



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00799

(22) Data de depozit: 07/12/2022

(41) Data publicării cererii:  
28/06/2024 BOPI nr. 6/2024

(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 IȘALNIȚA, COMUNA IȘALNIȚA,  
DJ, RO

(72) Inventatori:

• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D7, 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;  
• DEȘLIU-AVRAM MĂLINA, STR.GĂRLENI  
NR.4, BL.C85, SC.A, ET.6, AP.40,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **COMPOZIȚIE PE BAZĂ DE PEREȚI CELULARI DE DROJDIE  
DE BERE EPUIZATĂ ȘI PROCEDU PENTRU OBTINEREA  
ACESTEIA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții de biostimulant destinată aplicării împreună cu fertilizanți foliari pentru nutriția, protecția și/sau stimularea culturilor agricole/horticole. Procedeu, conform invenției, constă în 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-glucanaze și endo-chitinază, lizarea celulară prin ultrasonare, separarea pereților celulari și a extractului de drojdie din hidrolizat de drojdie pe un

decantor centrifugal, hidroliza enzimatică a pereților celulari prin tratare cu endo- și exo-proteaze microbiene și glutaminază, incubare pentru formarea compușilor de reacție Maillard și uscare prin pulverizare a amestecului, rezultând o compoziție conținând 24,1...24,7% manoproteine, 17,2...18,6% β-glucon, prezintă o dispersabilitate de 7,5...8,4% în soluții cu o tărâie ionică de 0,5 mol/l și un indice de brunificare de 248,2...250,3.

Revendicări: 2

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



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. ....	a 2022 00799
Data depozit .....	07-12-2022

27

## COMPOZIȚIE PE BAZĂ DE PEREȚI CELULARI DE DROJDIE DE BERE EPUIZATĂ ȘI PROCEDEU PENTRU OBTINEREA ACESTEIA

Prezenta invenție se referă la o compoziție pe bază de pereți de drojdie recuperată de la fabricarea berii, destinată aplicării foliare ca biostimulant pentru plantele cultivate împreună cu fertilizanți foliari, la un procedeu de obținere a respectivei compoziții de pereți celulari, ca și la o instalație în care să se aplice procedeul pentru obținerea respectivei compoziții. Invenția este destinată aplicării în industria (bio)produselor destinate nutriției 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 minerali (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 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). O problemă practică importantă este cea a compatibilității produselor destinate aplicării foliare, care are două avantaje practice majore: (i) reducerea costurilor de combustibili și forță de muncă necesare aplicării tratamentelor și (ii) potențarea reciprocă a acțiunii produselor.

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 deșeurii 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 organic. Nu sunt prezentate soluții pentru compatibilizarea cu fertilizanți foliari care au tărâie ionică ridicată și/sau includ complexanți. Cererea de brevet WO2006049201A1 prezintă un digestat de pereți celulari care este aplicat pentru inducerea sistemului de apărare din plante. Nici în acest caz nu sunt prezentate soluții pentru creșterea stabilității produsului în compoziții de fertilizanți foliari.

Cererea de brevet RO135795 A0 se referă la o compoziție de biostimulant pentru plante pentru aplicare foliară 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. Procedul, 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)- $\beta$ -D-glucozaze și endo-chitinază, adăugarea de tribloc copolimer cu structură amfifilă, 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 polifenoloxidazei pe plante de test de *Arabidopsis thaliana* de min. 140% față de martor. Compoziția rezultată are o compatibilitate redusă cu fertilizanții foliari. Fertilizanții foliari cu tărâie ionică ridicată destabilizează micellele realizate de manoprotejile din peretele de drojdie împreună cu poloxamerul și determină formarea de precipitate.

Brevetul FR2894771 B1 protejează 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 fenilalaninamoniac-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  $\beta$ -glucan din peretele celular al drojdiilor (Li, 2020, *Langmuir*, 36, 6169-6177). Nici în cazul acestei compoziții nu sunt descrise posibilități de utilizare împreună cu fertilizantii foliari.

Oligomerii de chitină și de  $\beta$ -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 revendică aplicarea unei compoziții sinergice de drojdie inactivă și/sau derivați de drojdie și cel puțin o sursă de azot. Compoziția nu este destinată utilizării foliare, ci pentru pe sol, rădăcini, sau ca tratament al seminței. 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 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). Compoziția este destinată utilizării ca atare ca biostimulant pentru plante și biofertilizant și nu este compatibilă cu fertilizantii foliari.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție pe bază de pereți celulari de drojdie epuizată de la fabricarea berii care să aibă o bună compatibilitate cu fertilizantii foliari minerali. Este un alt obiect al acestei invenții realizarea unui procedeu cu un număr redus de etape prin care să se obțină compoziția conform invenției.

Autorii au descoperit faptul că reacțiile Maillard dintre componentele peretelui celular al drojdiilor crește semnificativ solubilitatea compoziției rezultate în soluții cu tărie ionică ridicată.

Compoziția de pereți celulari de drojdie este alcătuită din 24,1- 24,7% manoproteine, 17,2- 18,6 %  $\beta$ -glucan, are o dispersibilitate 7,5-8,4% în soluții cu o tărie ionică de 0,5 moli la litru, și un indice de brunificare cuprins între 248,2 – 250,3.

Procedeul de obținere a compoziției de pereți celulari de drojdie de mai sus este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Normalizarea la o concentrație de 18% 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 55°C;
- ✓ Lizarea celulară prin ultrasonare în flux, aplicându-se o energie de 30 KJ.L<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>;
- ✓ 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.
- ✓ Preluarea pereților celulari, aducerea pH la valoarea 7.0 și hidroliza enzimatică prin tratare cu endo- și exo-proteaze microbiene, în raport de 15 unități Anson endo-proteaze și de 2750 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 și tratarea cu glutaminază, în raport de 2 unități glutaminazice la 1 kg de substanță uscată, la 60°C, timp de 4 ore;
- ✓ Încălzirea amestecului la 80°C timp de 4 ore pentru inactivarea glutaminazei și perfectarea reacției Maillard;
- ✓ Uscarea prin pulverizare la o temperatură de intrare de 140°C și o temperatură de ieșire de 85-90°C.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Optimizează formarea compușilor de reacție Maillard, pentru că eliberează semnificative oligozaharide și peptide ca urmare a tratamentelor cu endo- și exo (1,3)-beta-D-glucanaze și endo-chitinază, endo- și exo-proteaze, glutaminaze;
- Valorifică drojdia de bere reziduală de la fabricarea berii cu formarea unei compoziții de pereți celulari de drojdie care au o capacitate ridicată de suspo-emulsionare în soluții cu tărie ionică ridicată ;

- Potențează acțiunea fertilizanților foliari pentru că facilitează umectarea frunzelor și un transport facilitat prin barierele de permeabilitate hidrofob-hidrofile.

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 18% 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).

Suspensia de drojdii al căror perete a fost semnificativ fragilizat prin tratamentul enzimatic cu β-glucanaze și chitinaze, se lizează prin ultrasonare în flux, folosind un echipament UIP2000hdT-230 (Hielscher Ultrasonic, Teltow, Germania), prevăzut cu o celulă în flux. Se aplică o energie de 30 KJ.L<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, ceea ce înseamnă un debit de 240 litri pe oră. 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.

Pereții celulari se aduc într-un vas de reacție de inox de 150 litri, prevăzut cu agitare, capac și manta de termostatare, se aduce concentrația la 20% substanță uscată prin diluare cu apă distilată, se aduce 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. Se adaugă 2 ml de glutaminază, Protana® UBoost (Novozymes), produsă de *L. rhamnosus* la 100 grame de substanță uscată. Se menține la 60°C, timp de 4 ore. Activitatea glutaminazei folosite este de 0,1 unități (U) glutaminazice per ml. O unitate (U) 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. Orice fel de alte enzime cu aceleași caracteristici se pot folosi. Se încălzește amestecul la 80°C timp de 4 ore, pentru inactivarea glutaminazei și perfectarea reacției Maillard dintre carbohidrații și peptidele formate din pereții celulari de drojdie care s-au format ca urmare a hidrolizei enzimatice.

Amestecul complex rezultat 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: conținutul de manoproteine și  $\beta$ -glucan, după fracționare prin extracție specifică, precipitare selectivă și hidroliză cu Zymolase® (Bzducha-Wróbel et al. 2013, *European Food Research and Technology*, 237(4), 489-499.) Se determină dispersabilitatea în soluție etalon de fertilizant foliar cu tăria ionică de 0,5 moli/litru, (Grzmil și Kic, 2002, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 41(2), 139-144.), Indicele de brunificare ca fiind raportul dintre reflectanța de la 570 și 650nm (Hirschler, R., *Whiteness, Yellowness, and Browning in Food Colorimetry: A Critical Review, Color in Food*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA).

Compoziția de pereți celulari de drojdie rezultată este alcătuită 24,1% manoproteine, 18,6%  $\beta$ -glucan, are o dispersibilitate 8,4% în soluții cu o tărie ionică de 0,5 moli la litru, și un indice de brunificare de 248,2.

*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*.

Compoziția de pereți celulari de drojdie rezultată este alcătuită 24,7% manoproteine, 17,2%  $\beta$ -glucan, are o dispersibilitate 7,5% în soluții cu o tărie ionică de 0,5 moli la litru, și un indice de brunificare de 250,3.



## Revendicări

1. Compoziția de pereți celulari de drojdie conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuită din 24,1- 24,7% manoproteine, 17,2- 18,6 %  $\beta$ -glucan, are o dispersabilitate 7,5-8,4% în soluții cu o tărie ionică de 0,5 moli la litru, și un indice de brunificare cuprins între 248,2 – 250,3.
2. Procedeu de obținere a compoziției conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: normalizarea la o concentrație de 18% 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 55°C; lizarea celulară prin ultrasonare în flux, aplicându-se o energie de 30 KJ.L<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>; separarea pereților celulari și a extractului de drojdie din hidrolizatul 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; preluarea pereților celulari, aducerea pH la valoarea 7.0 și hidroliza enzimatică prin tratare cu endo- și exo-proteaze microbiene, în raport de 15 unități Anson endo-proteaze și de 2750 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 și tratarea cu glutaminază, în raport de 2 unități glutaminazice la 1 kg de substanță uscată, la 60°C, timp de 4 ore; încălzirea amestecului la 80°C timp de 4 ore pentru inactivarea glutaminazei și perfectarea reacției Maillard; uscarea prin pulverizare la o temperatură de intrare de 140°C și o temperatură de ieșire de 85-90°C.