta un transfer scazut al ionilor, cele mai afectate sunt frunzele tinere [7].

Din EP 2 735 232 A1, este cunoscut un biostimulant care conține 79,3 până la 83,4% hidrolizat proteic extras din alge și 2,0 pana la 2,1% betaina. Utilizarea acestui biostimulant a condus la o slaba imbunatatire a stresului provocat de seceta pentru plantele tratate comparativ cu martorul. Prin urmare in EP 2 735 232 A1, a fost adaugat seleniu la amestecul de biostimulant. Acest adaos de seleniu poate duce la o imbunatatire a raspunsului plantelor la stresul provoca de seceta si in special la cresterea randamentului de productie.

Cu toate acestea, utilizarea seleniului are o serie de dezavantaje. Desi seleniul este un oligoelement esential pentru oameni in cantitat mici, este toxic atunci cand este luat în exces. Acest lucru este problematic, deoarece s-a aratat ca prin tratamentul plantelor cu compozitia propusa in EP 2 735 232 A1, conținutul de seleniu din partea comestibila a plantelor tratate creste semnificativ. De asemenea, concentratii mari de seleniu sunt toxice si pentru albine sau alte insecte [8].

Este cunoscuta din brevetul RO135692A2 o compozitie de biostimulant pentru plante obtinuta din subproduse de peste . Procedul de obtinere consta in extractia peptidelor bioactive din subproduse de peste, prin tratamente de decalcifiere si delipidizare a tesutului, urmata de hidroliza enzimatica cu una sau două enzime succesiv si hidroliza gruparilor glutaminice, , urmata de ultrafiltrare si uscare prin atomizare. Compozitia de peptide are un continut de proteine din peste 85%, 2% lipide, 1,5% cenusa si o masa moleculara de 3000 D. Procedul de obtinere este anevoios cu multe etape de lucru, si cu costuri economice ridicate [9].

Brevetul CA 3107751A1 descrie procedeul de obtinere a unor biostimulatori lichizi sau solizi utilizati pentru plante sau sol, obtinuti din gunoi de grajd. Procesele includ transportul de oxigen pur sau aer imbogatit cu oxigen la o fractiune lichida de gunoi de grajd si supunerea fractiunii lichide la o bioreactie aeroba termofila autoterma. De asemenea brevetul prezinta compozitii nutritionale care pot fi utilizate in agricultura conventionala pentru a augmenta eficienta ingrsamintelor de sinteza sau pentru a fi utilizate in agricultura ecologica [10].

Brevetul US2022/032529 A1 prezinta o compozitie de biostimulant care contine aminoacizi si oligopeptide derivate din leguminoase obtinuti prin hidroliza enzimatica cu adaos de microelemente. Utilizarea acestui biostimulator poate reduce impactul negativ generat de

factorii biotici si abiotici si poate corecta deficienta de micronutrienti. Acest biostimulator are dezavantajul ca materia prima utilizata pentru obtinerea lui este greu accesibila iar tehnologia de procesare este scumpa [11].

Procedeul de realizare a biostimulatorilor pe baza de gelatina prezinta urmatoarele avantaje:

- Utilizeaza ca materie prima, subproduse ale industriei de pielarie
- Nu utilizeaza solventi organici sau alte substante chimice nocive
- Utilizeaza un proces simplu si economic de extractie a gelatinei din piele de bovina
- Utilizeaza un proces simplu si economic de obtinere a hidrolizatului de colagen
- Hidrolizatul de colagen se obtine printr-un proces cu zero reziduuri

Avantajele utilizarii biostimulatorilor pe baza de gelatina, evidentiate in urma testarilor efectuate pe plantele de tomate sunt urmatoarele:

- Cresterea numarului de inflorescente si fructe per planta
- Cresterea randamentului de productie si a calitatii fructelor
- Cresterea rezistentei plantelor la atacul fungilor specifici culturii de tomate
- Se ofera o alternativa ecologica pentru cresterea randamentului de productie si a calitatii fructelor, cresterea rezistentei plantelor la factorii biotici si abiotici de stres, imbunatatirea calitatii solului, reducand consumul de fertilizati de sinteza utilizati in practica agricola curenta si implicit reducerea amprentei de carbon.

Experimentarile realizate pentru verificarea proprietatilor biostimulatoare pentru cultura de tomate s-au realizat in campul experimental, in solar si in camp deschis, prin utilizarea produselor diluate conform rețetei de utilizare, prin aplicare foliara prin pulverizare, sau prin aplicare radiculara.

Se dau in continuare doua exemple de realizare a inventiei:

Exemplul 1

Se extrage gelatina din pielea de bovina decalcificata, maruntita si dispersata in apa in raport de 1:4, dupa ajustarea pH-ului la 5.7 ± 0.2 cu solutie de acid lactic 80%, sub agitare continua timp de 4...8 ore la temperatura de $75...90^{\circ}\text{C}$. Extractul obtinut se filtreaza si se usuca la 60°C la etuva cu aer de convecție, obtinandu-se un produs cu masa uscata si proteina cuprinsa intre 90..95%. Hidrolizatul de colagen se obtine din reziduurile solide ramase in urma extractiei gelatinei. Acestea se disperseaza in apa in raport solid lichid 1:2, se ajusteaza pH-ul la 8 ± 0.1 cu solutie de hidroxid de sodiu 1N, se adauga produsul enzimatic Protamex in procent de 1.4...1.6% raportat la masa de solid, sub agitare continua, la $45...55^{\circ}\text{C}$, timp de 2...4 ore. Se ridica temperatura la 90°C pentru 15 minute pentru inactivarea enzimei. Hidrolizatului obtinut

se filtreaza si se usuca la 50...55°C la etuva cu obtinerea unui produs cu continut de substanta uscata si proteina de masa uscata 90...95%. Gelatina obtinuta in raport de 40...60% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) se hidrateaza cu o cantitate suficienta de apa, se lasa in repaos 2..3 ore la temperatura camerei, apoi se incalzeste la 60..65°C pentru dizolvare totala. Se lasa la racit, pana ajunge la temperatura camerei, apoi se aditiveaza cu hidrolizat de colagen in procent de 20...40% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului), macro (P si K) si mezoelemente (Ca si Mg) in raport de 5.....25% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului), chelate cu EDTA. Se obtine un biostimulator sub forma de gel, care se dizolva in apa calda (dilutie 1:5...1:10) pentru a fi aplicat, dupa racire, foliar, prin pulverizare pe plantele de tomate in etapa de inflorire.

Exemplul 2

Se extrage gelatina din pielea de bovina decalcificata, maruntita si dispersata in apa in raport de 1:4, dupa ajustarea pH-ului la 5.7 ± 0.2 cu solutie de acid acetic 1 M, sub agitare continua timp de 4...8 ore la temperatura de 75...90°C. Adaosurile se raporteaza la masa de piele utilizata pentru extractia gelatinei. Extractul obtinut se filtreaza si se usuca la 60°C la etuva. Gelatina astfel obtinuta in raport de 45...55% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) se hidrateaza cu o cantitate suficienta de apa, se lasa in repaos 2..3 ore la temperatura camerei, apoi se incalzeste la 60..65°C pentru dizolvare totala. Se lasa la racit, pana ajunge la temperatura camerei apoi se aditiveaza cu mezo elemente (Ca si Mg) si complex de microelemente (Cu, Zn, Mn, Mo, B) chelate cu EDTA, in raport de 0.5...5% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului). Se obtine un biostimulator sub forma de gel care dilueaza in apa calda in raport de 1:5...1:10, se raceste, si se aplica radicular pe plantele de tomate in etapa de inflorire.

Produsele obtinute au fost testate in capul experimental, pe cultura de tomate in solar si in camp deschis. Numarul de inflorescenta si fructe per planta a fost mai mare in cazul plantelor tratate cu biostimulatorii pe baza de gelatina comparativ cu plantele martor. Fructele de tomate ajunse la maturitatea de coacere au fost recoltate si analizate din punct de vedere al continutului de substanta uscata, vitamina C, licopen si continut total de polifenoli pentru a se observa care sunt efectele acestor biostimulatori asupra calitatii fructelor. S-a constatat ca fructele plantelor tratate cu biostimulatorii pe baza de gelatina au un continut mai mare de vitamina C, licopen si polifenoli totali comparativ cu fructele plantelor martor. S-a observat ca fructele plantelor tratate cu biostimulatori s-au copt cu aproximativ cinci zile mai repede decat fructele plantelor martor.

Bibliografie

1. BESFORD, R.T. and G.A. MAW, *Effect of potassium nutrition on tomato plant growth and fruit development*. Plant and Soil, 1975. **42**: p. 395-412.
2. Jákli, B., et al., *Leaf, canopy and agronomic water-use efficiency of field-grown sugar beet in response to potassium fertilization*. Journal of Agronomy and Crop Science, 2018. **204**: p. 99-110.
3. Engels, C., E. Kirkby, and P. White, *Mineral Nutrition, Yield and Source–Sink Relationships*, in *Mineral Nutrition of Higher Plants*, P. Marschner, Editor. 2012, Academic Press: San Diego. p. 85-133.
4. Koch, M., et al., *Differential effects of varied potassium and magnesium nutrition on production and partitioning of photoassimilates in potato plants*. Physiol Plant, 2019. **166**: p. 921-935.
5. Liu, J., et al., *Effect of potassium fertilization during fruit development on tomato quality, potassium uptake, water and potassium use efficiency under deficit irrigation regime*. Agricultural Water Management, 2021. **250**: p. 106831.
6. Sturião, W.P., et al., *Deficiency of calcium affects anatomical, biometry and nutritional status of cherry tomato*. South African Journal of Botany, 2020. **132**: p. 346-354.
7. Sai, K., N. Sood, and I. Saini, *Classification of various nutrient deficiencies in tomato plants through electrophysiological signal decomposition and sample space reduction*. Plant Physiol Biochem, 2022. **186**: p. 266-278.
8. Velea, S., F. Oancea, and C.-M. Vladulescu, *Algal hydrolysate for treatment of crop and process for its production*. 2021: Romania.
9. F., O., et al., *Compoziție de biostimulant pentru plante din subproduse de pește și procedeu de obținere*, Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Chimie și Petrochimie - ICECHIM, Editor. 2020: RO.
10. Bhalla, S.K. and D.K. Hooper, *Process for manufacturing nutritional compositions for plants and soils*, E. Inc, Editor. 2019: Canada.
11. Cote, J.A.d., *Micronutrien-Containing Biostimulant Composition*, S.-X. LLC, Editor. 2022: US.

ANEXE

Tabel 1. Caracteristici chimice pentru biostimulatorii pe baza de gelatina

Caracteristici	Valori	
	Biostimulator pe baza de gelatina aditivat cu hidrolizat de collagen si macro si mezoelemente (V1)	Biostimulator pe baza de gelatina aditivat cu mezoelemente si complex de microelemente (V2)
Substanta uscata, %	14.17	23.60
Azot total, %*	1.93	2.81
Proteina, %*	10.88	15.8
Azot aminic	0.5	0.13
Cenusa, %	3.27	7.78
pH, unitati de pH	7.5	6.77
Vascozitate, mPa*s	2.25	2.5

*%raportate la substanta uscata



Figura 1. Plante tratate cu biostimulatorul pe baza de gelatina si plante martor



Figura 2. Plante tratate cu biostimulatorii pe baza de gelatina si plante martor

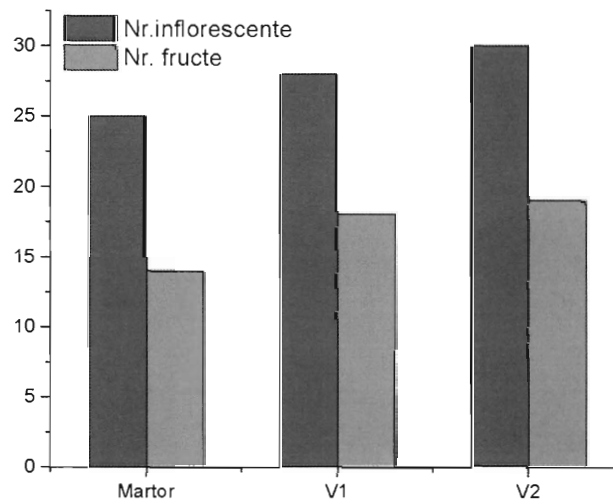


Figura 3. Numarul de inflorescente si fructe per planta pentru plantele tratate cu biostimulatoripe baza de gelatina (V1 si V2) si martor

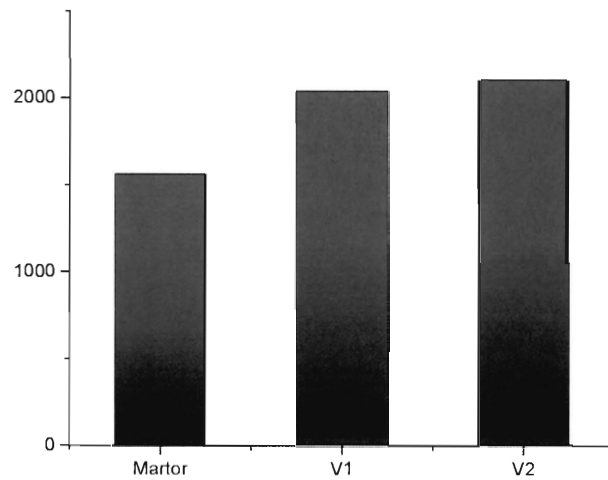


Figura 4. Cantitatea de fructe recoltata per 10 plante pentru martor si plantele tratate cu biostimulatorii pe baza de gelatine (V1 si V2)

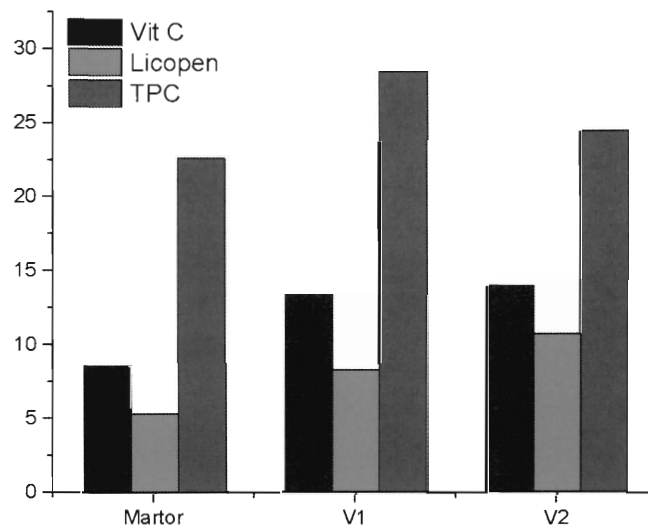


Figura 4. Continutul de vitamina C, licopen si polifenoli totali in fructele de tomate martor si tratate cu biostimulatorii pe baza de gelatina (V1 ai V2) exprimate in mg/100g produs

BIOSTIMULATORI PE BAZA DE GELATINA PENTRU TRATAREA PLANTELOR SI PROCEDEU DE OBTINERE

REVENDICARI

1. Procedeu de obtinere a unui biostimulator pe baza de gelatina si hidrolizat de colagen, **caracterizat prin aceea ca**, pentru obtinerea acestuia se extrage gelatina din piele bovina decalcificata, la un raport solid:lichid de 1:4, dupa ajustarea pH-ului cu acid lactic 80%, pana la valoarea de 5.7 ± 0.2 , sub agitare continua, la temperatura de 75...95°C, timp de 4...8 ore, urmata de filtrare si uscare la etuva la 60 °C, cu obtinerea unui produs cu continut de substanta uscata si proteina cuprinsa intre 90-95%; se extrage hidrolizatul de colagen din reziduurile obtinute in urma extractiei gelatinei din piele de bovina decalcificata, folosind un raport solid lichid 1:2, cu ajustarea pH-ului la 8 ± 0.1 cu solutie de hidroxid de sodiu 1N, se adauga Protamex in procent de 1.4...1.6% raportat la masa de solid, sub agitare continua la 45...55°C, timp de 2...4 ore, urmata de dezactivarea enzimei prin ridicarea temperaturii la 90°C pentru 15 minute, filtrare si uscare la 50...55°C; se aditiveaza 35...55% gelatina solida (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) se hidrateza cu apa in raport de 1:3...1:5 solid:lichid, timp de 2..3 ore la temperatura camerei, urmata de incalzeste la 60..65°C si racire, cu 20...40% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) hidrolizat de colagen si 5.....25% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) macro (P si K) si mezoelemente (Ca si Mg), chelate cu EDTA pentru a fi aplicat foliar la cultura de tomate sau alte plante, in perioada de inflorire.

2. Procedeu de obtinere a unui biostimulator pe baza de gelatina bovina aditivat cu mezo si microelemente, **caracterizat prin aceea ca**, pentru obtinerea acestuia se extrage gelatina conform procedului descris la Revendicarea 1, cu deosebirea ca ajustarea pH-ului se face cu acid acetic 1M; se aditiveaza 15...75% gelatina solida (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) care se hidrateaza cu apa in raport de 1:3...1:5 solid: lichid, se lasa in repaos 2..3 ore la temperatura camerei, apoi se incalzeste la 60..65°C, se raceste, cu 5....25% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) mezo elemente (Ca si Mg) si complex de microelemente (Cu, Zn, Mn, Mo, B), chelate cu EDTA, pentru a fi aplicat radicular la cultura de tomate.

3. Biostimulator pe baza de gelatina si hidrolizat de colagen, obtinut conform revendicarii 1, **caracterizat prin aceea ca** are in compozitie 35...55% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) gelatina obtinuta conform revendicarii 1, 20...40% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) hidrolizat de colagen obtinut conform revendicarii 1, macro si mezoelemente in procent de 5...25%, care se foloseste ca tratament foliar la cultura de tomate in etapa de inflorire cu scopul cresterii randamentului de productie si a calitatii fructelor de tomate.

4. Biostimulator pe baza de gelatina aditivat cu mezo si microelemente obtinut conform revendicarii 2, **caracterizat prin aceea ca** are in compozitie 15...75% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului) gelatina obtinuta conform revendicarii 2, mezo si microelemente in raport de 5...25% (% masice raportate la substanta uscata a biostimulatorului), chelate cu EDTA, pentru a fi aplicat radicular la cultura de tomate, cu scopul cresterii randamentului de productie si a calitatii fructelor de tomate.