



УКРАЇНА

(19) **UA**
(51) МПК(11) **112426**(13) **C2****A23J 3/14** (2006.01)**A23J 3/34** (2006.01)**C12N 9/62** (2006.01)**C12P 21/06** (2006.01)**A23L 7/104** (2016.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2013 09395**
(22) Дата подання заявки: **15.12.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **12.09.2016**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **201010624763.5**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **28.12.2010**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **CN**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.09.2013, Бюл.№ 17**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **12.09.2016, Бюл.№ 17**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/EP2011/072865, 15.12.2011**

(72) Винахідник(и):
**Улмер Хельга (SG),
Діоно Беатріс (SG),
Рабе Свен (DE)**
(73) Власник(и):
**НЕСТЕК С.А.,
Avenue Nestlé 55, CH-1800 Vevey,
Switzerland (CH)**
(74) Представник:
**Авраменко Наталія Василівна, реєстр.
№34**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 94/25580 A1, 10.11.1994
WO 99/02691 A1, 21.01.1999
EP 0357320 A2, 07.03.1990
EP 1985698 A1, 29.10.2008
US 2010/316763 A1, 16.12.2010
GRIMRATH A ET AL: "Koji fermentation based on extracellular peptidases of", EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY; ZEITSCHRIFT FÜR LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND -FORSCHUNG A, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 232, no. 3, 25 December 2010 (2010-12-25), Pages 415-424

(54) ФЕРМЕНТНА КОМПОЗИЦІЯ, ОДЕРЖАНА ФЕРМЕНТАЦІЄЮ КОДЖІ**(57) Реферат:**

Винахід належить до ферментної композиції, одержуваної ферментацією Коджі, де ферментація Коджі включає суміш грибів і принаймні одного зернового продукту, ферментовані *Aspergillus*.

UA 112426 C2

Галузь винаходу

Даний винахід стосується ферментної композиції, одержаної шляхом ферментації Коджі, що включає гриби, ферментовані *Aspergillus*. Винахід додатково стосується ферментної композиції, одержаної шляхом ферментації суміші грибів і зернових, і способу одержання ферментної композиції та її застосування.

Рівень техніки

Гідроліз рослинних білків - це один з найдавніших процесів харчових біотехнологій. Протягом тисячоліть у країнах Азії гідролізували соєвий білок для утворення, наприклад, соусів Shoyu, соєвого соусів і звичайних приправ, які у західних країнах найбільше асоціюються із Китайською кухнею. При таких громіздких, інколи багаторічних процесах необхідну пептидолітичну активність одержують шляхом послідовної ферментації *Aspergilli*, молочнокислими бактеріями і дріжджами відповідних рослинних субстратів.

В західних країнах такий процес імітують із застосуванням білків пшениці, рису або арахісу і заміни ферментативного гідролізу кислотним гідролізом, наприклад, шляхом застосування гідрохлорної кислоти для ефективного відкриття кінетично дуже стабільних пептидних зразків. Продукти, які звичайно звать гідролізованими рослинними білками (HVP), є, наприклад, або рідкими приправами, або концентрованими, для одержання паст, порошків, преміксів для застосування у композиціях супів, соусів або бульйонних кубиків. Всі ці продукти набувають м'ясоподібного аромату і смаку, хоча м'ясо не бере участі у жодній стадії процесу.

Оскільки кислоту необхідно нейтралізувати після завершення процесу гідролізу, додають натрію гідроксид. Утворений під час реалізації реакції нейтралізації натрію хлорид підтримує властивості підсилення смаку рослинного гідролізату, що часто є сприятливим у готовому продукті.

Однак, кислотний гідроліз має багато недоліків. Сильні кислоти і луги є небезпечними речовинами, які більше не вважаються сумісними із безпечними і харчовими операціями, особливо при температурі вище 100 °C. Навіть більш проблематичним є неминуче утворення дихлоросполук, наприклад, 1,2- і 1,3-дихлоропропанолу, які продемонстрували канцерогенність при дослідженнях годування тварин. Контакт ліпідної фракції сировини із гідрохлорною кислотою такою призводить до утворення хлоринованих стероїдів, а процеси Майяра ведуть до утворення 5-(хлорометил)фурфурала.

Для уникнення утворення небезпечних або токсичних сполук знов звернули увагу на ферментативні процеси, при яких такі сполуки або не вимагаються, або не утворюються. Як наслідок, виникає постійний інтерес до покращення ферментативних процесів. Застосовувані в таких процесах ферменти, як правило, є пептидазами і/або протеазами.

Звичайні пептидази - це, наприклад, алькалаза (серин-пептидаза з *Bacillus licheniformis*), папаїн (цистеїн-пептидаза з *Carica papaya*), хімосин (сичуг) з рекомбінантних штамів Мисог і нейтрази (метал-пептидаза з *Bacillus subtilis*). US 3,694,316 описує спосіб приготування протеаз з базидіоміцетів. Інші наявні на ринку пептидази, наприклад, проназа або Flavorzyme®, є комбінаціями активності різних типів, утворених бактеріями, наприклад, *Streptomyces griseus*, або грибом аскоміцет, наприклад, *Aspergillus oryzae*.

Завдяки своїй біокаталітичній природі, ферментативний процес можна виконати у м'яких фізіологічних умовах, що, відтак, є більш сприятливими для навколишнього природного середовища, ніж їх аналоги при кислотному гідролізі. Однак, на протидію кислотному гідролізу, ферментативний процес часто не досягає завершення, що може призвести до одержання частково гідролізованих продуктів із гірким смаком. Рівень гіркоти збільшується із збільшенням ступеню гідролізу до досягнення максимуму, а потім знижується із прогресом гідролізу.

Були опубліковані численні спроби пришвидшення ферментативного процесу (Pedroche, J. et al., Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry, 2003) і запобігання утворенню гірких пептидів (Maehashi K. et al., Molecular Methods of plant Analysis, 2002, 47-68).

Рослинні білки (Lamsal, B.P. et al., Journal of the American Oil Chemists' Society, 83(8), 731-737, 2006) або тваринні білки (Je, J. et al., European Food Research and Technology, 221(1-2), 157-162, 2005), або відходи обробки, наприклад, рисові висівки, виступали в якості субстратів (Jarunrattanasri, A. et al., ACS Symposium Series, 83-97, 2005). Також досліджували такі субстрати, як гемоглобін, казеїн і інсулін (Suzuki, N. et al., Phytochemistry, 2005, 66, 983-990).

Соя і пшениця є найбільш вживаними субстратами для ферментативного гідролізу. Якщо біокаталізатор не був інтактною клітиною, наприклад, мікроорганізмом, пропонують ферментні препарати, такі як нейтраза (WO 2006/103628), або комбінації рослинних і мікробіальних ферментів (WO 2002/078461; CN 1397644).

Пептидоліз пшеничного глютену можна забезпечити, наприклад, із застосуванням алькалази, панкреатину або пепсину (Kong, X. et al., Food Chemistry, 101, 615-620, 2007), або

папаїну (Wang, J. et al., Food Chemistry, 101, 1658-1663, 2007). Зрештою, відомий ферментативний гідроліз пшеничного глютену із застосуванням наявних на ринку ферментних препаратів, наприклад, Flavorzyme®. Критичними точками у розвитку процесів WGH-te (Гідролізат пшеничного глютену —технічні ферменти), однак, все ще є висока вартість таких ферментів, недостатня протеолітична активність наявних ферментних препаратів у порівнянні, наприклад, із процесами кислотного гідролізу, недостатнє розщеплення неперетравлюваних залишків (наприклад, багатих на глікопротеїни фракцій) і гідролізатів, мікробіологічний захист гідролізатів, оскільки вони проходять без або при низьких концентраціях солі, і при температурах, які уможливають ріст певних забруднюючих мікроорганізмів.

Відповідно, існує потреба у ферментній композиції із покращеними властивостями гідролізу зернових продуктів.

Заявник несподівано встановив, що ферментна композиція, одержана шляхом ферментації Коджі, на основі грибів як сировини для процесу ферментації, збільшує експресію протеаз і /або пептидаз з *Aspergillus*. Наявність зернового продукту, наприклад, пшениці або ячменю, в процесі ферментації, додатково збільшує протеолітичну активність зазначених ферментів. Додаткове збільшення виробництва активності можна забезпечити шляхом додавання невеликої кількості середовища росту в процесі ферментації.

Необроблена ферментна композиція, одержана у такий спосіб, є більш активною, ніж наявні на ринку ферментні композиції, наприклад, Flavorzyme®, і веде до покращеної і швидкої протеолітичної активності щодо пшеничного глютену. Це уможливорює застосування цієї ферментної композиції в більш ефективному процесі гідролізу зернових продуктів, наприклад, пшениці або сої, що веде до покращеного гідролізу сировини. Процес гідролізу був швидшим, знижуючи, таким чином, ризик забруднення небажаними мікроорганізмами і знижуючи вартість виробництва шляхом застосування необробленої ферментної композиції замість застосування очищеного наявного на ринку ферменту. Крім того, і протилежно до застосування потенційний наявних на ринку ферментів, наприклад, альказан, не визначаються побічні присмаки, наприклад, гіркота.

Мета даного винаходу - запропонувати ферментну композицію, що принаймні частково надає можливість подолати один або більше з недоліків відомих ферментних композицій.

Суть винаходу

В першому аспекту винахід пропонує ферментну композицію, одержану ферментацією Коджі, причому ферментація Коджі включає гриби, ферментовані *Aspergillus*.

В другому аспекті винахід пропонує спосіб виробництва ферментної композиції, що включає стадію ферментування грибів *Aspergillus*, переважно ферментування грибів разом із зерновими.

Ще один аспект винаходу передбачає застосування ферментної композиції згідно винаходу для гідролізу зернових продуктів або м'ясних продуктів і для приготування харчових продуктів.

Короткий опис фігур

Фігура 1: Стадії способу приготування необробленої ферментної композиції відповідно до винаходу.

Фігура 2: Фракціонування білків необробленої ферментної композиції після елювання за допомогою системи хроматографії Sepharose Fast Flow.

Фігура 3: Протеолітична активність ферментів з препарату Коджі на основі грибів у порівнянні із препаратом Flavourzyme™. Показники нормалізовані до 100 % активності Flavourzyme™.

Детальний опис

Винахід стосується ферментної композиції, одержаної ферментацією Коджі, причому ферментація Коджі передбачає ферментацію грибів за допомогою *Aspergillus*. Переважно ферментація Коджі додатково включає ферментування зернових за допомогою *Aspergillus*.

Термін "ферментація Коджі" стосується процесу ферментації, наприклад, ферментації твердої фази, сої, пшениці, ячменю і/або рису за допомогою пліснявих грибів, наприклад, *Aspergillus*, для виробництва різноманітних традиційних харчових продуктів і напоїв, наприклад, м'ясо, соєвого соусу, саке абощо.

Ферментація Коджі згідно винаходу включає гриби або суміш грибів, переважно, принаймні із одним зерновим, обраним з групи, що включає пшеницю, ячмінь, рис або їх комбінації. Автори несподівано встановили, що присутність грибів у ферментаційній суміші генерує Коджі із значно збільшеною протеолітичною активністю щодо глютену в зернових. Суміш може містити від приблизно 10 до 99 мас. % грибів, переважно від приблизно 60-90 мас. % грибів, і/або від приблизно 10 до 60 мас. % зернових, переважно від приблизно 10-40 мас. % зернових. В одному з варіантів втілення суміш включає приблизно 90 мас. % грибів і 10 мас. % зернових, причому переважним зерновим є пшениця. Додавання зернового продукту, як було

встановлено, є переважним для консистенції і повітропроникності, наприклад, при твердофазній ферментації Коджі. Це уможливорює кращий зріст пліснявих грибів *Aspergillus* в Коджі, краще зволоження шару Коджі і контроль, наприклад, температури ферментації.

5 зернові можна обрати з групи, до якої входять цільні зернові, глютен зернових, висівки зернових, лузга зернових, коріння або паростки зернових, оброблені зернові та будь-які їх комбінації.

Активність ферментної композиції може бути додатково збільшена шляхом додавання низьких кількостей середовища росту при ферментації Коджі. Перевага полягає в тому, що таке середовище росту додатково збільшує одержуваний вихід ферментів і активність процесу ферментації, а також стабільність способу ферментації Коджі. Відтак, ферментація Коджі згідно винаходу переважно включає таке середовище росту в діапазоні від приблизно 0.1 до 10 мас. %, переважно від приблизно 1 до 6 мас. %, і навіть переважніше від 1 до приблизно 3 мас. % загальної суміші. Середовище росту обирають з групи, до якої входить знежирений соевий шрот, екстракт дріжджів, пептон, рідкий кукурудзяний сироп або будь-які їх комбінації.

15 Ферментація Коджі згідно винаходу може включати гриби або суміш грибів, причому гриби можуть бути переважно обрані з групи, до якої входять *Coprinus comatus*, *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris*, *Hypsizygus tessulatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus citrinipileatus*, *Pleurotus eryngii*, *Boletus edulis*, *Craterellus cornucopioides*, *Craterellus tubaeformis*, *Agaricus blazei*, *Volvariella volvacea*, *Agrocybe Aegerita* і *Ganoderma lucidum*, або будь-які їх комбінації. Гриби або їх суміш можуть включати свіжі гриби, сушені або оброблені гриби, цільні гриби або будь-які їх частини, наприклад, тільки ніжки або плодове тіло, або будь-які їх комбінації. Перевагою застосування сухих або оброблених грибів альтернативно до свіжих грибів є краще зберігання і легші умови обробки такого рослинного матеріалу в промислових установках. Додаткові переваги - це ціна і доступність матеріалу протягом всього року.

25 Коджі згідно винаходу переважно ферментується волокнистими грибами *Aspergillus oryzae*. *Aspergillus oryzae* має перевагу в тому, що є добре відомими волокнистими грибами, що застосовуються при традиційній ферментації Коджі. Вони є абсолютно безпечними для харчового споживання і надають типових смако-ароматичних нот типового ферментованого соєвого соусу.

30 Додатковий аспект згідно винаходу є способом виробництва ферментної композиції, описаної у даному винаході, що передбачає стадію ферментування суміші грибів і принаймні одного зернового продукту *Aspergillus*. Таким чином, суміш грибів із принаймні одним зерновим продуктом може бути інокульована *Aspergillus* до процесу ферментації. Альтернативно, інокульовані *Aspergillus* гриби можуть бути змішані із зерновими до процесу ферментації. Необроблена ферментна композиція, одержувана таким способом, може застосовуватися безпосередньо при вищеописаному застосуванні. Перевагою цього процесу є те, що може бути одержана необроблена ферментна композиція, що є більш активною, ніж загальновідомі ферментні композиції, що наразі використовуються в промислових процесах гідролізу пшеничного глютену. Додатковою перевагою є відсутність побічних смаків, наприклад, гіркоти, у продуктах гідролізу згідно винаходу.

40 Спосіб може додатково передбачати стадію принаймні часткового очищення ферментної композиції, наприклад, шляхом екстракції, сепарації або концентрації або будь-яких комбінацій таких технологій. Ферментна композиція може бути, наприклад, відділена і концентрована хроматографією DEAE-Sepharose. Стадії сепарації і конденсації ферментної композиції можуть включати мембранну сепарацію. Перевагою є те, що активність ферментної композиції може бути, наприклад, додатково збільшена, що дозволить навіть кращий вихід гідролізату із обраної сировини. Крім того, можна полегшити і здешевити будь-яке зберігання, транспортацію з однієї фабрики на іншу і/або і обробку.

45 Ще один додатковий аспект згідно винаходу - це застосування ферментної композиції згідно винаходу для гідролізу зернових продуктів, наприклад, пшеничних або соєвих продуктів. Застосування ферментної композиції уможливорює покращення способу гідролізації зернового глютену, включаючи, наприклад, вихід, швидкість і вартість процесу ферментації, для зниження ризику забруднення небажаними мікроорганізмами і для покращення смаку і зменшення будь-яких побічних смаків гідролізованих продуктів.

50 Відтак, більш конкретно, застосування ферментної композиції стосується приготування харчового продукту, наприклад, соусу для приправлення, засобу надання смаку, супу, дегідратованої приправи, бульйону або пасти. Необроблена ферментна композиція, одержувана способом згідно винаходу, також може застосовуватись.

60 Фахівцям з рівня техніки зрозуміло, що вони можуть вільно поєднувати всі ознаки даного винаходу, розкриті в описі. Зокрема, ознаки щодо продукту згідно винаходу можна поєднати із

способом згідно винаходу і навпаки. Крім того, додаткові ознаки, описані щодо різних варіантів втілення, також можуть поєднуватися.

Додаткові переваги і ознаки згідно винаходу очевидні з фігур і прикладів.

Приклади

- 5 Винахід надані описаний із посиланням на наступні приклади. Слід звернути увагу, що заявлений винахід жодним чином не обмежується наведеними прикладами.

Приклад 1: Необроблена ферментна композиція Таблиця 1: композиції Коджі

Зразок	Пшеничні висівки (%)	Грибна основа (%)	Пшеничний глютен (%)	Цільна пшениця (%)
1	10	90	0	0
2	10	67.5	22.5	0
3	10	67.5	0	22.5
4	10	45	45	0
5	10	45	22.5	22.5
6	10	45	0	45
7	10	22.5	45	22.5
8	10	22.5	22.5	45
9	10	0	45	45

- 10 Необроблені ферментні композиції були приготовані відповідно до фігури 1.

Зразки субстратів Коджі спочатку були приготовані шляхом змішування грибної основи (гриби Shaggy Mane (*Coprinus comatus*)), пшеничного глютену, цільної пшениці і пшеничних висівок у співвідношеннях, вказаних у таблиці 1. Потім 10 г кожного одержаного субстрату Коджі змішали із 5 г води, інокулювали спорами *Aspergillus oryzae*, а потім ферментували у традиційній системі твердофазної ферментації Коджі. Ферментацію здійснювати при 30 °C протягом 30 годин при вологості 80 % ВВ (відносна вологість). Потім ферментований Коджі промили у 80 мл води при 4 °C протягом 1 години. Потім Коджі відфільтрували, а ретентат зібрали як необроблену ферментну композицію.

Приклад 2: Аналіз ферментів

- 20 Ферментативну активність різних необроблених ферментних композицій визначили наступним чином. 20 мл необробленої ферментної композиції додали до 1 г пшеничного глютену у 30 мл фосфатного буферу 0.2 М (при pH 7.2), а одержану суміш інокулювали при 50 °C протягом 30 хв. Після цього суміш нагрівали протягом 10 хв. при 100 °C для припинення подальших ферментативних реакцій. Формольний азот (FN) визначили відповідно до протоколу, зазначеного довідково: Hawk, P. B., Oser, B. L, and Summerson, W. H. Henriques-Sørensen, Formol titration method: principle, In Practical Physiological Chemistry, Thirteenth edition, New York, Blakiston, 1954. pp. 897-899. Показники формолу дають оцінку кількості вільних амінокислот, утворених в розчині. В якості зразку для ферментативних визначень необроблені ферментні композиції спочатку нагрівали протягом 10 хв. до 100 °C для інактивації ферментів, а потім обробили таким же чином, як зразки, що використовувались для вимірювання вмісту формольного азоту. Показники ферментативної активності були визначені наступним чином:

AFN= [(FN Зразку)-(FN бланкового зразку)]/пшеничний глютен [мг/г] і інкубація протягом хвилини. Результати наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив необроблених ферментних композицій на гідроліз пшеничного глютену

Зразок	AFN [мкг/г*хв.]
1	65
2	52
3	60
4	38
5	40
6	37
7	26
8	14
9	11

За формольним азотом (FN), вивільненим під час ферментативного гідролізу, спостерігали як за індикатором протеолізу. Було встановлено, що найважливішим інгредієнтом у ферментованій основі Коджі для оптимізації протеолізу розчину пшеничного глютену була

грибна основа. Найкращі результати були одержані із зразком 1 продукту Коджі. У відповідності до цього результату також відзначили, що розчини пшеничного глютену після стадії гідролізу були найчистішими, тобто, були найпрозорішими зразками при гідролізі ферментної суміші із суміші Коджі із найвищим вмістом грибів. Слід дійти до висновку, що якщо у ферментованому Коджі наявна грибна основа, подальший гідроліз розчину пшеничного глютену покращується. Найкращих результатів досягають із високим вмістом грибної основи, як, наприклад, у зразку 1 із 90 мас. % грибів і 10 мас. % пшеничних висівок у ферментованому Коджі.

Приклад 3

Субстрат Коджі був приготований із грибами в якості основного компоненту (приблизно 90 мас. %), пшеничними висівками (10 мас. %) (зразок 1 в Прикладі 1), і різними добавками в різних кількостях. Ферментна активність гідролізу пшеничного глютену в різних експериментах ферментації була визначена ортогональним експериментальним виконанням, деякі результати наявні в таблиці 3. Показники показують середню різницю, одержану між контрольним зразком, тобто, при ферментації без добавок (зразок 1 з Прикладу 2) і зразками із добавкою 2 мас. % знежиреної сої, екстракту дріжджів або пептону.

Таблиця 3

Вплив на утворення формольного азоту (FN) із зразків пшеничного глютену із знежиреною соєю, екстрактом дріжджів або пептоном

	Знежирений соєвий шрот	Екстракт дріжджів	Пептон
Різниця у AFN з контрольного зразку	+ 5.9 [мкг/г*хв.]	+ 5.57 [мкг/г*хв.]	+ 13.3 [мкг/г*хв.]

Серед протестованих зразків пептон мав найбільших позитивний ефект на виробництво FN. Пептон сприяв експресії екзопротеаз, із значним позитивним ефектом на вивільнення вільних амінокислот протестованого розчину пшеничного зразку. Знежирений соєвий шрот і екстракт дріжджів також сприяли експресії екзопротеаз, навіть якщо загальний вплив на протеолітичну активність не був таким сильним, як це спостерігалось щодо пептону. Відтак, додавання певних обраних елементів до ферментації Коджі може додатково покращити протеолітичний ефект ферментної композиції.

Приклад 4

Необроблена ферментна композиція згідно Прикладу 1 була запущена на системі хроматографії DEAE-Sepharose Fast Flow. Фігура 2 продемонструвала результат. Кожен з піків на графіку відтворює білки, наявні у ферментній композиції. Протеолітична активність досліджувалася щодо кожного піку білку, і тільки один пік, як показано на фігурі 2 стрілкою "2", виявив значну активність протеази. Біохімічне очищення протеази з ферментованого Коджі на грибній основі досягли за допомогою преципітації сульфату амонію із подальшою хроматографією на DEAE-Sephadex A50 і Butyl-Sepharose CL-4B відповідно до стандартних процедур, відомих фахівцям з рівня техніки.

Характеристиками ізольованої з Коджі на грибній основі протеази є:

- Відносна молекулярна маса: 53.8 кДа (на основі ДСН-ПААГ електрофорезу і іоннообмінної мас-спектрометрії LCQ Deca XP)
- Ізоелектрична точка: 4.1-4.2
- Специфічна активність: 2274.7 од/мг

Така частково очищена композиція забезпечує ферментну композицію із збільшеною в 67.1 разів ферментною активністю. Відновлювальний вихід ферменту в процесі очищення становив 11.3 %. Протеолітична активність подальшої частково очищеної ферментної композиції, одержаної з Коджі на грибній основі, була порівняна із протеолітичною активністю наявного на ринку очищеного Flavourzyme™, при гідролізі пшеничного глютену або казеїну. Це призводить до результату, показаного на фігурі 3, який відрізняється тим, що протеолітична активність Flavourzyme™ приймають за 100 % і порівнюють із частково очищеною ферментною композицією згідно винаходу. Протеолітична активність частково очищеної ферментної

композиції, одержаної з Коджі на грибній основі, була вищою, ніж у наявного на ринку і широко застосовуваного Flavourzyme™.

Приклад 5

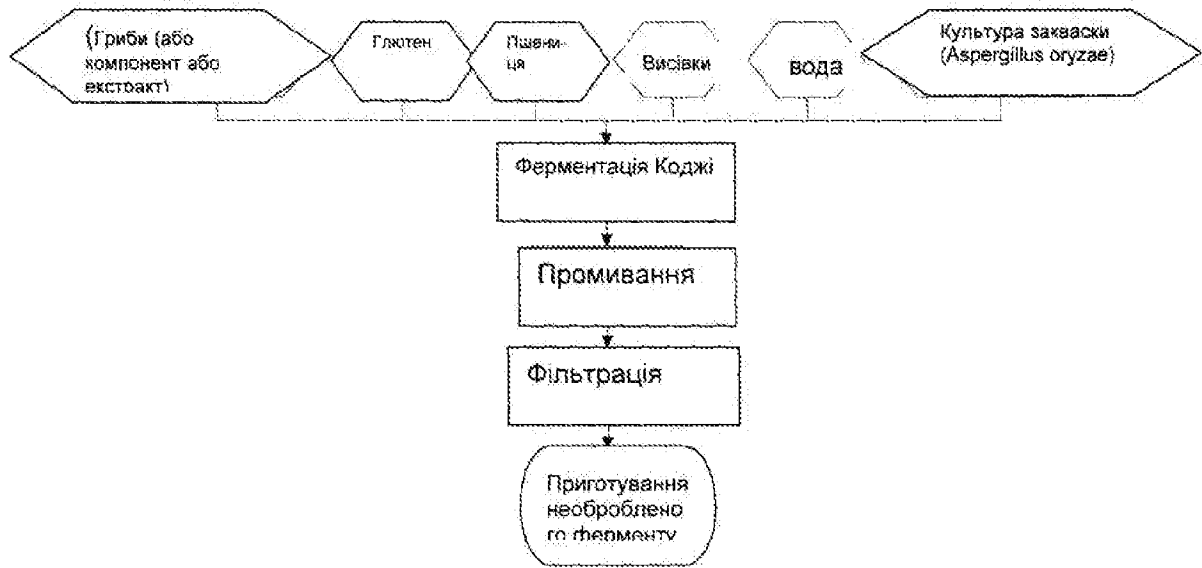
5 Субстрат Коджі (що містить сушені гриби і пшеничний глютен) змішали із водою, інокулювати спорами *Aspergillus oryzae* і інкубували при 30 °C і рівні вологості 80 % ВВ протягом 30 годин. Коджі зібрали, змішали із водою і пшеничним глютенем, витримали при 50 °C протягом 3 годин. Потім розчин відфільтрували, а реакцію зупинили шляхом нагрівання супернатанту протягом більше 90 °C протягом 10 хвилин. Одержаний соус оцінили неофіційним тестуванням. Досягнуто типових смако-ароматичних нот соусу на основі гідролізованого пшеничного глютену без гірких побічних присмаків.

10 Слід прийняти до уваги, що хоча винахід описаний із посиланням на певні варіанти втілення, можуть бути виконані різні варіанти і модифікації без виходу на межі обсягу винаходу, визначеного у формулі винаходу. Крім того, у випадках, коли існують відомі еквіваленти описаним ознаками, такі еквіваленти входять до обсягу винаходу таким же чином, якби вони були зазначені в описі.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

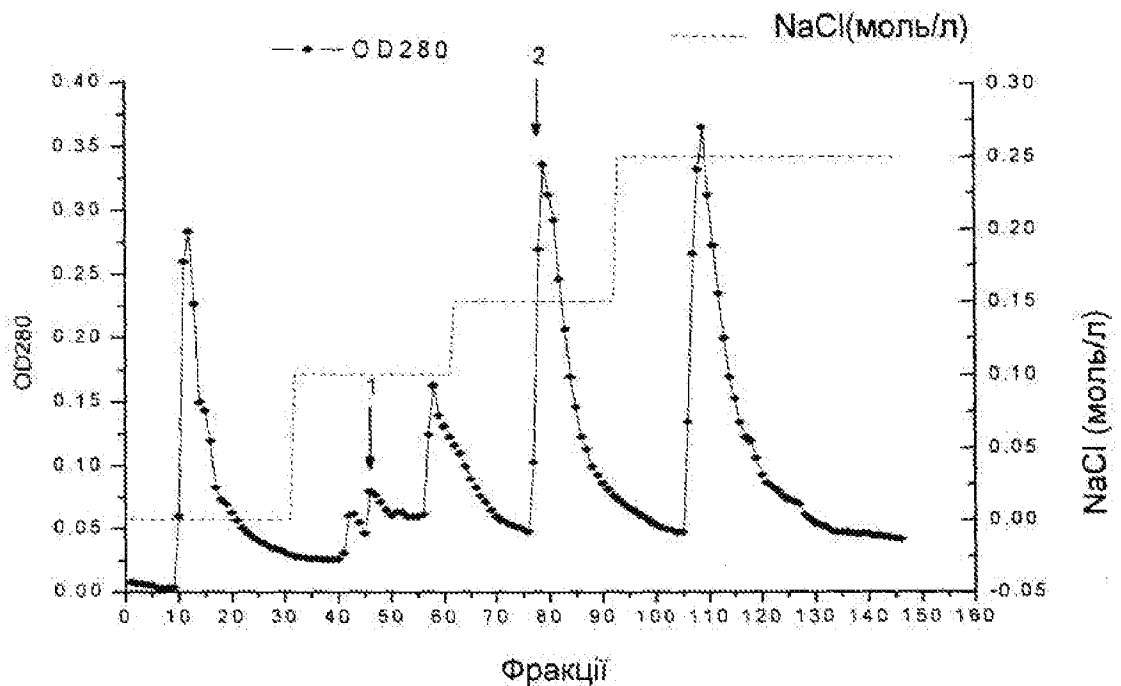
1. Спосіб приготування ферментної композиції шляхом ферментації Коджі, який передбачає стадію ферментації *Aspergillus* суміші грибів і принаймні одного зернового продукту.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що зерновий продукт вибирають з групи, до якої входять пшениця, ячмінь та їх комбінації.
3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що при ферментації Коджі використовують 10-99 мас. % грибів і 10-60 мас. % зернових.
- 25 4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що при ферментації Коджі використовують 60-90 мас. % грибів і 10-40 мас. % зернових.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що при ферментації Коджі використовують 90 мас. % грибів і 10 мас. % зернових.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, який **відрізняється** тим, що зерновий продукт - це пшениця.
- 30 7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що при ферментації Коджі додатково використовують середовище росту в діапазоні від 0,1-10 мас. % загальної суміші.
8. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що кількість середовища росту становить в діапазоні від 1-3 мас. % загальної суміші.
- 35 9. Спосіб за п. 7 або 8, який **відрізняється** тим, що середовище росту вибирають з групи, до якої входить знежирений соєвий шрот, екстракт дріжджів, пептон, рідкий кукурудзяний екстракт та будь-які їх комбінації.
10. Спосіб за будь-яким з пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що гриби вибирають з групи, до якої входять *Agaricus brunnescens*, *Coprinus comatus*, *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus campestris*, *Hypsizygus tessulatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus citrinipileatus*, *Pleurotus eryngii*, *Boletus edulis*, *Craterellus cornucopioides*, *Craterellus tubaeformis*, *Agaricus blazei*, *Volvariella volvacea*, *Agrocybe Aegerita* або *Ganoderma lucidum* та будь-які їх комбінації.
- 40 11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що зерновий продукт вибирають з групи, до якої входить цільне зерно, зерновий глютен, зернові висівки, зернова лузга, паростки зернових, оброблені зернові та будь-які їх комбінації.
- 45 12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, який **відрізняється** тим, що *Aspergillus* - це *Aspergillus oryzae*.
13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що передбачає стадію ферментування грибів *Aspergillus*.
14. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що додатково передбачає стадію очищення ферментної композиції екстракцією, сепарацією, концентрацією або будь-якою їх комбінацією.
- 50

ФЕРМЕНТНА КОМПОЗИЦІЯ, ОДЕРЖАНА ФЕРМЕНТАЦІЄЮ КОДЖІ



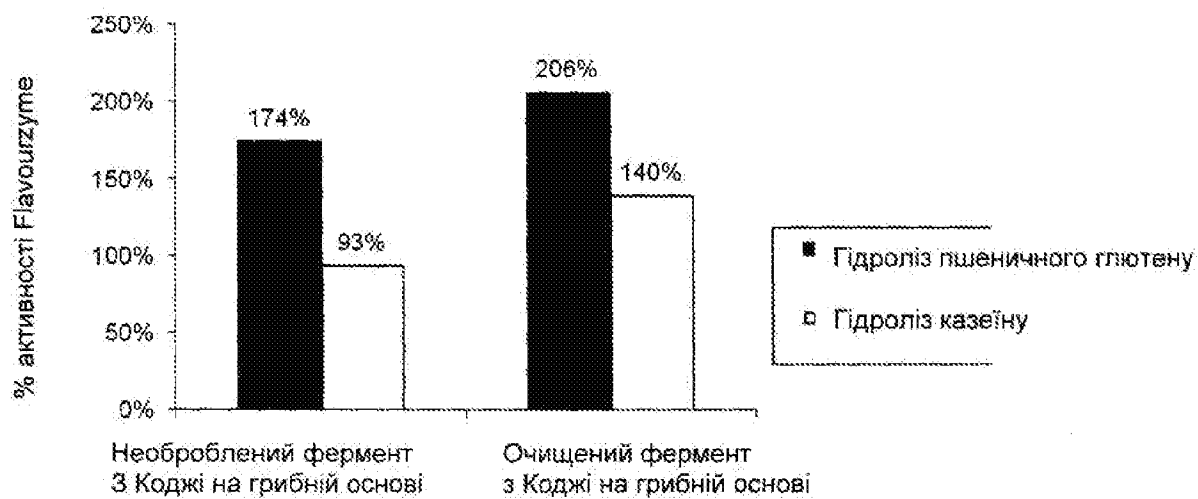
ФІГ. 1

ФЕРМЕНТНА КОМПОЗИЦІЯ, ОДЕРЖАНА ФЕРМЕНТАЦІЄЮ КОДЖІ



ФІГ.2

ФЕРМЕНТНА КОМПОЗИЦІЯ, ОДЕРЖАНА ФЕРМЕНТАЦІЄЮ КОДЖІ



ФІГ.3

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601