



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00111**

(22) Data de depozit: **11/03/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/08/2021 BOPI nr. **8/2021**

(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;**
• **BĂRBIERU OTILIA GABRIELA,
STR.GHEORGHE DOJA, NR.5, BL.7A, SC.4,
ET.1, AP.62, GALAȚI, GL, RO;**
• **TRITEAN NAOMI, STR.PERFEȚIONĂRII,
NR.11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **HIDROLIZAT DE DROJDIE EPUIZATĂ DE LA FABRICAREA
BERII, PROCEDEU DE UTILIZARE A ACESTUIA
ȘI PRODUSE REZULTATE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a hidrolizatului de drojdie epuizată de la fabricarea berii utilizat pentru prepararea unor produși aditivi alimentari potențiatori de gust și de aromă. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: normalizarea la o concentrație de 15...20% substanță uscată a drojdiei de bere, corectarea pH la 5,5, dezaerarea suspensiei de drojdie, tratarea cu un amestec de enzime care conține endo- și exo-(1,3)-β-D-glucanază și endo-chitinază, lizarea

celulară prin omogenizare la înaltă presiune și hidroliza enzimatică prin tratare cu endo- și exo-proteaze și glutaminază, din care rezultă un hidrolizat de drojdie care este prelucrat în continuare pentru obținerea unor produși aditivi, alimentari, potențiatori de gust și de aromă, respectiv, furajeri.

Revendicări: 4



HIDROLIZAT DE DROJIDE EPUIZATA DE LA FABRICAREA BERII, PROCEDEU DE
UTILIZARE A ACESTUIA ȘI PRODUSE REZULTATE

52

Prezenta invenție se referă la un hidrolizat de drojdie, care este obținut printr-un procedeu de hidroliză enzimatică în două trepte cu amestecuri de enzime exogene, aplicat pe drojdie epuizată de la fabricarea berii, ca și la procedeu de utilizare a acestui hidrolizat pentru obținerea unor aditivi alimentari, potențiatori de gust, și a unor aditivi furajeri, adsorbenți de micotoxine și cu efect de limitare a dezvoltării enteropatogenilor.

Sunt cunoscute diferite procedee de hidroliză a biomasei de drojdie de bere. Aceste procedee de fabricație ale hidrolizatelor de drojdie pot fi împărțite în procedee care se bazează pe hidroliză determinată de enzimele endogene (autoliză) și procedee de hidroliză care utilizează adaos de enzime exogene. **Autoliza** drojdiei de bere este auto-digestia celulei prin enzimele sale endogene. În timpul autolizei, proteinele, glicogenul, acizii nucleici și alte componente celulare sunt degradate, sub acțiunea unor enzime provenite din citoplasma și/sau organitele celulei de drojdie - proteaze, nucleaze, glucanaze și fosfolipaze (Babayán & Bezrukov, 1985). Autoliza celulei de drojdie este declanșată atunci când ciclul de creștere al celulelor de drojdie este finalizat și începe faza de declin. Enzimele endogene, în special cele eliberate din lizozomi, determină degradarea parțială a peretelui celular al celulelor de drojdie, permițând extracția componentelor de interes, inclusiv proteine, vitamine și carbohidrați, fără a deteriora (semnificativ) structura nativă a acestora (Podpora et al., 2015). Perioada de timp și temperatura la care are loc autoliza sunt foarte importante, 50°C pentru 24 de ore fiind considerați parametrii optimi în ceea ce privește randamentul de extracție în proteine / aminoacizi (Tanguler & Erten, 2008). **Plasmoliza** se referă la un proces de autoliză modificat, cu adăugarea de "compuși acceleratori" pentru a amplifica spargerea celulelor. Acești compuși acceleratori includ săruri anorganice și solvenți organici – de exemplu acetat de etil (Takaloo et al., 2020). Există o serie de dezavantaje ale procesului de autoliză / plasmoliză al drojdiilor, inclusiv timpul relativ îndelungat de menținere la temperatura de 50°C, randamentul scăzut în componente biologic active, separarea dificilă a fazelor din cauza cantității mari de reziduuri în autolizat, un risc crescut de contaminare microbiană și caracteristici senzoriale inferioare (Jaeger et al., 2020). Pentru a elimina aceste dezavantaje au fost propuse procedee de hidroliză cu enzime exogene.

Hidroliza enzimatică cu enzime exogene a fost realizată cu mai multe tipuri de hidrolaze comerciale, ca de ex. proteaze (papaină, amestec de proteze pancreatice / zimolază, amestec de proteine produse de *Bacillus* spp. / Protamex, amestec de

peptidaze, aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-peptidaze produs de *Aspergillus oryzae* / Flavourzyme, serin endo-peptidază de tip subtilizina A, produsă de *Bacillus licheniformis* / Alcalază) sau cu diverse tipuri de β -glucanaze (Takaloo et al., 2020, Jaeger et al., 2020).

Autoliza / plasmoliza / hidroliza drojdiilor are ca scop obținerea de două categorii de produse, unele pe bază de extract de drojdie (proteine / peptide / aminoacizi și/sau nucleotide), și unele pe bază de pereți celulari de drojdie. Produsele pe bază de extract de drojdie se folosesc în principal ca: potențiatori de gust și de aromă pentru diferite tipuri de preparate alimentare (inclusiv condimente universale - bază pentru mâncăruri); hidrolizate proteice utilizate pentru alimente (semi)preparate sau furaje complexe; suport pentru suplimente nutritive mineralo-organice; mediu pentru sinteza bioasistată a nanoparticulelor anorganice; componente pentru medii de cultură.

Utilizarea extractelor de drojdie ca potențiator de gust și de aromă se datorează aminoacizilor / acizilor organici / peptidelor care stimulează receptorii pentru gustul *umami* și (ribo)nucleotidelor, în special acid 5'-inosinic (5'-IMP) și acid 5'-guanilic (5'-GMP). *Umami*, respectiv gustul savorii, a fost recunoscut în ultimele decenii ca fiind unul dintre gusturile de bază, alături de cele 4 tradițional (re)cunoscute - dulce, amar, acru și sărat (Banik & Medler, 2021). Denumirea de *umami* a fost dată în 1908 de chimistul japonez Kikunae Ikeda, pentru a desemna compusul care conferă savoare condimentului tradițional bază pentru mâncăruri, *dashi*, produs din alga *kombu* (Kurihara, 2015). Cuvântul *umami*, este o combinație a două cuvinte japoneze, *umai* care înseamnă „delicios” și *mi* „gust”, și se referă, de fapt, la un gust care este specific produselor bogate în aminoacizi și nucleotide (*gust de carne*). Inițial Ikeda a identificat glutamatul de sodiu ca fiind compusul implicat în generarea gustului *umami*. Ulterior, în deceniul 5 al secolului trecut (ribo)nucleotidele, respectiv 5'-inosinic (5'-IMP) și acid 5'-guanilic (5'-GMP), au fost identificate ca acționând sinergic pentru a genera *gustul savuros* (Kurihara, 2015). Acidul aspartic a fost identificat de asemenea ca acționând asupra receptorilor umami, dar cu un prag de sensibilitate de peste 3 ori mai mare (Wu et al., 2012). Acidul succinic, și în special sarea sa disodică, a fost de asemenea evidențiat ca un compus care acționează asupra receptorilor *umami* (Ma et al., 2020). O serie de peptide, în special cele care conțin resturi de acid glutamic și acid aspartic, au fost demonstrate de asemenea ca acționând asupra unor receptori *umami* (Zhao et al., 2019).

Gustul *umami* este gustul influențat de toate produsele de tip condiment-bază pentru mâncăruri, care sunt amestecuri de sare, glutamat de sodiu, extract de drojdie / (ribo)nucleotide, legume și plante aromatice uscate și măcinate. Sunt cunoscute

50
 procedee prin care biomasa de drojdie este utilizată pentru producerea de condimente – universale bază pentru mâncăruri, atât ca sursă de aminoacizi / acizi care acționează asupra receptorilor umami, cât și ca sursă de nucleotide. Brevetul US10827771 B2 descrie un procedeu pentru producerea unui extract de drojdie care conține cantități ridicate de acid succinic și acid glutamic. Procedeu implică menținerea unei suspensii de drojdie cultivată care aparține genurilor *Saccharomyces* sau *Candida* timp de 2 până la 30 de ore la 40 până la 55°C și pH 4,0 până la 7,5 pentru a crește conținutul de acid succinic și de acid glutamic în biomasa de drojdie. Dezavantajul acestui procedeu este că determină obținerea unui produs în care predomină acizii organici cu rol de potențiatori de gust, în special acid glutamic, și nu peptide *umami*.

Cererea de brevet JP2007049989A revendică un extract de drojdie care are ≥ 25 % aminoacizi liberi, și un conținutul total de 5'-IMP și 5'-GMP de ≥ 2 %. Extractul de drojdie este obținut prin liza pereților celulari cu β -glucanază și manază la pH=9-10, urmat de un tratament combinat de autoliză și hidroliză, în care acționează endoproteaze de origine endogenă și exogenă pentru a genera aminoacizii, și fosfodiesteraze / nucleaze pentru a converti (ribo)nucleotidele la 5'-IMP și 5'-GMP.

Brevetul EP 0247500 B1 se referă la un procedeu de obținere a unui condiment universal *umami* care include: (i) prepararea unui extract de drojdie de bere, respectiva drojdie de bere fiind obținută ca un produs secundar la producția de bere, cu etapele de: (a) extragere cu apă a unei suspensii apoase de celule de drojdie de bere în condiții în care nu are loc nici o descompunere substanțială a respectivelor celule, (b) separarea componentelor solide și lichide ale suspensiei menționate, (c) sterilizarea menționate component lichid, (d) reglarea pH-ului componentei lichide menționate la aproximativ 2-4, în care respectiva etapă de reglare are loc înainte de respectiva etapă de sterilizare și (e) condensarea și neutralizarea respectivului component lichid sterilizat la un pH de aproximativ 4,5-7,0 pentru a obține respectivul extract de drojdie de bere; și (ii) adăugarea respectivului extract de drojdie de bere la un condiment sau aliment care conține cel puțin un agent potențiator de gust selectat din grupul constând din acid glutamic, săruri ale acidului glutamic și agenți potențiatori de gust de tip nucleotide. Nici acest procedeu, unul dintre puținele identificate în stadiul anterior al tehnicii care se referă explicit la drojdia-de bere de fermentație (subprodus secundar de la fabricarea berii), nu descrie producerea de peptide *umami* din biomasa de drojdie. În plus, procedeu descris prin brevetul EP 0247500 B1 valorifică doar parțial biomasa de drojdie-de-bere de fermentație.

Pereții celulari de drojdie au o structură complexă, care include β -glucan, chitină, manoproteine / manani. Utilizările sunt în funcție de polizaharida predominantă în

produsul rezultat prin aplicarea diferitelor tipuri de hidroliză. Datorită efectelor lor de (co)emulgatori manoproteinele / mananii îmbunătățesc textura și aspectul produselor alimentare. Capacitatea mananilor de a susține dezvoltarea bacteriilor prebiotice (efectul prebiotic) determină efecte fiziologice benefice, cum ar fi controlul obezității și controlul greutatei corporale, beneficii prebiotice, combaterea tulburărilor de tranzit intestinal, reducerea simptomelor de sindrom de colon iritabil, gestionarea bolilor diverticulare, modularea sistemului imunitar, reducerea riscului de cancer colorectal (Singh et al., 2018). Mano(oligo)zaharidele au și caracteristici de legare a micotoxinelor (Baptista et al., 2004). β -glucanii sunt și ei utilizați ca adsorbenti pentru micotoxine din furaje (Luo et al., 2020) sau ca imunostimulanți (Castro et al., 2021). Chitina din peretele celular al drojdiilor, inclusiv în combinație cu β -glucanul, acționează ca elicitor al sistemului de apărare din plante (Sun et al., 2018) și ca biostimulant pentru plante (Shamshina et al., 2020), în special datorită eliberării de oligozaharine, respectiv de compuși produși prin hidroliza polizaharidelor care au rol de semnal pentru activarea răspunsului de apărare din plante (Falcón-Rodríguez et al., 2012). Un amestec de β -glucan și chitosan, denumit *cerevisane*, modifică exprimarea genelor după aplicare la vița de vie (De Miccolis Angelini et al., 2019). Genele supra-exprimate sunt cele care codifică pentru răspunsul plantelor la stres: (i) proteinele implicate în procesele de apărare din plante; (ii) enzimele implicate în metabolismul hormonilor asociați sistemului de apărare (acid salicic, acid jasmonic, etilenă); (iii) metaboliți secundari (în special polifenoli) și (iv) procesele fotosintetice. Sunt cunoscute diferite compoziții și metode de utilizare a pereților de drojdie. Brevetul SUA 8168618 B2 prezintă un agent emulsifiant obținut din pereți celulari de drojdie, care este o manoproteină cu masa moleculară mai mare de 100 kDa. Brevetul SUA 10582723 B2 se referă la o compoziție prebiotică din pereți de drojdie, îmbogățită în manooligozaharide (MOS) printr-un procedeu non-enzimatic care constă în următoarele etape: i) extragerea pereților celulelor de drojdie în mediu alcalin; ii) separarea soluției solubile manoligozaharide din pasul i) de materialul insolubil; iii) neutralizarea soluției solubile manoligozaharide din pasul ii) cu acid la temperatura camerei; și iv) concentrarea soluției solubile manoligozaharide de la pasul iii).

Brevetul EP1079696 B1 descrie o compoziție de aditiv furajer, pentru legarea și astfel inactivarea micotoxinelor (aflatoxine, zearalenone, fumonisine), care conține între 90 și 99% dintr-un extract de pereți de celule de drojdie, îmbogățit în manoligozaharide, și de la 1 la 10% aluminosilicați. Cererea de brevet JP2009234948 A protejează o compoziție de adsorbenti de micotoxine, realizată pe baza unui produs obținut prin

hidroliza pereților celulari de drojdie sub acțiunea unei β -glucanaze, care conține 60-95% în greutate glucan solubil.

49

Amestecul de β -glucan și chitosan, denumit cerevisane și utilizat ca elicitor al sistemului de apărare din plante, este obiectul brevetului de invenție US 8609084 B2.

Cererea pe piață pentru hidrolizate de drojdie este într-o continuă creștere în ultima perioadă. În cazul aditivilor alimentari potențiatori de gust și de aromă, hidrolizatele de drojdie reprezintă o alternativă viabilă la glutamatul de sodiu (*monosodium glutamate*, MSG). MSG este utilizat ca aditiv alimentar (potențiator de gust) și în numeroase preparate și semi-preparate alimentare (Jinap & Hajeb, 2010), nu numai în condimentele bază pentru mâncăruri. Utilizarea compușilor care potențează / stimulează gustul *umami* s-a demonstrat a avea o serie de efecte pozitive: îmbunătățirea aportul nutrițional al persoanelor în vârstă și bolnavilor prin restabilirea poftei de mâncare, protecție împotriva cancerului duodenal, reducerea ingestiei de sare / clorură de sodiu și a consumului de grăsime, ameliorarea sănătății cavității bucale (Zhang et al., 2020). Pe de altă parte, consumul excesiv de glutamat de sodiu, conștient, prin adăugarea în mâncare a condimentelor universale *umami*, sau inconștient, prin consumul de preparate alimentare care-l conțin ca aditiv, determină efecte secundare negative. Printre cele mai semnificative sunt disfuncțiile de reproducere masculine, care includ modificarea spermatogenică / număr scăzut de spermatozoizi și o pondere crescută a spermatozoizilor cu anomalii, scăderea numărului de spermatozoizi mobili și scăderea pH-ului spermei, alterări determinate de stresul oxidativ (creșterea peroxidării lipidelor și reducerea activităților enzimelor antioxidante), modificări histopatologice la nivelul testiculelor (hemoragie sanguină, celule Sertoli și celule germinale alterate), precum și dezechilibru gonadotropinic (nivele reduse de testosteron, hormon luteinizant și hormon folicul-stimulator) (Kayode et al., 2020). Cauzele acestor disfuncții sexuale masculine sunt neurologice, datorită suprasolicitării receptorilor care răspund la glutamat (Chiang & Park, 2020). Alte efecte secundare negative ale consumului de glutamat sunt hepatotoxicitatea, favorizarea obezității, disfuncțiile neuronale și cognitive, declanșarea unor boli autoimune, în special a astmei (Zhang et al., 2020, Chakraborty, 2019). Administrația pentru Alimente și Medicamente din SUA (FDA) a declarat MSG ca fiind sigur numai în cazul unei utilizări limitate și a avertizat publicul american asupra efectelor secundare potențiale legate de creșterea consumului de MSG (Kazmi et al., 2017). Autoritatea Europeană for Siguranța alimentelor a recomandat o doză de ingestie maxim admisibilă (ADI) de 30 mg/kg greutate corporală pe zi, exprimată ca acid glutamic, pentru aditivi E 620–625, și a constatat că există în numeroase zone situații în care nu numai că se depășește ADI,

dar se depășesc chiar dozele zilnic ingerate considerate ca având efecte negative (Mortensen et al., 2017).

44

Cauza principală a efectelor secundare ale MSG sunt datorate faptului că acidul glutamic este unul din puținii **aminoacizii funcționali** – nu are numai rol plastic, de component al proteinelor, ci și rol de factor-semnal intercelular, inclusiv rol de mediator sinaptic. Semnalizarea inter-celulară prin glutamat activează două tipuri de receptori, receptorii metabotropici (mGluRs), asociați mesagerilor secunzi intracelulari de tip proteine G (proteine care leagă nucleotide guanidinice), și receptorii de glutamat ionotropici (iGluRs), asociați semnalizării intracelular prin ionii de calciu (Willard & Koochekpour, 2013). Glutamatul / MSG funcționează ca factor semnal și de-a lungul sistemului digestiv. În stomac, de exemplu, au fost puși în evidență ambele categorii de receptori de glutamat, ionotropici și metabotropici (Burrin & Stoll, 2009), glutamatul fiind singurul aminoacid care poate stimula nervul gastric vagal. Disponibilitatea imediată a glutamatului din MSG afectează nu numai funcționarea sistemului digestiv, ci și homeostazia glutamatului la nivelul întregului organism, inclusiv a creierului (Onaolapo & Onaolapo, 2020).

Pentru a proteja consumatorii și a reduce efectele negative ale glutamatului de sodiu au fost propuse o serie de compuși alternativi, care au gust *umami*, dar nu au efecte secundare negative. Cele mai eficiente s-au dovedit a fi peptidele *umami* (Zhang et al., 2017, Zhang et al., 2019a), peptide care se pot obține prin hidroliza enzimatică a diferitelor tipuri de proteine. Aceste peptide, deși sunt bogate în acid glutamic și aspartic, nu au efectele negative ale MSG, pentru că: (i) sunt mai active decât MSG în activarea receptorilor umami T1R1/T1R3 (Zhang et al., 2019a), nu acționează asupra receptorilor metabotropici (mGluRs) și ionotropici ionotropici (iGluRs) ai glutamatului (Nunez-Salces et al., 2020) și au o biodisponibilitate mai redusă a glutamatului – care se eliberează numai absorbția și după hidroliza peptidelor umami care-i conțin (Wang et al., 2020).

Sunt cunoscute o serie de procedee prin care se obțin astfel de peptide *umami*. Cererea de brevet CN111557430A prezintă peptide umami separate din sosul de pește, condiment care nu este foarte popular în Europa. Brevetul US10834946 B2 revendică o compoziție care include o peptidă care conține acid piroglutamic, și care conferă un gust sărat sau un gust *umami* produselor alimentare în care este inclusă. Acidul piroglutamic hidrolizează în organism generând acid glutamic / monoglutamat de sodiu.

În afara peptidelor *umami*, alte tipuri de peptide, peptidele *kokumi* sunt considerate a fi potențiale alternative la MSG. Gustul *kokumi*, respectiv "gustul bogat", implică o senzație de gust de o intensitate foarte puternică și care se menține pe o

46

perioadă îndelungată. Termenii științifici care se folosesc sunt de "continuitate prelungită", "densitate" și "consistența" gustului (Rhyu et al., 2020) Gustul *kokumi* a fost pus în evidență pentru prima dată într-un extract apos de usturoi într-o soluție *umami* (Ueda et al., 1990). Cei mai activi compuși *kokumi* sunt peptide γ -glutamil, inclusiv glutatationul redus, γ -Glu-Cys-Gly – GSH (Yang et al., 2021, Li et al., 2020). Peptidele care suferit o reacție Maillard (MRP) au și ele un gust *kokumi* (Zhang et al., 2019b, Kang et al., 2019). Reacția Maillard este o reacție dintre grupările carbonil ale diferitelor zaharuri și grupările amino ale aminoacizilor / peptidelor (Murata, 2021), care duc la formarea unor compuși implicați în gustul și aroma produselor tratate termic (Zhang et al., 2018, Kang et al., 2019) și a celor care au trecut prin procese de fermentație lentă (Diez-Simon et al., 2020, Qiu et al., 2020).

Peptidele *umami* și peptidele *kokumi* se pot forma și din drojdie, care devine și o sursă compuși umami alternativi MSG, nu numai o sursă de (ribo)nucleotide. Pentru producerea de extracte de drojdie utilizate ca aditivi alimentari potențiatori de gust este însă preferată drojdia obținută prin cultivare aerobă (așa numita în limbaj curent drojdie de panificație), și nu drojdia epuizată, subprodus de la fabricarea berii.

În cursul procesului de fabricare a berii, în paralel cu fermentarea alcoolică a zaharurilor are loc și un proces de multiplicare a celulelor de drojdie. Drojdia de bere epuizată se depune la sfârșitul procesului de maturare la rece a berii ("*laggering cellar yeast*"). Această drojdie se acumulează în cantități care variază între 0,5 și 0,9 kg de drojdie presată la 1 hectolitru de bere (Jacob et al., 2019). Considerând un nivel de producție minimă de cel puțin 15 milioane hl bere (Dobre-Baron, 2012), în România se produc peste 7500 tone de drojdie de bere epuizată, care este foarte puțin valorificată. Și la nivel mondial drojdia de bere epuizată este un produs care este sub-utilizat, în pofida valorii sale nutritive superioare (Jaeger et al., 2020).

Principala cauză pentru utilizarea redusă a drojdiei epuizate, subprodus de la fabricarea berii, pentru fabricarea de aditivi alimentari este gustul amar pronunțat. Substanțe amare provenite din hamei, respectiv izo- α - acizii (cum ar fi humulonele și izo-humulonele), taninurile și rășinile, de adsorb pe pereții celulelor de drojdie în timpul fermentației (Shotipruk et al., 2005). S-a demonstrat că acești compuși responsabili pentru gustul amar pot fi eliminați prin spălare cu solvenți alcalini sau organici înainte de procesului de extracție a drojdiei (Nand, 1987). Deși sunt cunoscute de peste 30 ani, aceste metode de reducere a gustului amar nu s-au aplicat pe scară largă pentru că nu sunt rentabile, pentru că necesită cantități foarte mari de apă pentru eliminarea compușilor responsabili de gustul amar, generând costuri suplimentare pentru tratarea apei uzate.

45

Întrucât substanțele responsabile pentru gustul amar se adsorb preponderent de pereții celulari, a fost investigat un procedeu combinat, de liză celulară prin omogenizare la înaltă presiune, urmat de separare prin microfiltrare a pereților celulari. S-a constatat că, deși gustul amar a fost parțial înlăturat prin separarea pereților celulari de extract, această separare nu a fost totală, întrucât procesul de spargere a celulelor prin liză celulară la înaltă presiune a determinat și o desorbție parțială și o solubilizare în extract a compușilor responsabili de gustul amar de pe pereții de drojdie (Shotipruk et al., 2005).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a dezvolta un procedeu prin care să se obțină un hidrolizat de drojdie epuizată, subprodus de la fabricarea berii, în care compușii amari să rămână fixați pe componentele pereților celulari, fără a mai afecta caracteristicile organoleptice ale extractului de drojdie.

Este un alt obiect al acestei invenții de a dezvolta un procedeu prin care să se obțină un hidrolizat de drojdie epuizată, subprodus de la fabricarea berii, în care să se formeze un nivel ridicat de peptide umami și în care să se mențină nivelul de glutatation redus.

Este un alt obiect al acestei invenții de a se obține din hidrolizatul de drojdie de bere epuizată un produs aditiv alimentar potențiator de gust în care să regăsească, în afară de peptide *umami* și glutatation redus și compuși *kokumi* formați prin reacție Maillard.

Este un alt obiect al acestei invenții de a se obține un obține din hidrolizatul de drojdie de bere epuizată un produs aditivi furajer, în care capacitatea de adsorbție a micotoxinelor de către mano-oligozaharide și β -glucan să fie asociată efectului antibacterii enterotoxigene exercitat de componente bioactive din hamei, respectiv izo- α -acizii (cum ar fi humulonele și izo-humulonele), taninuri și rășini.

Procedeu de obținere a hidrolizatului de drojdie epuizată, subprodus de la fabricarea berii, conform invenției, este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Normalizarea la o concentrație de 15%-20% substanță uscată a drojdiei de bere epuizată de la fabricarea berii, aducerea pH la valoarea 5,5 unități pH și barbotarea timp de 5 min cu azot a amestecului, 1 litru de azot pe litru de mediu de reacție pe minut;
- ✓ Tratarea cu un amestec de enzime care conține endo- și exo (1,3)-beta-D-glucanaze și endo-chitinază, în raport de 75-100 unități beta-glucanazice și 320-400 unități endo-chitinază la 1 kg de drojdie substanță uscată, timp de 4 ore la temperatura de 50°C;
- ✓ Lizarea celulară prin omogenizare la înaltă presiune, 3 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 36-40 unități Anson endo-proteaze și de 5000 - 6000 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 tratarea cu peptidglutaminază, în raport de 100-150 unități peptidglutaminazice la 1 kg de drojdie, la 60°C, timp de 8 ore.

Procedeul de utilizare a hidrolizatului de drojdie obținut conform procedurii de mai sus, pentru obținerea extractului de drojdie și a pereților celulari de drojdie, este alcătuit din următoarele etape

✓ Separarea pereților celulari și a extractului de drojdie din hidrolizatului de drojdie pe un decantor centrifugal, la o forță centrifugală relativă de 3200xg – 3330xg pentru 10 min, și colectarea separată a supernatantului, extract de drojdie, și a sedimentului, pereți celulari de drojdie.

✓ Uscarea extractului de drojdie separat prin centrifugare pe un uscător cu două valțuri, la o turație de 1 rotație pe minut și la o presiune a aburului de alimentare de 440 kPa, corespunzând unei temperaturi a valțului de 150°C, urmată de raclarea materialului uscat de pe suprafața valțurilor cu 2 cuțite răzuitoare, câte unul pe fiecare valț;

✓ Uscarea pereților celulari de drojdie separați prin centrifugare pe un uscător cu două valțuri, la o turație de 3 rotații pe minut și la o presiune a aburului de alimentare de 370 kPa, corespunzând unei temperaturi a valțului de 140°C, urmată de raclarea materialului uscat de pe suprafața valțurilor cu 2 cuțite răzuitoare, câte unul pe fiecare valț.

Produsul aditiv alimentar obținut din extractul de drojdie separat din hidrolizatului de drojdie este o pulbere de culoare care variază de la bej crem la bej intens, cu un conținut în peptide umami care determină o intensitate a gustului în panelul de degustători de peste 2,5 pe o scară de la 0, fără gust, la 5, gust foarte intens, cu un conținut de glutation redus de cel puțin 10 mg/g de substanță uscată și un conținut de peptide reacționate Maillard de cel puțin 5 mg/g.

Produsul aditiv furajer obținut din pereții celulari separați din hidrolizatului de drojdie este o pulbere, de culoare ce variază de la alb crem la bej deschis, care are o capacitate de legare aflatoxină B1 de 5 mg/g și care prezintă o activitate inhibitorie de cel puțin 50% față de bacteriile enterotoxigene *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* și *Escherichia coli*.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Reducerea cantității de compuși amari care sunt detașați de pereții celulari de drojdie în timpul procesului de liză celulară prin omogenizare la presiune pentru că liza celulară se face la o presiune mai redusă datorită fragilizării pereților celulari ca urmare a tratamentului combinat cu endo- și exo (1,3)-beta-D-glucanaze și endo-chitinază;
- ✓ Menținerea nivelului de glutatión redus, care este ridicat în drojdia de fermentație, datorită operării într-o atmosferă cu conținut redus de oxigen;
- ✓ Creșterea cantității de peptide *umami* formate în timpul hidrolizei datorită creșterii conținutului de peptide cu resturi glutamil, formate ca urmare a tratamentului cu peptidglutaminază;
- ✓ Formarea de peptide reacționate Maillard datorită uscării pe valț un timp mai îndelungat și la o temperatură mai ridicată;
- ✓ Fixarea pe pereții celulari a componentelor anti-microbiene din hamei, favorizată de formarea unor situsuri suplimentare de adsorbție ca urmare a eliberării mano(oligo)zaharidelor din manoproteine.

În continuare sunt prezentate exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplul 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 15% refractometric (de ex. 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. Se închide etanș capacul și se barbotează suspensia de drojdie timp de 5 min cu azot gazos, în raport 1 litru de azot pe litru de suspensie / mediu de reacție pe minut.

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 75 unități beta-glucanazice și 320 unități endo-chitinază la 1 kg de drojdie substanță uscată, timp de 4 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. 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, care a fost inițial dezvoltat pentru maturarea vinului (Uzuner & Cekmecelioglu, 2019).

Suspensia cu drojii al căror perete a fost fragilizat prin tratamentul enzimatic cu β -glucanaze și chitinaze, se lizează cu ajutorul unui omogenizator cu pistoane, ca de ex. Pony 2006 Lab Homogenizer (Gea, Düsseldorf, Germania), realizându-se 3 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 foarte bună liză celulară, concomitent cu menținerea compușilor amari din hamei pe pereții celulari.

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 36 unități Anson endo-proteaze și de 5000 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). Enzima 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. Flavourzyme[®] (Novozymes, Bagsværd), un amestec de peptidaze, aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-peptidaze produs de *Aspergillus oryzae* (Merz et al., 2015). 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. Orice fel de amestec de enzime cu aceleași caracteristici se poate folosi.

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. Hidrolizatul enzimatic se tratează cu peptidglutaminază, în raport de 150 unități peptidglutaminazice la 1 kg de drojdie, la 60°C, timp de 8 ore. Exemple de enzime comerciale care se pot folosi sunt:

✓ Protana[®] UBoost (Novozymes, Bagsværd), care este un amestec de peptidil-glutaminază (CE 3.5.1.43; Peptidglutaminaza I) specifică glutaminei substituite din poziția α -amino și protein-glutaminaza (EC 3.5.1.44; Peptidglutaminaza II) specifică substituite în poziția carboxil sau în poziția α -amino și carboxil (Brevet SUA 6,036,983);

✓ Glutaminase (Amano Enzyme Inc., Nagoya, Japan), care este o protein-glutaminază (EC 3.5.1.44) produsă de *Chryseobacterium proteolyticum* (Yamaguchi et al., 2001);

✓ Glutaminase (Nestlé, Vevey, Elveția), care este o protein-glutaminază (EC 3.5.1.44) produsă *Lactobacillus rhamnosus* CNCM 1-2433 (Brevet EP1427293B1).

Orice fel de amestec de enzime cu aceleași caracteristici de deminare a resturilor de glutamine din peptide se poate folosi. O unitate (U) (peptid)glutaminazică este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care eliberează 1 μmol glutamat eliberat pe minut dintr-o soluție de 60 mM L-glutamină în tampon fosfat 50 mM.

În continuare se separă pereții celulari de extractul de drojdie pe un separator centrifugal, de exemplu Lemitec MD 80 Decanter Centrifuge (Lemitec, Berlin, Germania) la o forță centrifugală relativă de 5000xg pentru 10 min, și colectarea separată a supernatantului, extract de drojdie, și a sedimentului, pereți celulari de drojdie.

Se procedează la uscarea extractului de drojdie separat prin centrifugare, pe un uscător cu două valțuri (de exemplu Lab Dryer, Simon Dryer, Nottingham, Marea Britanie), la o turație de 1 rotație pe minut și la o presiune a aburului de alimentare de 440 kPa, corespunzând unei temperaturi a valțului de 150°C, urmată de raclarea materialului uscat de pe suprafața valțurilor cu 2 cuțite răzuitoare, câte unul pe fiecare valț. Viteza de rotație lentă și temperatura mai ridicată a valțului sunt destinate favorizării formării de peptide reacționate Maillard.

Pereții celulari de drojdie separați prin centrifugare se usucă tot pe un uscător cu două valțuri similar, operarea făcându-se însă la o turație de 3 rotații pe minut și la o presiune a aburului de alimentare de 370 kPa, corespunzând unei temperaturi a valțului de 140°C, urmată de raclarea materialului uscat de pe suprafața valțurilor cu 2 cuțite răzuitoare, câte unul pe fiecare valț.

În urma procesului de uscare pe valț se obține un produs aditiv alimentar care este pulbere de culoare care variază de la bej crem la bej intens. Acest produs, supus evaluării de către un panel de degustători, determină o intensitate a gustului de peste 2,5 pe o scară de la 0, fără gust, la 5, gust foarte intens (Kranz et al., 2018).

În produsul uscat pe valț se determină glutatiionul redus prin utilizarea metodei spectrofotometrice cu aloxan (Liu et al., 2004) și se determină cu un conținut de glutatiion redus de cel puțin 10 mg/g de substanță uscată. Peptidele reacționate Maillard se determină cu un spectrofotometru UV-vis, operat în modul reflectanță și folosind un standard iluminat D65 - ca de ex. modelul UltraScan, Hunterlab, Reston, VA, SUA). Cantitatea de peptide Maillard formată în produs este de cel puțin 5 mg/g.

Produsul aditiv furajer obținut peretii celulari separați din hidrolizatul de drojdie este o pulbere, de culoare ce variază de la alb crem la bej. În produs se determină capacitatea de legare a micotoxinelor prin metoda incubării în tampon în care s-a solubilizat în prealabil aflatoxina B1 (Faucet-Marquis et al., 2014) și se determină o capacitate de aflatoxină B1 de cel puțin 5 mg/g.

În produsul aditiv furajer pe bază de pereți celulari de drojdie se determină o activitate inhibitorie de cel puțin 50% față de bacteriile enterotoxigene *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* și *Escherichia coli* prin metoda cultural (Kramer et al., 2015). Produsul prezintă o activitate inhibitorie de cel puțin 50% față de bacteriile enterotoxigene, cel mai probabil datorită compușilor proveniți din hamei, respectiv izo- α - acizii (cum ar fi humulonele și izo-humulonele), taninurile și rășinile, care sunt cunoscuți ca având activitatea anti-microbiană (Kramer et al., 2015, Bartmańska et al., 2018).

Exemplu 2. Se lucrează la fel ca în exemplu 1, cu următoarele diferențe: normalizarea drojdiei se face la o concentrație de 20% substanță uscată; tratarea cu un amestec de enzime care conține endo- și exo (1,3)-beta-D-glucanaze și endo-chitinază, este în raport de 100 unități beta-glucanazice și 400 unități endo-chitinază la 1 kg de drojdie substanță uscată; hidroliza cu endo- și exo-proteaze microbiene este în raport de 40 unități Anson endo-proteaze și de 6000 unități leucin amino-peptidazice la 1 kg de drojdie, la 1 kg drojdie; deamidarea se face prin tratare cu peptidglutaminază, în raport de 150 unități peptidglutaminazice la 1 kg de drojdie.

Exemplu 3. 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*.

Revendicări

1. Procedul obținere a hidrolizatului de drojdie epuizată, subprodus de la fabricarea berii, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: normalizarea la o concentrație de 15%-20% substanță uscată a drojdiei de bere epuizată de la fabricarea berii, aducerea pH la valoarea 5,5 unități pH și barbotarea timp de 5 min cu azot a amestecului, 1 litru de azot pe litru de mediu de reacție pe minut; tratarea cu un amestec de enzime care conține endo- și exo (1,3)-beta-D-glucanaze și endo-chitinază, în raport de 75-100 unități beta-glucanazice și 320-400 unități endo-chitinază la 1 kg de drojdie substanță uscată, timp de 4 ore la temperatura de 50°C; lizarea celulară prin omogenizare la înaltă presiune, 3 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 36-40 unități Anson endo-proteaze și de 5000 - 6000 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 tratarea cu peptidglutaminază, în raport de 100-150 unități peptidglutaminazice la 1 kg de drojdie, la 60°C, timp de 8 ore.

2. Procedul de utilizare a hidrolizatului de drojdie obținut conform revendicări 1, **caracterizat prin aceea că**, în scopul obținerii extractului de drojdie și a pereților celulari de drojdie, este alcătuit din următoarele etape: separarea pereților celulari și a extractului de drojdie din hidrolizatului de drojdie pe un decantor centrifugal, la o forță centrifugală relativă de 3200xg – 3330xg pentru 10 min, și colectarea separată a supernatantului, extract de drojdie, și a sedimentului, pereți celulari de drojdie; uscarea extractului de drojdie separat prin centrifugare pe un uscător cu două valțuri, la o turație de 1 rotație pe minut și la o presiune a aburului de alimentare de 440 kPa, corespunzând unei temperaturi a valțului de 150°C, urmată de raclarea materialului uscat de pe suprafața valțurilor cu 2 cuțite răzuitoare, câte unul pe fiecare valț; uscarea pereților celulari de drojdie separați prin centrifugare pe un uscător cu două valțuri, la o turație de 3 rotații pe minut și la o presiune a aburului de alimentare de 370 kPa, corespunzând unei temperaturi a valțului de 140°C, urmată de raclarea materialului uscat de pe suprafața valțurilor cu 2 cuțite răzuitoare, câte unul pe fiecare valț.

3. Produs aditiv alimentar obținut din extractul de drojdie separat din hidrolizatul de drojdie conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că** este o pulbere de culoare care variază de la bej crem la bej intens, cu un conținut în peptide umami care determină o intensitate a gustului în panelul de degustători de peste 2,5 pe o scară de la 0, fără gust, la 5, gust foarte intens, cu un conținut de glutatation redus de cel puțin 10 mg/g de substanță uscată și un conținut de peptide reacționate Maillard de cel puțin 5 mg/g.

4. Produsul aditiv furajer obținut din pereții celulari separați din hidrolizatul de drojdie conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că** este o pulbere, de culoare ce variază de la alb crem la bej deschis, care are o capacitate de legare aflatoxină B1 de 5 mg/g și care prezintă o activitate inhibitorie de cel puțin 50% față de bacteriile enterotoxigene *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* și *Escherichia coli*.