

Naturalny stymulator rozwoju i odporności roślin

Przedmiotem wynalazku jest naturalny stymulator rozwoju i odporności roślin, zawierający kompozycję biologicznie czynnych *L*-aminokwasów wolnych oraz związanych w małowcząsteczkowe peptydy.

Obecna koncepcja rozwoju rolnictwa, tzw. rolnictwo zrównoważone, zakłada ograniczenie zużycia chemicznych środków na rzecz środków pochodzenia naturalnego. Roślina pod wpływem stresu może uruchomić reakcje obronne, dlatego coraz większą uwagę skupia się na indukowaniu reakcji obronnych roślin. Coraz powszechniej stosuje się dolistnie biostymulatory usprawniające procesy wzrostu, rozwoju roślin oraz przyczyniające się do redukcji stresu. Biostymulatory stosowane doglebowo usprawniają pobieranie składników mineralnych z podłoża, przyspieszają procesy transpiracji i fotosyntezy oraz stymulują wzrost korzeni. Wpływ biostymulatorów na rośliny nie polega na bezpośrednim udziale w regulacji procesów życiowych, lecz na oddziaływaniu na metabolizm rośliny. Biostymulatory usprawniają zachodzące w roślinach procesy życiowe bez modyfikowania ich naturalnego zachowania. Wpływają dodatnio na wzrost roślin i jakość plonów.

Znane biostymulatory roślin bazują na substancjach aktywnych pochodzenia białkowego i mineralnego, a zawarte w nich substancje aktywne mogą być syntetyczne lub pochodzenia naturalnego: roślinnego, zwierzęcego i odzwierzęcego. Ze względów praktycznych zaleca się stosowanie biostymulatorów, syntetycznych lub pochodzenia naturalnego, łącznie ze środkami ochrony roślin.

Aminokwasy stanowią niezwykle zróżnicowaną grupę związków, które pełnią w organizmach żywych wiele istotnych funkcji. Stanowią podstawowy budulec komórek roślinnych, stymulują syntezę, przyspieszają proces odbudowy tkanek oraz biorą udział w wielu procesach fizjologicznych. Sekwencyjnie połączone wiązaniami peptydowymi tworzą peptydy. Rośliny mogą syntetyzować aminokwasy z podstawowych pierwiastków, tj. tlenu, węgla i azotu, które pobierane są z wody, powietrza i gleby. Proces ten jest czasochłonny i wymaga bardzo dużych nakładów energii. Dostarczanie roślinom aminokwasów, w postaci wolnej i związanej, wspomaga ich rozwój przy stresach abiotycznych (środowiskowych, odżywczych, mechanicznych), a także biotycznych (szkodniki i organizmy chorobotwórcze).

Aminokwasy mogą być otrzymywane w procesie syntezy chemicznej, hydrolizy chemicznej lub hydrolizy enzymatycznej białek zwierzęcych (np. keratyna, kolagen), bądź białek roślinnych (np. algi, kukurydza, soja).

Preparaty na bazie biologicznie aktywnych aminokwasów istotnie poprawiają odporność roślin na stres dzięki związkom osmoprotekcyjnym. Przykładowo prolina jest aminokwasem o działaniu osmoprotekcyjnym, który przejawia działanie komplementarne do innych istniejących osmoprotektantów, np. glicyny.

Wiele z obecnych na rynku preparatów/nawozów/biostymulatorów zawiera w swoim składzie aminokwasy, które mogą pochodzić z różnych źródeł i rodzajów surowców. W procesie hydrolizy otrzymywane są rozpuszczalne w roztworach wodnych aminokwasy i peptydy z nierozpuszczalnych białek. Hydroliza chemiczna, kwaśna lub zasadowa, jest procesem wysokotemperaturowym, w którym otrzymuje się aminokwasy w formie *L*- i *D*-. Natomiast w organizmach żywych aminokwasy występują wyłącznie w formach lewoskrętnych (biologicznie aktywnych) i tylko w takich formach mogą efektywnie odżywiać rośliny. W procesach hydrolizy enzymatycznej białek stosowane są naturalne enzymy pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub mikrobiologicznego. Proces jest niskotemperaturowy i nie powoduje zmian enancjomerycznych, a zastosowane enzymy tną łańcuch białkowy w określonych miejscach, w powtarzalny sposób. Produktem są wolne, nieuszkodzone i w pełni aktywne cząsteczki *L*-aminokwasów i *L*-aminokwasów związanych w małowcząsteczkowe peptydy. W zależności od surowca białkowego, jak również specyficznej roli enzymu, otrzymane hydrolizaty różnią się między sobą składem aminokwasowym.

Znany jest biostymulator zwiększający produktywność roślin w postaci preparatu dostępnego pod nazwą handlową Natural CropSL firmy Natural Crop Poland Sp. z o. o. Stanowi go enzymatyczny koncentrat szesnastu najważniejszych dla roślin *L*-aminokwasów, otrzymanych w procesie hydrolizy enzymatycznej kolagenu. Preparat zawiera azot wyłącznie w formie organicznej w ilości 9% wag., *L*-aminokwasy >50% wag. (z tego wolne *L*-aminokwasy >2% wag.), węgiel organiczny > 24,5% wag.

Handlowo dostępny preparat Kaishi firmy Sumi Agro Poland Sp. z o. o. jest produktem zawierającym dziewiętnaście aminokwasów otrzymanych w procesie hydrolizy enzymatycznej białek pochodzenia wyłącznie roślinnego. Preparat zawiera: 12,0% wag. wolnych *L*-aminokwasów, azotu łącznie 2,0% wag., azotu organicznego 2,0% wag.

Innym znanym stymulatorem roślin na bazie aminokwasów będących produktem hydrolizy enzymatycznej, komercyjnie dostępnym pod nazwą Aminoplant, jest preparat firmy Chemtura Europe Limited Sp. z o. o. Zawartość *L*-aminokwasów w preparacie wynosi 17,3% wag., peptydów o krótkim łańcuchu 82,7 % wag., azotu całkowitego 8,5% wag., materii organicznej 54,0% wag. Preparat zawiera osiemnaście *L*-aminokwasów, z których największą ilość stanowi *L*-glicyna, odgrywająca ważną rolę w procesie formowania komórek roślinnych oraz syntezie chlorofilu.

Ze zgłoszenia patentowego P-415595 znany jest stymulator wzrostu roślin otrzymany w wyniku łączenia produktu hydrolizy kwaśnej z produktem hydrolizy zasadowej substancji naturalnych zawierających keratynę, do którego wprowadza się składniki mineralne. Otrzymany sposobem według wynalazku stymulator zawierał do 35% wag. biologicznie czynnych *L*-aminokwasów, w tym co najmniej 5% wag. biologicznie czynnych *L*-aminokwasów, zdolnych do kompleksowania mikroelementów, przy czym schelatowane aminokwasami formy mikroelementów stanowiły co najmniej 0,01% wag.

W zgłoszeniu patentowym P-415593 ujawniono stymulator wzrostu i rozwoju roślin na bazie hydrolizatów białkowych z surowców pochodzenia odzwierzęcego keratynowego (pierze drobiowe, zmielone racice, szczecina), w którym biologicznie czynne aminokwasy pochodzą z niezależnie prowadzonych procesów hydrolizy chemicznej kwaśnej i alkalicznej. Otrzymany stymulator roślin zawierał do 35% wag. biologicznie czynnych *L*-aminokwasów.

Z patentu europejskiego EP 2 752 399 B1 znany jest sposób otrzymywania ekstraktu enzymatycznego z odpadów pobrowarniczych do stosowania jako bionawóz i suplement dla zwierząt. Produkt otrzymuje się w procesie hydrolizy chemicznej (alkalicznej) i następującej po niej hydrolizy enzymatycznej, prowadzonej w obecności enzymu proteolitycznego drobnoustrojów. Otrzymany produkt zawierał węglowodany w ilości od 40 do 45% wag., azot w ilości od 7 do 8% wag., a aminokwasem przewarżającym była histydyna.

Odpowiedni dobór enzymów w procesach hydrolizy enzymatycznej białek pozwala otrzymywać hydrolizaty o określonych właściwościach, co zostało opisane m.in. w polskim opisie patentowym PL 196531 B1, z którego znany jest sposób otrzymywania preparatu peptydowego o działaniu przeciwbakteryjnym z naturalnego surowca - bielma ostropestu plamistego. Preparat otrzymuje się w procesie hydrolizy enzymatycznej, prowadzonej w obecności enzymów proteolitycznych. Powstający hydrolizat rozdziela się na frakcje o różnej masie cząsteczkowej, przy czym jedynie wybrane frakcje wykazują aktywność przeciwbakteryjną.

Celem wynalazku było opracowanie naturalnego stymulatora pełniącego funkcję stymulującą rozwój i odporność roślin na stres abiotyczny i biotyczny.

Prowadząc badania nad przetwarzaniem nasion gorczycy, nieoczekiwanie okazało się, że nasiona gorczycy, w tym odmiany białej, czarnej lub sarepskiej, poddane hydrolizie enzymatycznej, z zastosowaniem enzymów proteolitycznych, stanowią źródło substancji aktywnych stymulujących rozwój i odporność roślin.

Naturalny stymulator rozwoju i odporności roślin, w postaci wysuszonego hydrolizatu białek naturalnego surowca, otrzymanego w procesie hydrolizy enzymatycznej w obecności enzymów proteolitycznych, trypsyny lub pankreatyny, zawierającego węglowodany, tłuszcze, aminokwasy oraz ewentualnie inne składniki naturalnie występujące w naturalnym surowcu poddanym hydrolizie, według wynalazku charakteryzuje się tym, że stanowi wysuszony hydrolizat białek nasion gorczycy, który zawiera od 30 do 60% wagowych rozpuszczalnych w wodzie biologicznie czynnych *L*-aminokwasów, w postaci wolnej oraz związanej w małowcząsteczkowe peptydy posiadające od 2,0 do 6,5 reszt aminokwasowych w cząsteczce, przy czym zawartość azotu całkowitego w hydrolizacie wynosi od 4,0 do 12,0% wagowych.

Naturalny stymulator stanowi hydrolizat białek nasion gorczycy, w tym odmiany białej, czarnej lub sarepskiej, korzystnie będących produktem ubocznym przemysłu spożywczego, korzystnie makucha lub śruty poekstrakcyjnej (pozostałość po otrzymaniu oleju).

Wśród substancji naturalnie występujących w nasionach gorczycy, które mogą być obecne w hydrolizacie, wyróżnia się m.in. związki biologicznie aktywne z grupy polifenoli, kwasów wielonienasyconych, związków siarkowych, śluzów oraz glikozydów.

Naturalny stymulator o składzie według wynalazku otrzymuje się w znany ze stanu techniki sposób polegający na enzymatycznej hydrolizie białek naturalnego surowca. Surowiec (nasiona gorczycy) przeznaczony do hydrolizy wstępnie rozdrobniono i/lub odłuszczone, a następnie poddano działaniu enzymów proteolitycznych, korzystnie trypsyny lub pankreatyny (mieszanina zawierająca trypsynę, chymotrypsynę, lipazę, amylazę, tłuszcz). Proces prowadzono w środowisku wodnym, w temperaturze 35-45°C, w czasie 3-6 godzin, utrzymując pH 7,0-8,0. Po dezaktywacji enzymu, uzyskany roztwór hydrolizatu suszono rozpyłowo w temperaturze do 140°C lub liofilizowano. Otrzymany stymulator stanowił bezpostaciowy osad o barwie przechodzącej od brązu do beżu.

Surowcem wyjściowym do otrzymania hydrolizatu mogą być produkty uboczne powstałe po różnego rodzaju obróbce nasion gorczycy z przemysłu spożywczego (tj. makuch

lub śruta poekstrakcyjna), co stanowi dużą zaletę wynalazku, ponieważ pozwala efektywnie zagospodarować wspomniane odpady.

Stymulator roślin według wynalazku charakteryzuje się wysoką zawartością aminokwasów, wolnych oraz związanych, o konformacji *L*, wynoszącą do 60% wagowych, zawierających zwłaszcza reszty aminokwasowe kwasu asparaginowego i glutaminowego, seryny, glicyny, proliny, alaniny, argininy, waliny, lizyny, treoniny, histydyny, leucyny i izoleucyny. Konformacja *L* jest naturalną formą enancjomeryczną białek występujących w roślinach, a zatem nietoksyczną i aktywną.

Stymulator według wynalazku stosuje się na rośliny w postaci roztworu wodnego o stężeniu od 0,1 do 5% wag. Przeznaczony jest do stosowania dolistnego i/lub doglebowego w uprawach rolniczych i ogrodniczych w celu stymulacji rozwoju, zwiększenia tolerancji roślin na stres abiotyczny i biotyczny, a także szybszej ich regeneracji po ustąpieniu warunków stresowych.

Przedmiot wynalazku został zilustrowany w przykładach, przedstawiających skład kompozycji substancji aktywnych w postaci *L*-aminokwasów, wolnych oraz związanych w małych cząsteczkowe peptydy, o działaniu stymulującym rozwój i odporność roślin.

Przykład 1.

Do 130 g odłuszczonych nasion gorzycy białej dodano 780 g wody i mieszając doprowadzono pH zawiesiny do wartości 7,5, stosując w tym celu 3% roztwór wodorotlenku sodowego. Doprowadzono temperaturę masy reakcyjnej do 40°C, po czym dodano 1% wag. trypsyny w stosunku do ilości białka zawartego w nasionach gorzycy białej. Reakcję prowadzono przez 3 godziny utrzymując powyższe warunki. Następnie dokonano dezaktywacji enzymu przez ogrzanie mieszaniny reakcyjnej do 80°C. Hydrolizat odsączono i zliofilizowano. Otrzymany hydrolizat charakteryzował się zawartością azotu całkowitego 4,1% wag., średnią liczbą grup aminokwasowych w cząsteczce peptydu 2,5. Sumaryczna zawartość *L*-aminokwasów wyniosła 34,85% wag. Skład aminokwasowy (aminogram) hydrolizatu przedstawiono w Tabeli 1, zaś skuteczność jego działania - w Tabeli 4.

Tabela 1. Skład aminokwasowy hydrolizatu z odłuszczonych nasion gorzycy białej.

| Aminokwasy | Sumaryczna zawartość <i>L</i> -aminokwasów w hydrolizacie* [%wag.] |
|-------------------|--|
| Kwas asparaginowy | 3,74 |

| | |
|------------------|------|
| Kwas glutaminowy | 6,24 |
| Seryna | 1,54 |
| Glicyna | 2,34 |
| Histydyna | 1,19 |
| Arginina | 2,41 |
| Treonina | 1,74 |
| Alanina | 1,57 |
| Prolina | 2,34 |
| Tyrozyna | 0,87 |
| Walina | 1,93 |
| Metionina | 0,74 |
| Cysteina | 0,07 |
| Izoleucyna | 1,51 |
| Leucyna | 2,65 |
| Fenylalanina | 1,46 |
| Lizyna | 2,51 |

* Sumaryczna zawartość *L*-aminokwasów w hydrolizacie z odtłuszczonych nasion gorczycy białej wynosi 34,85% wag.

Przykład 2.

Stosując procedurę opisaną w Przykładzie 1, otrzymano hydrolizat z odtłuszczonych nasion gorczycy czarnej, który charakteryzował się zawartością azotu całkowitego 10,6% wag., średnią liczbą grup aminokwasowych w cząsteczce peptydu 5,13. Sumaryczna zawartość *L*-aminokwasów wyniosła 48,37% wag. Skład aminokwasowy hydrolizatu przedstawiono w Tabeli 2, zaś skuteczność jego działania - w Tabeli 4.

Tabela 2. Skład aminokwasowy hydrolizatu z odtłuszczonych nasion gorczycy czarnej.

| Aminokwasy | Sumaryczna zawartość <i>L</i> -aminokwasów w hydrolizacie* [%wag.] |
|-------------------|--|
| Kwas asparaginowy | 3,91 |
| Kwas glutaminowy | 10,33 |
| Seryna | 2,12 |
| Glicyna | 2,66 |
| Histydyna | 1,77 |

| | |
|--------------|------|
| Arginina | 3,88 |
| Treonina | 2,23 |
| Alanina | 2,15 |
| Prolina | 3,77 |
| Tyrozyna | 1,03 |
| Walina | 2,54 |
| Metionina | 0,97 |
| Cysteina | 0,40 |
| Izoleucyna | 2,02 |
| Leucyna | 3,57 |
| Fenylalanina | 1,95 |
| Lizyna | 3,07 |

* Sumaryczna zawartość *L*-aminokwasów w hydrolizacie z odtłuszczonych nasion gorczyicy czarnej wynosi 48,37% wag.

Przykład 3.

Do 130 g rozdrobnionych nasion gorczyicy białej dodano 780 g wody i mieszając doprowadzono pH zawiesiny do wartości 7,8, stosując w tym celu 3% roztwór wodorotlenku sodowego. Doprowadzono temperaturę mieszaniny reakcyjnej do 38°C, po czym dodano 1% wag. pankreatyny w stosunku do ilości białka zawartego w nasionach gorczyicy białej. Reakcję prowadzono przez 5 godzin utrzymując powyższe warunki. Następnie dokonano dezaktywacji enzymu przez ogrzanie mieszaniny reakcyjnej do 80°C. Hydrolizat odsączono i poddano suszeniu rozpyłowemu. Otrzymany hydrolizat charakteryzował się zawartością azotu całkowitego 5,31% wag., średnią liczbą grup aminokwasowych w cząsteczce peptydu 3,8. Sumaryczna zawartość *L*-aminokwasów wyniosła 31,14% wag. Skład aminokwasowy hydrolizatu przedstawiono w Tabeli 3, zaś skuteczność jego działania - w Tabeli 4.

Tabela 3. Skład aminokwasowy hydrolizatu z rozdrobnionych nasion gorczyicy białej.

| Aminokwasy | Sumaryczna zawartość <i>L</i> -aminokwasów w hydrolizacie* [%wag.] |
|-------------------|--|
| Kwas asparaginowy | 2,51 |
| Kwas glutaminowy | 5,33 |
| Seryna | 1,25 |
| Glicyna | 2,11 |

| | |
|--------------|------|
| Histydyna | 0,9 |
| Arginina | 2,51 |
| Treonina | 1,65 |
| Alanina | 1,38 |
| Prolina | 2,05 |
| Tyrozyna | 0,7 |
| Walina | 1,95 |
| Metionina | 0,75 |
| Cysteina | 0,2 |
| Izoleucyna | 1,33 |
| Leucyna | 2,54 |
| Fenylalanina | 1,45 |
| Lizyna | 2,53 |

* Sumaryczna zawartość *L*-aminokwasów w hydrolizacie z rozdrobnionych nasion gorczycy białej wynosi 31,14% wag.

Tabela 4. Ocena wpływu wodnego roztworu hydrolizatu na rozwój objawów chorobowych mączniaka prawdziwego róż odmiany *Rose der Einheit* uprawianych pod osłonami (porażenie wstępne = 1).

| Naturalny stymulator | Stopień porażenia roślin | |
|---------------------------------------|--------------------------|----------------|
| | po 2 opryskach | po 4 opryskach |
| Kontrola | 2 | 5 |
| 1% roztwór hydrolizatu wg przykładu 1 | 1 | 2 |
| 3% roztwór hydrolizatu wg przykładu 1 | 0 | 0 |
| 1% roztwór hydrolizatu wg przykładu 2 | 1 | 0 |
| 3% roztwór hydrolizatu wg przykładu 2 | 0 | 0 |
| 1% roztwór hydrolizatu wg przykładu 3 | 1 | 2 |
| 5% roztwór hydrolizatu wg przykładu 3 | 0 | 0 |

Skala porażenia:

0 – brak objawów,

- 1 – do 1% powierzchni pędów/liści pokrytej grzybnia,
- 2 – od 1,1 do 5% powierzchni pędów/liści pokrytej grzybnia,
- 3 – od 5,1 do 10% powierzchni pędów/liści pokrytej grzybnia,
- 4 – od 10,1 do 20% powierzchni pędów/liści pokrytej grzybnia,
- 5 – powyżej 20% powierzchni pędów/liści pokrytej grzybnia.

Badania potwierdziły, że użycie wodnego roztworu hydrolizatu białek nasion gorczycy na róże зараżone mączniakiem prawdziwym zwiększa ich odporność oraz zdolność do regeneracji, stymuluje procesy fizjologiczne, korzystnie przy tym wpływając na kwitnienie. Optymalną stymulację rozwoju i odporności roślin uzyskano przy stężeniu roztworów hydrolizatu wynoszącym 3% wag.



Jolanta Rosińska

rzecznik patentowy