



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00781

(22) Data de depozit: 25/11/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2022 BOPI nr. 5/2022

(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,  
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;

• BALA IOANA, STR.POIANA CU ALUNI,  
NR.1, BL.4, SC.4, ET.4, AP.60, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• BĂRBIERU OTILIA GABRIELA,  
STR.GHEORGHE DOJA, NR.5, BL.7A, SC.4,  
ET.1, AP.62, GALAȚI, GL, RO;  
• DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI  
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• TRITEAN NAOMI, STR.PERFEȚIONĂRII,  
NR.11, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE DE BIOSTIMULANT PENTRU PLANTE  
DIN SUBPRODUSE DE PEȘTE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui hidrolizat proteic de pește, cu proprietăți de biostimulant pentru plante. Procedeu, conform invenției, constă în extracția peptidelor bioactive din subproduse de pește, prin tratamente de decalcifiere și delipidizare a țesutului, hidroliză enzimatică cu una sau două enzime succesiv, hidroliza grupărilor glutaminice cu glutami-

nază, urmată de ultrafiltrare tangențială și uscare prin atomizare, rezultând o compoziție de peptide condiționată sub formă de pulbere, având un conținut de proteină de peste 85%, până la 2% lipide, respectiv, 1,5% cenușă și o masă moleculară de 3000 Da.

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).



## COMPOZIȚIE DE BIOSTIMULANT PENTRU PLANTE DIN SUBPRODUSE DE PEȘTE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la un hidrolizat proteic, compus din polipeptide de gelatină cu masa moleculară mai mare de 5 kDa, cu proprietăți de biostimulant pentru plante, izolat din subproduse de pește, oase, piele, carne, viscere, și la un procedeu de utilizare al acestuia pentru tratarea semințelor și al granulelor de fertilizant. Invenția are aplicabilitate în domeniul industriei produselor agrochimice, fertilizanți cu eliberare controlată și biostimulanți pentru plante.

Sunt cunoscute o serie întreagă de compoziții pe bază de gelatină cu efect de biostimulant pentru plante. Cererea de brevet US2014087942 A1 descrie compoziții pentru promovarea creșterii plantelor care utilizează gelatină denaturată ireversibil prin tratament termic și/sau enzimatic. Într-unul din exemplele de realizare, compozițiile pe bază de gelatină sunt utilizate pentru tratamentul semințelor. În alt exemplu de realizare compozițiile sunt destinate protejării embrionilor de plante și a altor surse de propagare a plantelor. Gelatina este utilizată inclusiv sub formă de capsule operculate pentru acoperirea materialului de propagare a plantelor.

Cererea de brevet EP3170393 A1 se referă la un produs pe baza de polidispersii de gelatină provenită din piele, polipeptide cu masa moleculară de 4-6 kDa, care este utilizat pentru tratarea semințelor de cereale în vederea stimulării creșterii acestora, și la un procedeu de obținere a acestora. Faza de extracție a gelatinei se desfășoară sub agitare continuă, la temperatura de 70...85°C, pe o durată de 3...5 ore. Pentru faza a doua a procesului, respectiv hidroliza enzimatică, se aduce pH-ul la o valoare cuprinsă în intervalul 8,5-9,0, și, sub agitare continuă, se adaugă Alcalase 2,4L, într-o cantitate echivalentă pentru un raport de 2,5...4,5 unități enzimatică/gram azot total. Se menține la temperatura de 63 °C ± 2°C pe o durată de 3...5 ore, sub agitare continuă, după care se încălzește la 80...90°C pentru dezactivarea enzimei. Dispersia caldă rezultată după hidroliza enzimatică se filtrează sub vid pe un filtru Nuce cu un material filtrant cu porozitatea de 2-4 μm. Filtratul care este format din hidrolizatul de collagen cu o masa moleculară medie de 4-6 kDa și este utilizat pentru obținerea polidispersiilor de collagen destinate tratării semințelor de cereale.

Cererea de brevet US2014100111 A1 prezintă o compoziție de acoperire a semințelor biodegradabilă, care include o formulare de hidrogel pe bază de gelatină

în combinație cu o polizaharidă sulfată sau nesulfată. Gelatina este de origine animală, porcină sau bovină, în timp ce polizaharida este de preferință un derivat de celuloză cum ar fi sulfat de celuloză, sulfat de dextran, chitosan sulfat, amidon sulfat și amestecuri ale acestora. Compoziția de acoperire a semințelor poate cuprinde, de asemenea, un agent de modificare a reologiei, care cuprinde argile, agenți desicanti, silicagel.

Un dezavantaj al acestor compoziții este dat de rata de degradare rapidă în mediu, care nu protejează suficient sămânța / plantula rezultată din sămânță suficient timp împotriva stresurilor biotice și abiotice și nu asigură o promovare de durată a modificărilor fiziologice favorabile unei asimilări rapide a nutrienților.

Un alt dezavantaj al acestor compoziții este dat de originea lor din animale terestre, care generează potențiale riscuri de contaminare cu prioni și alți agenți infecțioși, și care poate determina probleme de acceptanță socială – din considerente religioase și/sau etice.

În ultima perioadă se constată un interes crescut privind obținerea de hidrolizate proteice din subproduse rezultate la prelucrarea peștilor. Aceste produse au o serie de avantaje – nu sunt sursă de prioni și alți agenți infecțioși, nu au probleme de acceptanță socială și au unele caracteristici tehnologice superioare, cum ar fi vâscozitatea mai redusă (Jafari et al. 2020, *Polymers*, 12, 2230). Subprodusele rezultate în urma prelucrării peștilor sunt resurse cu valoare comercială neglijabilă și reprezintă o cauză majoră de poluare a mediului. În scopul valorificării acestor bioresurse s-au dezvoltat procedee de hidroliză pentru a converti proteinele de pește din materialele neutilizate (cap, piele, viscere, oase, etc) în forme acceptate de piață. Majoritatea acestor subproduse sunt produse cu un conținut ridicat de colagen, oase, piele, solzi, iar hidrolizatele rezultate sunt predominant formate din gelatină de pește (Wasswa et al. 2007, *Food Reviews International*, 23(2), 159-174). să fie utilizate ca biostimulanți pentru plante (Madende & Hayes, 2020, *Molecules*, 25(5), 1122).

Tehnologiile enzimatică de recuperare a proteinelor din deșeurile de pește sunt mai eficiente comparativ cu cele chimice, deoarece procesul de hidroliză este mai ușor de controlat, necesitând condiții mai blânde de lucru. De asemenea, utilizarea enzimelor determină un grad semnificativ de hidroliză și asigură formarea de peptide solubile, cu proprietăți funcționale. Sunt cunoscute o serie de procedee enzimatică de obținere a produselor pe bază de peptide extrase din diverse surse de

pește cu aplicații industriale. Astfel, brevetul US6753407 B2 se referă la obținerea de 2 peptide, izolate din branhiile de pește oceanic (biban vărgat hibrid *Morone saxatilis* x *Morone chrysops*, care prezintă proprietăți antimicrobiene – de ex. activitatea bactericidă față de *E coli*. Activitatea anti-microbiană a hidrolizatelor de pește este determinată de prezența unor cantități semnificative de peptide cationice (Lv et al. 2019. *Journal of Functional Foods*, 63, 103581). Aceste peptide cationice nu sunt însă reținute în cantități semnificative atunci când se face separarea polipeptidelor de tip gelatină. (Zamora-Sillero, 2018 *Marine Biotechnology*, 20(2), 118-130).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție de polipeptide din proteine din pește, greutate moleculară mai mare de 5000 Da, care să includă și peptide cationice și polipeptide de tip gelatină, cu proprietăți tehnologice (adezivitate pe sămânță, efect peliculogen) superioare și caracteristici de bioactivitate, respectiv activitate de biostimulare plante și anti-microbiană, ridicate, reproductibile și cu efect de durată.

Compoziția obținută conform invenției, este o pulbere de culoare alb-gălbuie, cu un conținut în peptide cu masa moleculară medie mai mare de 5 kDa de peste 85% și care prezintă următoarele proprietăți bioactive: activitatea antimicrobiană, de inhibare a unor fitopatogeni fungici, de cel puțin 80%, activitate de stimulare a pompei de protoni de cel puțin 30% și de inducere a activității  $\alpha$ -amilazice de cel puțin 50%.

Procedeele de obținere al hidrolizatului proteic de pește, conform invenției, constă în următoarele etape:

- Spălarea, mărunțirea, decalcifierea și delipidizarea subproduselor de pește prin metode cunoscute, urmată de îndepărtarea componentelor glucidice prin tratare cu soluție alcalină de NaOH 0,1 M;
- Hidroliza enzimatică prin tratare cu endo- și exo-proteaze microbiene, dizolvate în prealabil în 6-10 volume tampon fosfat 0,2M, pH 7,0-8,5, în raport de masă enzima: substrat de 1:20-1:60, la 50-70°C, timp de 1-8 ore;
- Inactivarea enzimelor prin încălzirea extractului la 90-100°C, timp de 10-30 min, urmată de răcire și separarea țesutului ne-extras prin centrifugare la 3000...5000 rpm, timp de 30...50 min, ajustarea pH-ului la valoarea 7,0 cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric și tratarea cu glutaminază, în raport de masă enzimă: substrat de 1:50, la 60°C, timp de 4-5 ore;

- Inactivarea glutaminazei prin răcire la 4°C timp de 15 min, urmată de ultrafiltrarea tangențială, prin folosirea unei membrane filtrante cu fibre de polisulfonă, cu limita de excludere a maselor moleculare de 3000 Da,
- concentrarea retentatului rezultat după filtrare la 10...20 % substanță uscată și uscarea prin pulverizare, la 130-145 °C temperatură de intrare și 80°C temperatură de ieșire.

Subprodusele de pește pot fi resturi de piele, oase, carne și viscere, separate sau în amestec inițial, și provin de preferință de la ciprinidele de crescătorie, crap *Cyprinus carpio*, novac, *Arystichtys nobilis*, cteno, *Ctenopharingodon idella*, sânger / fitofag, *Hypophthalmichthys molitrix*.

Enzimele folosite sunt subtilizina A, o serin endo-protează produsă de *Bacillus licheniformis*; un amestec de exo-peptidaze, aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-proteaze produs de *Aspergillus oryzae* și glutaminază produsă de *Lactobacillus rhamnosus*.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- procedeul descris reține peptidele cationice datorită utilizării glutaminazei, care acidifică resturile de glutamină din componența proteinei;
- procedeul descris în prezenta propunere constituie o metodă optimă de obținere a polipeptidelor din subproduse de pește (piele, os, carne, viscere);
- peptidele de pește obținute și testate *in vitro* prezintă proprietăți tehnologice (adezivitate pe sămânță, efect peliculogen) superioare și caracteristici de bioactivitate, respectiv activitate de biostimulare plante și anti-microbiană, ridicate, reproductibile și cu efect de durată;
- procedeul propus realizează o valorificare superioară și eficientă a subproduselor rezultate în procesele de procesare a peștilor și reduce poluarea mediului.

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

*Exemplul 1.* O cantitate de 200 g amestec de oase și resturi de carne de crap, *Cyprinus carpio*, subprodus rezultat la filetarea carpului, se spală cu apă de robinet, în flux continuu, timp de 3 ore, apoi cu apă distilată, timp de 30 min, după care țesutul spălat se mărunțește mecanic cu ajutorul unei mașini electrice de tocat carne cu sită de 3mm. Pentru decalcifiere, țesutul mărunțit se introduce într-un vas de laborator prevăzut cu agitare, peste care se adaugă 2000 ml de soluție HCl 0,2M,

timp de 24 ore, la temperatura camerei, cu agitare ușoară. Soluția de decalcifiere se îndepărtează prin filtrare iar țesutul rezultat se spală intens cu apă în flux continuu, timp de 2 ore și apoi 30 min cu apă distilată. După spălare, peste țesutul decalcifiat și spălat se adaugă 1200 ml amestec acetonă/ apă distilată 1:1 în vederea delipidizării și se agită timp de 12 ore. Țesutul obținut după filtrare prin filtru textil, se spală cu apă în flux continuu, pentru eliminarea urmelor de grăsime și apoi se introduce într-un vas de inox prevăzut cu agitator, în care se adaugă și 200 ml apă distilată rece și se omogenizează timp de 5 min la o turație de 500 rpm.

Separat se prepară 1000 ml soluție NaOH 0,1M care se introduce peste omogenatul preparat mai înainte și se agită la rece timp de 3 ore pentru îndepărtarea componentelor glucidice din structura țesutului. După tratamentul alcalin amestecul se centrifughează la 4000 rpm, timp de 20 min și se îndepărtează supernatantul. Țesutul separat prin centrifugare se spală intens cu apă timp de 2 ore și apoi cu apă distilată 30 min, după care se procesează prin hidroliza enzimatică.

Într-un vas de inox prevăzut cu manta de termostatare se introduce țesutul spălat peste care se adaugă sub agitare 200 ml Tampon fosfat 0,2 M pH 7,0 în care s-au dizolvat în prealabil 0,006 g Flavourzyme® (Novozymes, Bagsværd, Danemarca), un amestec de peptidaze, aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endopeptidaze produs de *Aspergillus oryzae* (Merz et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682-5693). Activitatea amestecului enzimatic folosit este de 500 LAPU/g. O unitate 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.

Hidroliza enzimatică are loc la temperatura de 55°C, timp de 6 ore după care extractul obținut se încălzește la 90°C, timp de 20 min, pentru stoparea reacției enzimatică. Apoi, hidrolizatului se răcește, se centrifughează la 5000 rpm timp de 30 min iar supernatantul obținut se recuperează și se aduce pH-ul la valoarea 7. Se adaugă 2,5 ml de glutaminază, Protana® UBoost (Novozymes), produsă de *L. rhamnosus*. Se menține la 60°C, timp de 5 ore. Activitatea glutaminazei folosite este de 0,1 unități (U) glutaminazice. 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.

Glutaminaza este inhibată prin răcirea vasului la 4°C timp de 15 min. Soluția rezultată se ultrafiltrează prin filtrare tangențială cu ajutorul unei membrane cu fibre de polisulfonă, cu limită de excludere a maselor moleculare de 3000 Da. Se recuperează retentatul, în care se regăsesc polipeptidele cu masă moleculară mai mare de 5 kDa, care se concentrează la vid până la 12% substanța uscată și se usucă prin pulverizare, la 130-145 °C temperatură de intrare și 80°C temperatură de ieșire. În final se obține hidrolizatul proteic sub formă de pulbere de culoare alb gălbuie, care conține polipeptide cu masa moleculară medie peste 5 kDa, cu un conținut de cel puțin 85% proteină.

*Exemplul 2.* Etapele preliminare de spălare a țesutului: mărunțire, decalcifiere, delipidizare și tratament alcalin sunt similare cu cele prezentate în exemplul 1, cu deosebirea că delipidizarea se face cu 800 ml izopropanol la temperatura de 40°C, timp de 5 ore. Tratamentul enzimatic se realizează cu Alcalase® (Novozymes, Bagsværd, Danemarca) care se prepară prin dizolvarea a 0,005 g enzimă în 250 ml tampon fosfat 0,2 M pH 8,0 și se adaugă peste țesutul rezultat din etapa de tratament alcalin. Alcalase este o serin endo-peptidază de tip subtilizina A, produsă de *Bacillus licheniformis*. Enzima utilizată avea o activitate de 0,75 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.

Reacția de hidroliza are loc la temperatura de 60°C timp de 5 ore. Etapele de stopare a reacției enzimatice, centrifugarea, tratamentul cu glutaminază și ultrafiltrarea se fac în condițiile prezentate în exemplul 1, cu singura diferență că reacția de hidroliză a legăturii amidice din glutamină are loc timp de 5 ore. Soluția rezultată după filtrarea tangențială cu masă moleculară peste 5 KDa se concentrează la 17% prin centrifugare la vid și se usucă prin pulverizare. După uscare se obține o pulbere de peptide cu greutate moleculară mai mică de 3000 Da cu un conținut de cel puțin 87% proteină.

*Exemplul 3.* Procedul de obținere al peptidelor din pește este similar cu cel descris în exemplul 1 cu deosebirea că materia primă a fost un amestec de piele, oase și carne de pește și că tratamentul enzimatic se face cu ambele enzime proteazice, succesiv, astfel:

- în prima etapă se realizează hidroliza enzimatică cu 0,005 g Flavourzyme®, dizolvată în prealabil în 150 ml tampon fosfat 0,2 M, pH 7,0, la temperatura de 50°C,

timp de 5 ore, urmată de inactivarea enzimei prin încălzirea soluției la 100°C, timp de 15 min;

- soluția rezultată se răcește, se aduce la pH 8,0 cu hidroxid de sodiu 10 M și se hidrolizează enzimatic cu o soluție de 0,007 g Alcalase<sup>®</sup>, dizolvată în tampon fosfat 0,2 M, pH 8,0. Reacția de hidroliză se realizează la temperatura de 60°C, timp de 6 ore. După stoparea reacției enzimatice, se aduce pH-ul la 7,0 cu acid clorhidric 10 M, și se procedează conform exemplului 1. Soluția recuperată după ultrafiltrare se concentrează la 12% și se usucă sub formă de pulbere, cu ajutorul unui atomizor. Hidrolizatul proteic obținut are o masă moleculară mai mare de 5 kDa, un conținut în proteină de cel puțin 90%.

Probele de hidrolizate proteice, obținute în conformitate cu exemplele de mai sus, au fost analizate fizico-chimic și biologic. Rezultatele analizelor fizico-chimice și biochimice au demonstrat că probele de peptide analizate au prezentat un conținut ridicat în proteină (peste 85% în toate cazurile) și scăzut în lipide (sub 2%) și în cenușă (sub 1,5%).

*Exemplu 4.* Se lucrează ca în exemplu 3, numai că se folosesc subproduse de novac, *Arystichtys nobilis*.

*Exemplu 5.* Se lucrează ca în exemplu 3, numai că se folosesc subproduse de cteno, *Ctenopharingodon idella*.

*Exemplu 6.* Se lucrează ca în exemplu 3, numai că se folosesc subproduse de sânger / fitofag, *Hypophthalmichthys molitrix*.

*Exemplu 7.* Compozițiile realizate conform Exemplelor 1-6 au fost testate din punct de vedere al caracteristicilor biologice. A fost determinat efectul de inhibare a unor fitopatogeni fungici, *Sclerotinia sclerotium* și *Botrytis cinerea* prin tehnica includerii în mediu de cultură și determinarea reducerii dezvoltării radiale față de martor. O inhibare de peste 80% față de martor este constatată pentru ambele tulpini pentru compozițiile rezultate din toate exemplele.

Pentru a evidenția efectul stimulatv al extractelor vegetale asupra preluării nutrienților minerali s-a utilizat biotestul pompei de protoni. Pompa de protoni prezintă în membrana și vacuolele rădăcinii este agentul responsabil de reglarea gradientului electrochimic necesar asigurării energiei de funcționare a sistemului de preluare a nutrienților, precum și a creșterii celulelor din plante. Pentru realizarea experimentului de biotestare a fost folosit un test rapid și relativ simplu bazat pe evidențierea gradului de acidifiere a zonei rădăcinilor plantelor crescute pe mediu

agarizat folosind un colorant – indicator de pH, bromcrezol-purpur. Au fost utilizate plantule de porumb. Pentru toate compozițiile testate a fost determinată o activitate de stimulare a pompei de protoni, reliefată prin creșterea suprafeței zonei acidificate, de cel puțin 30%.

S-a urmărit efectul compozițiilor realizate în ceea ce privește activitatea similară fitohormonilor giberelinici. Nivelul de activitate a fost estimat prin biotestul inducerii  $\alpha$ -amilazei din endospermul de orz. În endospermul de orz (ca și în endospermul altor semințe de plante) inducerea  $\alpha$ -amilazei are loc sub acțiunea fitohormonilor giberelici. Acești fitohormoni sunt produși în mod normal în timpul germinației de către embrion și au rolul de a mobiliza rezervele nutritive (amidon) sub o formă de zaharuri ușor de utilizat (glucoză) de către plantulă. Această tehnică este ușor de pus în evidență prin utilizarea difuzei radiale în gel de agar-amidon, folosindu-se cariopse de orz cărora li s-a îndepărtat embrionul. Biotestele efectuate au reliefat o stimulare a inducerii activității  $\alpha$ -amilazice de cel puțin 50%.

Toate compozițiile obținute conform exemplilor de realizare a invenției au: activitatea antimicrobiană, de inhibare a unor fitopatogeni telurici, de cel puțin 80%, activitate de stimulare a pompei de protoni de cel puțin 75% și de inducere a activității  $\alpha$ -amilazice în endospermul de orz de cel puțin 50%.

## REVENDICĂRI

1. Hidrolizat proteic conform invenției, **caracterizat prin aceea că** are un conținut în polipeptide cu masa moleculară medie mai mare de 5 kDa de peste 85% și următoarele proprietăți bioactive: activitatea antimicrobiană, de inhibare a unor fitopatogeni telurici, de cel puțin 80%, activitate de stimulare a pompei de protoni de cel puțin 75% și de inducere a activității  $\alpha$ -amilazice de cel puțin 50%..
2. Procedul de obținere al hidrolizatului proteic de pește, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: spălarea, mărunțirea, decalcifierea și delipidizarea subproduselor de pește prin metode cunoscute, urmată de îndepărtarea componentelor glucidice prin tratare cu soluție alcalină de NaOH 0,1 M; hidroliza enzimatică prin tratare cu endo- și exo-proteaze microbiene, dizolvate în prealabil în 6-10 volume tampon fosfat 0,2M, pH 7,0-8,5, în raport de masă enzima: substrat de 1:20-1:60, la 50-70°C, timp de 1-8 ore; inactivarea enzimelor prin încălzirea extractul la 90-100°C, timp de 10-30 min, urmată de răcire și separarea țesutului ne-extras prin centrifugare la 3000...5000 rpm, timp de 30...50 min, ajustarea pH-ului la valoarea 7,0 cu soluții concentrate de hidroxid de sodiu sau acid clorhidric și tratarea cu glutaminază, în raport de masă enzimă: substrat de 1:50, la 60°C, timp de 4-5 ore; inactivarea glutaminazei prin răcire la 4°C timp de 15 min, urmată de ultrafiltrarea tangențială, prin folosirea unei membrane filtrante cu fibre de polisulfonă, cu limita de excludere a maselor moleculare de 3000 Da; concentrarea retentatului rezultat după filtrare la 10...20 % substanță uscată și uscarea prin pulverizare, la 130-145 °C temperatură de intrare și 80°C temperatură de ieșire.
3. Procedul de obținere al hidrolizatului proteic de pește, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** subprodusele de pește pot fi resturi de piele, oase, carne și viscere, separate sau în amestec inițial, și provin de preferință de la ciprinidele de crescătorie, crap *Cyprinus carpio*, novac, *Arystichtys nobilis*, cteno, *Ctenopharingodon idella*, sânger / fitofag, *Hypophthalmichthys molitrix*.
4. Procedul de obținere al hidrolizatului proteic de pește, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** enzimele folosite sunt un amestec de aminopeptidaze, dipeptilpeptidaze și endo-peptidaze produs de *Aspergillus oryzae*, și/sau subtilizina A, o serin endo-peptidază produsă de *Bacillus licheniformis*, și glutaminază produsă de *Lactobacillus rhamnosus*.