

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S _____

28
31

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 00091384 00000001 Folios 42
Fecha (CND): 2001-02-03 16:44:44
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRAR 329 COMPLETOS
Dependencia: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

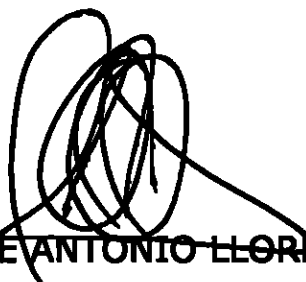
Re P1 -**SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.**-Solicitud
de Patente de Invencion para "PROCESO PARA
PREPARAR UN ADEREZO HIDROLIZADO".-Clase
A23G -Expediente número 00-091.384.-

1 Me refiero a mi solicitud arriba nombrada de fecha 29 de Noviembre de 2000

2 Anexos me permito presentar a usted copia autentica, debidamente certificada de la solicitud de patente presentada para el invento arriba nombrado **respecto de la cual reclamo prioridad**, a saber la solicitud alemana número 9906087 3 de 2 de Diciembre de 1999, junto con su traducción simple correspondiente a la totalidad de dicho documento, y

3 Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad

Señor Superintendente,


JOSE ANTONIO LLOREDA
T P 10 784
Código 231

REGISTRO DE PATENTES
SINGAPUR

Este es para certificar que el anexo es una copia fiel de la siguiente solicitud de patente de Singapore presentada en este Registro

Fecha de presentación	2 de Diciembre 1999
Numero de solicitud	9906087-3
Solicitante(s)	SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S A
Titulo de la invención	PROCESO PARA PREPARAR UN ADEREZO HIDROLIZADO

Tan Kar Leng (Señora)
Asistente de Registros
Para REGISTRO DE PATENTES
SINGAPUR
NOVIEMBRE 7, 2000

23
30

PATENTES FORMA 1 SINGAPUR 9906087-3
ACTA DE PATENTES 1994
(ACTA 21 DE 1994)
REGLAMENTO DE PATENTES 1995

El registro de patentes
Registro de Patentes

SOLICITUD PARA EL OTORGAMIENTO DE UNA PATENTE
EL OTORGANTE DE UNA PATENTE ES REQUERIDO POR EL QUE
FIRMA ABAJO EN BASE A LA PRESENTE SOLICITUD

I Titulo de la invención	PROCESO PARA PREPARAR UN ADEREZO HIDROLIZADO	
II Solicitante(s) (Ver Nota 2)	A) Nombre	SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S A
	Descripción/ Residencia	Incorporado en Suiza
	Nombre de la Calle y numero	P O Box 353 1800 Vevey
	Ciudad	
	Estado	
	País	Suiza
	(b) Nombre	
	Descripción/ Residencia	
	Nombre de la calle y No	
	Ciudad	
	Estado	
	País	
	(c) Nombre	
	Descripción/ Residencia	
	Nombre de la calle y No	
	Ciudad	
	Estado	
	País	
III Declaración de Pronda	País/País Designado	Exp No
Prioridad	Fecha de presentación	
(Ver nota 3)	País/País designado	Exp No
	Fecha de presentación	
	País/País designado	Exp No
	Fecha de presentación	

9906087-3

IV Inventores (Ver nota 4) (a) El solicitante(s) es/son el único/en sociedad inventor(es) (b) Una forma 8 declaración de las Patentes es provisto	☐ Sí ☒ No ☒ Sí ☐ No
V Nombre del Agente (si lo hay) (ver nota 5)	DREW & NAPIER
VI Dirección para servicio (Ver nota 8)	Casilla No Nivel No Unidad No Código Apdo Postal 152 Postal 900302 Nombre de la Calle Robinson Road Nombre del Edificio
VII Reclamo de una fecha de presentación anterior bajo la sección 20(3) 26(6) o 4784) (Ver nota 7)	☐ Sí ☒ No
VIII La invención que haya sido revelada en una Exhibición Internacional (ver nota 8)	☐ Sí ☒ No
IX Requerimientos de la Sección 114 (ver nota 9)	La invención se relaciona y/o usa un micro-organismo depositado para los propósitos de descripción de acuerdo con la sección 114 con una autoridad depositaria bajo el Tratado de Budapest. ☐ Sí ☒ No
X Checado de lista (para ser presentado por el solicitante o agente)	A El solicitante contiene los siguientes números de hoja(s) 1 Solicitud 3 hojas 2 Descripción 8 hojas 3 Reivindicaciones 3 hojas 4 Dibujo(s) 0 hojas 5 Resumen 1 hojas B La solicitud presentada se acompaña por 1 Documento de prioridad 2 Traducción de documento de prioridad 3 Declaración de la parte inventiva y derecho de otorgamiento X 4 Certificado de Exhibición Internacional
X Firma(s) (Ver nota 10)	Solicitante (a) DREW & NAPIER Fecha Diciembre 1° 1999 Solicitante (b) Fecha Solicitante (c) Fecha

Forma de Patentes 1-2

31

NOTAS

1 - Esta forma en cuanto se complete, deberá ser traída o llevada al Registro de Patentes junto con la tarifa prescrita y tres copias de la descripción de la invención, y de cualquier dibujo

2 Incluya el nombre y dirección de cada solicitud en el espacio provisto en el párrafo II. Los nombres de individuales deberán estar indicados completos y el apellido o nombre de familia deberá ser subrayado. Los nombres de todos los socios de una empresa deben ser indicados completos. El lugar de residencia de cada individuo debe ser completado en el espacio provisto. Las corporaciones deberán ser designados por el nombre de la compañía y país al que está incorporado y, en donde sea apropiado, el estado de incorporación dentro del país debe ser indicado en donde se pide. En donde más de tres solicitantes sean nombrados, el nombre y dirección del cuarto y cualquier solicitante adicional debe ser indicado en una hoja adjunta a esta Forma junto con la firma de cada uno de esos solicitantes adicionales

3 - La declaración de prioridad en el párrafo III debe declarar la fecha de la presentación previa, el país en el cual fue hecha e indicar el número de expediente, si es posible. En donde el solicitante se basó en una solicitud internacional o una solicitud de patente regional, por ejemplo, solicitud de patente Europea, uno de los países designados en esa solicitud (siendo uno de los que estén bajo el Orden de Patentes (Países Convencionales), deberían estar identificados y el nombre de ese país debe ser indicado en el espacio en donde se pide

4 - En donde el solicitante o solicitantes es/son el único inventor o inventores en sociedad, párrafo IV deben completarse llenando el recuadro con la palabra "SI" en la declaración (a) y la palabra "NO" en el recuadro en la declaración alternativa (b). En donde no es el caso, la palabra "NO" en el recuadro de la declaración (a) debe ser marcada y se requiere una declaración para ser presentada en la Forma de Patentes 8

5 - Si el solicitante ha nombrado a un agente para actuar en su nombre, el nombre del agente debe ser indicado en los espacios disponibles en el párrafo V

6 - La dirección para servicio de Singapur a la cual todos los documentos pueden ser enviados debe estar declarado en el párrafo VI. Es recomendable que se indique un número telefónico en caso de que no se nombre algún agente

7 - En donde la solicitud sea hecha por virtud de la sección 20(3), 26(6) o 47(4), la sección apropiada debe ser identificada en el párrafo VII y el número de la solicitud anterior o cualquier patente otorgada de la misma identificada

36
33

8 - Cuando el solicitante desea que se revele pronto por él la invención en una Exhibición Internacional para ser omitida de acuerdo con la sección 14(4) (c), entonces la palabra "SI" en el recuadro del párrafo VIII debe estar indicada. De otra manera la palabra "NO" en el recuadro debe ser indicada.

9 - En la revelación de la invención si el solicitante se refiere a uno o más micro-organismos depositados en una oficina de depósito autorizada bajo el Tratado de Budapest, entonces la palabra "SI" en el recuadro del párrafo XI debe ser marcado. De otra manera la palabra "NO" en el recuadro debe ser indicado.

10 - Ponga atención a las reglas 90 y 105 del Reglamento de Patentes de 1995. En donde hay más de tres solicitantes, ver también la Nota 2 anterior.

11 - Solicitantes residentes de Singapur se les recuerda que si el Registro de Patentes considera que una solicitud contiene información de publicación la cual puede ser perjudicial para la defensa de Singapur o la seguridad pública, será prohibida o restringida su publicación o comunicación. Cualquier persona residente de Singapur que desee solicitar la protección para patente en cualquier otro país, debe obtener permiso para el Registro de Patentes de Singapur a menos que ellos hayan solicitado una patente para la misma invención en Singapur. En el último caso, ninguna solicitud debe ser hecha en el extranjero hasta que por lo menos hayan pasado dos meses después de que la solicitud ha sido presentada en Singapur.

Para uso oficial

Fecha de la solicitud de Patente

/ /

Solicitud recibida en

/ /

Derecho recibido en

/ /

Cantidad

/ /

*Dinero en Efectivo/Orden de Pago No

* Borre lo que no sea aplicable

Formas de Patentes 1-3

PROCESO PARA PREPARAR UN ADEREZO HIDROLIZADO

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un proceso para preparar de un aderezo hidrolizado, más particularmente con la preparación de un aderezo hidrolizado por hidrólisis biológica de
10 un material que contiene proteína

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En nuestro documento co-pendiente EP-A-0824873,
15 describimos un proceso para la preparación de un aderezo, que comprende preparar proteína koji fermentada a partir de un material que contiene proteína y un carbohidrato, e hidrolizar la proteína koji fermentada a una temperatura entre 15°C y 60°C y un pH de 4.5 a 10 durante un periodo de aproximadamente 6 horas a 28
20 días, caracterizado porque la inoculación con un cultivo de bacterias de ácido láctico a una densidad de inoculación de 10^3 a 10^7 ufc/g de proteína koji fermentada, se lleva a cabo ya sea en la etapa de proteína koji fermentada o en la etapa de hidrólisis. El propósito de las bacterias de ácido láctico es inhibir el
25 desarrollo de bacterias contaminantes y proteger al koji de fermen

38
35

tación anormal y putrefacción causada por tales bacterias contaminantes

Algunas bacterias de ácido láctico, por ejemplo, *Lactobacillus sake* (*L. sake*) produce peptidasas y enzimas hidrolizantes de fibras. Se ha utilizado el equipo API ZYM para detectar actividades enzimáticas producidas por las bacterias de ácido láctico tales como fosfatasas, lipasas, aminopeptidasas (leucil-, valil-, cistil-), proteasa (quimiotripsina) y carbohidrasas (galactosidasa, glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa). Sin embargo, no producen actividad de glutaminasa extracelularmente. Entre las carbohidrasas que se producen, la N-acetil- β -glucosaminidasa es una enzima hidrolizante de fibra. El sustrato de esta enzima, la N-acetil- β -glucosamina, comúnmente se encuentra en la quitina. En otras palabras, estas bacterias de ácido láctico producen quitinasa capaz de degradar las cadenas de polisacáridos de las paredes de las células de los hongos. Cuando se utiliza API 50 CHL para la caracterización de estas bacterias de ácido láctico, se ha demostrado que son capaces de descomponer manosa, ramnosa, N-acetil- β -glucosamina, melibiosa, sacarosa, trealosa, β -gentiobiosa y gluconato. Todos estos son carbohidratos encontrados comúnmente en las paredes de células vegetales. Entre ellos, la gluconasa también es una enzima que degrada las paredes de las células de los hongos.

Estas propiedades vuelven a las bacterias de ácido lác

tico una fuente valiosa de enzimas proteolíticas e hidrolizantes de fibra además de su comportamiento protector

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

5 Hemos encontrado que, en la preparación de un aderezo hidrolizado, hidrolizando un substrato de material que contiene proteína con enzimas que contienen actividades proteolíticas y actividades hidrolizantes de fibra, se observa una mejora sorprendente en las propiedades organolépticas del aderezo Esta
10 mejora se puede obtener con o sin la preparación de koji y/o en presencia o ausencia de bacterias de ácido láctico

En consecuencia, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de un aderezo hidrolizado el cual comprende hidrolizar un substrato de material que contiene
15 proteína con enzimas que contienen actividades proteolíticas y actividades hidrolizantes de fibra

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 El substrato de material que contiene proteínas puede ser un material de proteína vegetal tal como soja, germen de trigo, gluten de maíz, gluten de arroz, gluten de trigo, etc , o puede ser una proteína koji fermentada, preparada a partir del material que contiene proteína y un carbohidrato, por ejemplo, al
25 fermentar uno o más materiales que contengan proteína juntos con

40
37

un carbohidrato con un cultivo de *Aspergillus oryzae* y/o *Aspergillus sojae*. El carbohidrato puede ser, por ejemplo, harina de trigo, trigo tostado o salvado de trigo.

5 Cuando el material que contiene proteína es un gluten el cual experimentará una fermentación koji, se utiliza ventajosamente como un sustrato en forma de gránulos, formando una masa, que comprende agregar agua a un gluten seco en una cantidad de 19 a 60% en peso en base en el peso de la masa, granular la masa y si es necesario, agregar agua para ajustar el
10 contenido de humedad de 35 a 60% en peso, en base en el peso de los gránulos antes de esterilizar los gránulos por tratamiento con vapor. La preparación de los gránulos como sustrato que soporta la fermentación koji de las materias primas anteriores y las condiciones de fermentación koji se describen en nuestro
15 documento co-pendiente SG-A-9800488-0.

El material que contiene proteína es un sustrato el cual puede contener de 30 a 100% de proteína, preferiblemente de 70 a 90% de proteína.

Si se desea, el sustrato de material que contiene
20 proteína se puede inocular con una bacteria de ácido láctico para propósitos protectores. Las bacterias de ácido láctico pueden ser, por ejemplo, *L. sake*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. pentosaceus*.

La fuente de la enzima que contiene actividades
25 proteolíticas pueden ser microorganismos tales como bacterias,

hongos o levaduras, etc , por ejemplo la enzima puede ser la enzima producida durante la fermentación koji, las enzimas proteolíticas producidas por bacterias de ácido láctico utilizadas para inocular el sustrato de material proteínico, una
5 enzima proteolítica técnica, o puede ser una combinación de dos o más de estas enzimas La enzima técnica puede ser, por ejemplo , una proteasa, peptidasa o glutaminasa (por ejemplo Alcalase y Flavorzyme de Novo Nordisk, Glutaminase de Amano Pte Ltd) Las enzimas técnicas generalmente son enzimas que se han aislado y
10 purificado para remover actividades que interfieran, las cuales pueden ser dañinas al procesamiento La enzima técnica que contiene actividades proteolíticas se puede agregar al sustrato de proteína vegetal antes de la fermentación koji o se puede agregar al hidrolizado

15 La fuente de la enzima que contenga actividades hidrolizantes de fibra pueden ser microorganismos tales como bacterias, hongos o levaduras, etc , por ejemplo, puede ser una cantidad pequeña de enzima hidrolizante de fibra producida durante la fermentación koji, las enzimas hidrolizantes de fibra
20 producidas por las bacterias de ácido láctico utilizadas para inocular el sustrato de material proteínico, una enzima técnica hidrolizante de fibra o puede ser una combinación de dos o más de estas fuentes La enzima técnica hidrolizante de las fibras puede ser, por ejemplo, Hemicellulase de Amano Pte Ltd, Celluclast de
25 Novo Nordisk, o Depol 40L de Biocatalyst Pte Ltd La enzima que

contenga actividades hidrolizantes de fibras se puede agregar al sustrato de proteína vegetal antes de la fermentación koji, o se puede agregar al hidrolizado

Entre los sustratos proteínicos, el gluten de maíz
5 tiene la mejora más significativa de rendimiento de hidrólisis utilizando una enzima que posea actividad de enzima hidrolizante de fibra. El gluten de maíz contiene un alto porcentaje de carbohidratos (16.5%) y fibras (5.7%). Estos carbohidratos complejos forman una membrana intacta cuando se encuentra en su
10 interior. La proteína de maíz tiene el efecto enmascarante de la red de carbohidratos que afecta en gran medida la accesibilidad de la proteína de maíz por proteasas o peptidasas. Para incrementar la accesibilidad de la proteína de maíz, por lo tanto es necesario descomponer la membrana de los carbohidratos por enzimas
15 hidrolizantes de fibra. Aunque no se desea unirse a ninguna teoría, para el sistema koji, se considera que estas enzimas hidrolizantes de fibra hidrolizan las paredes celulares de los micelios de *Aspergillus* en koji, lo que provoca la liberación de peptidasas y glutaminasas intracelulares de koji dentro del
20 hidrolizado. Estas peptidasas y glutaminasas extracelulares definitivamente son más eficientes, lo que lleva a un incremento en los rendimientos de nitrógeno de formol y de ácido glutámico.

La hidrólisis del sustrato de material que contiene proteína se puede llevar a cabo a una temperatura de 2° a 65°C, y
25 a un pH de 4.5 a 10, durante un periodo de 6 horas a 28 días, por

43
40

ejemplo, como se describe en EP 0640294 o en nuestras solicitudes de patente co-pendientes EP-A-0829205, EP-A-0824873 o EP-A-0913097, que se incorporan en su totalidad en la presente como referencia. En las últimas dos solicitudes, se lleva a cabo una
5 inoculación con un cultivo de una bacteria de ácido láctico a una densidad de inoculación desde 10^3 a 10^7 ufc/g de proteína koji fermentada, ya sea en la etapa de proteína koji fermentada o en la etapa de hidrólisis. En la presente invención, la inoculación en el sustrato de material que contiene proteína con un cultivo
10 de una bacteria de ácido láctico a una densidad de inoculación de 10^3 a 10^7 ufc/g de material que contiene proteína, se puede llevar a cabo ya sea en la etapa de proteína koji fermentada o en la etapa de hidrólisis. La hidrólisis preferiblemente se lleva a cabo a una temperatura entre 15°C y 37°C durante un periodo de 12
15 horas a 5 días, y de manera más preferible a una temperatura entre 37°C y 55°C durante un periodo desde 8 horas a 2 días. Ventajosamente, la hidrólisis se lleva a cabo a un pH de 4.5 a 7.5. La hidrólisis se puede llevar a cabo en ausencia o presencia de una sal, y cuando está presente la sal, la cantidad de la sal
20 puede ser hasta 100% en peso en base en el peso del material proteínico.

Después de la hidrólisis, el material proteínico hidrolizado puede ser presionado para separar una salsa líquida del residuo sólido. La salsa líquida ventajosamente se
25 pasteuriza, por ejemplo, a una temperatura de 90° a 140°C durante

un periodo de 15 segundos a 30 minutos, y después se filtra para proporcionar un aderezo líquido Si se desea, se puede agregar sal ya sea antes o después del prensado o filtrado, para proporcionar un producto que tiene un contenido de sal de 0-60% en peso, en base en el peso de la materia seca Si se desea, la salsa líquida se puede constituir en un polvo, por ejemplo, por concentración, y después secado, por ejemplo secado al vacío hasta un contenido de humedad bajo y finalmente se muele a un polvo para proporcionar un aderezo sólido

10

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente la presente invención

15

Ejemplo 1

Se agrega agua directamente a una mezcla de (6 04 kg) gluten de maíz, (2 16 kg) de harina de trigo y (0 43 kg) salvado de trigo para obtener un contenido de humedad de 45% La masa que se forma se alimenta en un triturador para formar gránulos cilíndricos, cada uno con un diámetro de 4 mm y una longitud de 10 mm Se introduce humedad adicional en los gránulos de manera que el contenido de humedad de los gránulos es de 47% en peso

25

Los gránulos se calientan a 100°C y se mantienen a la misma temperatura durante 10 minutos y se enfrían por debajo de 40°C. Los extruidos enfriados se mezclan con una suspensión líquida de 2.5 g de inóculo de esporas de *Aspergillus oryzae* y 10 g de un cultivo de *L. sake* a 10⁹ ufc/g. La enzima hemicelulasa técnica, Hemicellulase de Amano Pte Ltd (actividad = 90,000 u/g) se agrega a una concentración de 0.43% en peso del extruido cocinado.

Durante las 42 horas de fermentación koji, se mantienen los siguientes perfiles de temperatura para el lecho de cultivo:

0 - 25 horas	30°C
25 - 42 horas	27°C

El koji se mezcla en la hora 18ava a 25ava para asegurar un flujo de aire suficiente a través del lecho del cultivo para buena ventilación. Después de la fermentación koji, se cosecha el koji madurado. La hidrólisis se lleva a cabo en un tanque de hidrólisis agregando agua para obtener un hidrolizado con un sólido total de 18% m/m. La hidrólisis se lleva a cabo a 35°C durante 48 horas y el pH se mantiene constante a 6.0 con adición de una solución de NaOH 40%.

El producto hidrolizado de gluten de maíz tiene un alto contenido de ácido glutámico, de 1.01% m/m. El producto hidrolizado se prensa para separar la salsa de gluten de maíz del

residuo sólido Se agrega sal a una concentración de 15% m/m antes del prensado La salsa de gluten de maíz se trata con calor a 90°C durante 20 minutos La salsa líquida se concentró por evaporación El concentrado que se obtiene se seca en un horno al vacío y se muele hasta pulverizarlo

Para evaluación organoléptica, se diluyen 12.5 g de salsa líquida o 3.5 g de polvo con 250 ml de agua en ebullición En ambos casos, un equipo de prueba, de 8 catadores experimentados encontró que el producto tiene un mejor cuerpo que el producto sin la adición de la enzima técnica de hemicelulasa a los extruidos cocinados

Ejemplo 2

Se lleva a cabo un proceso similar al del ejemplo 1, excepto que la enzima técnica de hemicelulasa se agrega al hidrolizado a una concentración de 0.25% en peso del hidrolizado durante la hidrólisis en vez de los extruidos cocinados antes de la fermentación koji El producto hidrolizado de gluten de maíz producido de esta manera también tiene un alto contenido de ácido glutámico de 0.97% m/m Para evaluación organoléptica, 12.5 g de salsa líquida o 3.5 g de polvo se diluyen con 250 ml de agua en ebullición En ambos casos, un equipo de prueba de ocho catadores experimentados encontró que el producto tiene un mejor cuerpo que un producto sin la adición de la enzima técnica hemicelulasa

47
44

Ejemplo 3

Se calientan 220 kg de agua hasta 35°C en un reactor
Se agregan 60 kg de gluten de maíz pulverizado en el agua con
5 agitación Se agregan dentro del hidrolizado 380 g de enzima
técnica de proteasa Flavourzyme 2 4L (de Novo Nordisk) También
se inocula un cultivo de *L sake* en el hidrolizado de manera que
se obtiene una cuenta de 10^6 ufc/ml La temperatura y el pH se
controlan a 35°C y 6.0, respectivamente, durante 48 horas Se
10 encontró que el producto hidrolizado de esta manera tiene un
mayor contenido de ácido glutámico (0.4% m/m) en comparación con
el producto sin la inoculación de *L sake* (0.2% m/m)

El hidrolizado se procesa adicionalmente como en el
ejemplo 1 para producir polvo de salsa de gluten de maíz También
15 se obtiene una mejor calidad microbiológica durante la hidrólisis
en comparación con el producto sin la inoculación de *L sake* Un
equipo de prueba de ocho catadores experimentados encontró que el
producto tiene un mejor cuerpo que un producto sin la adición de
L sake

20

Ejemplo 4

Se lleva a cabo un procedimiento similar al del ejemplo
3, excepto que se agregan en el hidrolizado al momento de la
25 hidrólisis 380 g de enzima técnica de proteasa, Flavourzyme 2 4L

48
45

(de Novo Nordisk) y 700 g de enzima técnica hemicelulasa, Hemicellulase de Amano Pte Ltd (actividad = 90,000 u/g) El producto hidrolizado de gluten de maíz producido de esta manera tiene un alto contenido de ácido glutámico de 0.83% m/m. Un
5 equipo de prueba de ocho catadores experimentados encontró que el producto tiene un mejor cuerpo que un producto sin la adición de la enzima técnica de hemicelulasa, es decir, un cuerpo incluso mejor que el del producto del ejemplo 3 debido a la presencia de enzima hidrolizante de fibra adicional, la hemicelulasa, además
10 de la derivada de *L sake*

Ejemplo 5

Se llevó a cabo un procedimiento similar como en el
15 ejemplo 1, excepto que se produjo koji en base en el gluten de trigo, en vez de gluten de maíz y se agregó la enzima técnica hemicelulasa, Hemicellulase de Amano Pte Ltd (actividad = 90,000 u/g), al hidrolizado a una concentración de 0.25% del peso del
hidrolizado al inicio de la hidrólisis. El polvo de gluten de
20 trigo, en una relación de 7:3 respecto al koji de gluten de trigo, se agrega en el hidrolizado durante la hidrólisis. La cantidad de agua se ajusta de manera que el hidrolizado tiene un total de sólidos de 18% m/m.

25 Se encontró que el producto hidrolizado tiene mayor

49
46

ácido glutámico (2 10% m/m) y nitrógeno de formol (0 95% m/m) en comparación con el producto sin la inoculación de la enzima técnica de hemicelulasa (1 76% m/m y 0 88% m/m, respectivamente)

Un equipo de prueba de ocho catadores experimentados encontró que el producto tiene un mejor cuerpo que un producto sin la adición de enzima técnica de hemicelulasa

Ejemplo 6

Se lleva a cabo un procedimiento similar al del ejemplo 5, excepto que no se agrega la enzima hidrolizante de fibra, se agrega polvo de gluten de maíz en el hidrolizado en vez de polvo de gluten de trigo, y la relación de koji respecto al polvo es de 7 3 en vez de 3 7, 380 g de la enzima técnica de proteasa, Flavourzyme 2 4L (de Novo Nordisk) y 380 g de la enzima técnica de proteasa, Alcalase 1 5L (de Novo Nordisk) también se agregan en el hidrolizado al inicio de la hidrólisis. El producto hidrolizado elaborado de esta manera tiene un alto contenido de ácido glutámico de 1 83% m/m

20

Un equipo de prueba de ocho catadores experimentados encontró que el producto tiene un mejor cuerpo que un producto sin la adición de L sake como la fuente de la enzima hidrolizante de fibra

25

50
47

Ejemplo 7

Se llevó a cabo un procedimiento similar al del ejemplo 1, excepto que se suprimió el cultivo de *L sake*

5 Un equipo de prueba de ocho catadores experimentados encontró que el producto tiene un mejor cuerpo que un producto sin la adición de la enzima hemicelulasa

57
48

REIVINDICACIONES

1 Un proceso para la preparación de un aderezo
hidrolizado, que comprende hidrolizar un substrato de material
5 que contiene proteína con enzimas que contienen actividades
proteolíticas y actividades hidrolizantes de fibra

2 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde el substrato de material que contiene proteína es soja,
10 germen de trigo, gluten de maíz, gluten de arroz o gluten de
trigo

3 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde el substrato de material que contiene proteína es koji
15 de proteína fermentada preparada a partir del material que
contiene proteína y un carbohidrato

4 Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en
donde el koji de proteína fermentada se prepara al fermentar uno
20 o más materiales que contienen proteína junto con un carbohidrato
con un cultivo de *Aspergillus oryzae* y/o *Aspergillus sojae*

5 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la enzima que contiene actividades proteolíticas se
25 deriva de bacterias, hongos o levaduras

32
49

6 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la enzima que contiene actividades proteolíticas es la
enzima producida durante la fermentación koji, las enzimas
proteolíticas producidas por las bacterias de ácido láctico
5 utilizadas para inocular el sustrato de material de proteína,
una enzima técnica proteolítica, o una combinación de dos más
de estas enzimas

7 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
10 en donde la enzima que contiene actividades hidrolizantes de
fibras se derivan de bacterias, hongos o levaduras

8 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la enzima que contiene actividades hidrolizantes de
15 fibra es una enzima hidrolizante de fibra producida durante la
fermentación koji, las enzimas hidrolizantes de fibras producidas
por las bacterias de ácido láctico utilizadas para inocular el
sustrato de material de proteína, una enzima técnica hidrolizante
de fibra, o puede ser una combinación de dos o más de estas
20 enzimas

9 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la enzima que contiene actividad proteolítica se agrega
al sustrato de proteína vegetal antes de la fermentación koji o
al hidrolizado

25

3
50

10 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la enzima hidrolizante de fibra se agrega al substrato
de proteína vegetal antes de la fermentación koji o al
hidrolizado

5

11 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la hidrólisis del substrato de material que contiene
proteína se lleva a cabo a una temperatura de 2° a 65°C, a un pH
de 4.5 a 10 durante un periodo de 6 horas a 28 días

10

12 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde se inocula un cultivo de una bacteria de ácido láctico
en el substrato de material que contiene proteína a una densidad
de inoculación de 10^7 a 10^9 ufc/g de material que contiene
15 proteína ya sea en la etapa koji de proteína fermentada en
etapa de hidrólisis

13 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura entre
20 15°C y 37°C durante un periodo de 12 horas a 5 días

14 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura de entre
37°C y 55°C durante un periodo de 8 horas a 2 días

25

54
51

15 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la hidrólisis se lleva a cabo a un pH de 4.5 a 7.5

5 16 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde la hidrólisis de material proteínico se lleva a cabo en
ausencia o presencia de sal

17 El proceso como se describe en la reivindicación
16, en donde cuando la sal está presente, la cantidad es hasta
10 100% en peso en base en el peso del material proteínico

18 El proceso como se describe en la reivindicación 1,
en donde, después de la hidrólisis, el material de proteína
hidrolizado se prensa para separar una salsa líquida de un
15 residuo sólido

19 El proceso como se describe en la reivindicación
18, en donde la salsa líquida se pasteuriza a una temperatura de
90° a 140°C durante un periodo de 15 segundos a 30 minutos y
20 después se filtra para proporcionar un aderezo líquido

20 El proceso como se describe en la reivindicación
19, en donde, cuando la sal está ausente durante la hidrólisis,
se agrega sal ya sea antes o después del prensado para
25 proporcionar un producto que tiene un contenido de sal de -

85
52

0-60% en peso, en base en el peso de la materia seca

21 El proceso como se describe en la reivindicación
20, en donde la salsa líquida se elabora en un polvo por
concentración, después se seca a un bajo contenido de humedad y
5 finalmente se muele hasta un polvo para proporcionar un aderezo
sólido

22 Un proceso para la preparación de un hidrolizado
seco para uso como una base para un agente de aromatización en
10 productos culinarios, el cual comprende secar la pasta obtenida
de acuerdo con la reivindicación 21 a un nivel de agua residual
de hasta 2%

23 Un aderezo hidrolizado obtenible por un proceso
15 como se describe en cualquiera de las reivindicaciones
precedentes

20

25

53

R E S U M E N

Se describe un proceso para la producción de un aderez
5 hidrolizado, el cual comprende hidrolizar un material que
contiene proteína con enzimas las cuales contienen actividades
proteolíticas y actividades hidrolizantes de fibra El
hidrolizado puede ser utilizado como una salsa líquida, como una
pasta o un polvo seco como una base para un agente de
10 aromatización en productos culinarios

15

20

25

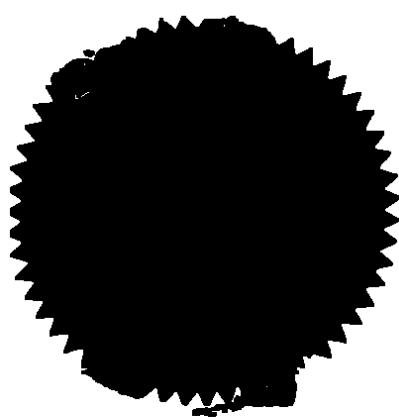
Societe
6329/10 Sp

54

**REGISTRY OF PATENTS
SINGAPORE**

This is to certify that the annexed is a true copy of the following
Singapore patent application as filed in this Registry

Date of Filing	02 DECEMBER 1999
Application Number	9906087-3
Applicant(s)	SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S A
Title of Invention	PRODUCTION OF HYDROLYSATE SEASONING




Tan Kar Leng (Miss)
Assistant Registrar
for REGISTRAR OF PATENTS
SINGAPORE
07 NOVEMBER 2000

The Registrar of Patents
Registry of Patents

REQUEST FOR THE GRANT OF A PATENT

THE GRANT OF A PATENT IS REQUESTED BY THE UNDERSIGNED ON THE
BASIS OF THE PRESENT APPLICATION

I Title of Invention	PRODUCTION OF HYDROLYSATE SEASONING			
II Applicant(s) (see note 2)	(a) Name	SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A		
	Body Description/ Residency	INCORPORATED IN SWITZERLAND		
	Street Name & Number	P O BOX 353, 1800 VEVEY		
	City			
	State			
	Country	Switzerland		
	(b) Name			
	Body Description/ Residency			
	Street Name & Number			
	City			
	State			
	Country			
	(c) Name			
	Body Description/ Residency			
	Street Name & Number			
	City			
	State			
	Country			
III Declaration of priority (see note 3)	Country/Country Designated		File No	
	Filing Date			
	Country/Country Designated		File No	
	Filing Date			
	Country/Country Designated		File No	
	Filing Date			

9906087-3

IV Inventors <i>(See note 4)</i> (a) The applicant(s) is/are the sole/joint inventor(s) (b) A statement on Patents Form 8 is/WHICH furnished	☐ Yes ☒ No ☒ Yes ☐ No			
V Name of Agent (if any) <i>(See note 5)</i>	DREW & NAPIER			
VI Address for Service <i>(See note 6)</i>	Block/Hse No		Level No	
	Unit No/PO Box	152	Postal Code	900302
	Street Name	Robinson Road		
	Building Name			
VII Claiming an earlier filing date under section 20(3), 26(6) or 47(4) <i>(See note 7)</i>	Application No	---		
	Filing Date			
VIII Invention has been displayed at an International Exhibition <i>(See note 8)</i>	☐ Yes ☒ No			
IX Section 114 requirements <i>(see note 9)</i>	The invention relates to and/or used a micro-organism deposited for the purposes of disclosure in accordance with section 114 with a depositary authority under the Budapest Treaty ☐ Yes ☒ No			
X Check List (To be filled in by applicant or agent)	A The application contains the following number of sheet(s) -			
	1 Request	3	sheets	
	2 Description	8	sheets	
	3 Claim(s)	3	sheets	
	4 Drawing(s)	0	sheets	
	5 Abstract	1	sheets	
	B The application as filed is accompanied by -			
1 Priority document				
2 Translation of priority document				
3 Statement of Inventorship & right to grant	X			
4 International Exhibition Certificate				
X Signature(s) <i>(see note 10)</i>	Applicant (a)	DREW & NAPIER <i>D</i>		
	Date	1 DEC 1999		
	Applicant (b)			
	Date			
	Applicant (c)			
	Date			

NOTES

- 1 This form when completed should be brought or sent to the Registry of Patents together with the prescribed fee and 3 copies of the description of the invention and of any drawings
- 2 Enter the name and address of each applicant in the space provided at paragraph II. Names of individuals should be indicated in full and the surname or family name should be underlined. The names of all partners in a firm must be given in full. The place of residence of each individual should also be furnished in the space provided. Bodies corporation should be designated by their corporate name and country of incorporation and where appropriate the state of incorporation whicum that country should be entered where provided. Where more than three applicants are to be named the name and address of the fourth and any further applicants should be given on a sheet attached to this Form together with the signature of each of these further applicants
- 3 The declaration of priority at paragraph III should state the date of the previous filing the country in which it was made and indicated the file number if available. Where the application relied upon in an International Application or a regional patent application e.g. European patent application one of the countries designated in that application (being one falling under the Patents (Conventional Countries) Order) should be identified and the name of that country should be entered in the space provided
- 4 Where the applicant or applicants is/are the sole inventor or the joint inventors paragraph IV should be completed by making the YES Box in the declaration (a) and the NO Box in the alternative statement (b). Where this is not the case the NO Box in declaration (a) should be marked and a statement will be required to be filed on Patents Form 8
- 5 If the applicant has appointed an agent to act on his behalf the agent's name should be indicated in the spaces available at paragraph V
- 6 An address for service in Singapore to which all documents may be sent must be stated at paragraph VI. It is recommended that a telephone number be provided if an agent is not appointed
- 7 Where an application is made by virtue of section 20(3), 26(6) or 47(4) the appropriate section should be identified at paragraph VII and the number of the earlier application or any patent granted thereon identified
- 8 When the applicant wishes an earlier disclosure of the invention by him at an International Exhibition to be disregarded in accordance with section 14(4)(c) then the YES box at paragraph VIII should be marked. Otherwise the NO box should be marked
- 9 Where in disclosing the invention the application refers to one or more micro-organisms deposited with a depository authority under the Budapest Treaty then the YES box at paragraph XI should be marked. Otherwise the NO box should be marked
- 10 Attention is drawn to rules 90 and 105 of the Patent Rules 1995. Where there are more than three applicants see also Note 2 above
- 11 Applicants resident in Singapore are reminded that if the Registry of Patents considers that an application contains information the publication of which might be prejudicial to the defence of Singapore or the safety of the public it may prohibit or restrict its publication or communication. Any person resident in Singapore and wishing to apply for patent protection in other countries must first obtain permission from the Singapore Registry of Patents unless they have already applied for a patent for the same invention in Singapore. In the latest case no application should be made overseas until at least two months after the application has been filed in Singapore

For Official Use

Application Filing Date	/	/
Request recieved on	/	/
Fee received on	/	/
Amount	/	/
* Cash/Cheque/Money Order No		

* Delete whichever is inapplicable

PRODUCTION OF HYDROLYSATE SEASONING

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates to a process for the production of a hydrolysate seasoning, more particularly to the production of hydrolysate seasoning by the biological hydrolysis of a protein containing material

BACKGROUND OF THE INVENTION

10

In our co-pending EP-A-0824873, we described a process for the production of a seasoning which comprises preparing a fermented protein koji from a protein containing material and a carbohydrate, hydrolysing the fermented protein koji at a temperature between 15°C and 60°C and a pH of from 4.5 to 10 for a period of
 15 from 6 hours to 28 days characterised in that inoculation with a culture of a lactic acid bacteria at an inoculation density of from 10^3 to 10^7 cfu/g of fermented protein koji is carried out either in the fermented protein koji stage or in the hydrolysis stage. The purpose of the lactic acid bacteria is to inhibit the growth of contaminating bacteria and protect the koji from abnormal fermentation and
 20 putrefaction caused by such contaminating bacteria.

Some lactic acid bacteria e.g. *Lactobacillus sake* (*L.sake*) produce peptidases and fiber hydrolysing enzymes. API ZYM kit has been used to detect enzymatic activities produced by the lactic acid bacteria such as phosphatases, lipases,
 25 aminopeptidases (leucyl-, valyl-, cystyl-), protease (chymotrypsin) and carbohydrases (galactosidase, glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase). However they do not produce glutaminase activity extracellularly. Among the carbohydrases that are produced, N-acetyl- β -glucosaminidase is a fiber hydrolysing enzyme. The substrate of this enzyme, N-acetyl- β -glucosamine, is
 30 commonly found in chitin. In other words, these lactic acid bacteria produce Chitinase capable of degrading the polysaccharide chains of fungal cell walls. When API 50 CHL is used in the characterisation of these lactic acid bacteria, it is shown that they are able to break down Mannose, Rhamnose, N-acetyl- β -glucosamine, Melibiose, Saccharose, Trehalose, β -Gentiobiose and Gluconate. All
 35 these are carbohydrates commonly found in plant cell wall. Among them, Gluconase is also a fungal cell wall degrading enzyme.

02 DEC 1999

9906087-

These properties make such lactic acid bacteria a valuable source of proteolytic and fiber hydrolysing enzymes in addition to its protective behaviour

5 SUMMARY OF THE INVENTION

We have found that, in the production of a hydrolysate seasoning, by hydrolysing a protein containing material substrate with enzymes containing proteolytic activities and fiber hydrolysing activities, a surprising improvement in the organoleptic properties of the seasoning was observed. This improvement may be achieved with or without the preparation of koji and/or in the presence or absence of lactic acid bacteria

Accordingly, the present invention provides a process for the production of a hydrolysate seasoning which comprises hydrolysing a protein containing material substrate with enzymes containing proteolytic activities and fiber hydrolysing activities

20 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The protein containing material substrate may be a plant protein material such as soya, wheat germ, corn gluten, rice gluten, wheat gluten, etc or it may be a fermented protein koji prepared from the protein containing material and a carbohydrate, for example, by fermenting one or more protein containing materials together with a carbohydrate with a culture of *Aspergillus oryzae* and/or *Aspergillus sojae*. The carbohydrate may be, for instance, wheat flour, roasted wheat or wheat bran

When the protein containing material is a gluten which will undergo a koji fermentation, it is advantageously used as a substrate in the form of pellets, by forming a dough which comprises adding water to a dried gluten in an amount of from 19 to 60% by weight based on the weight of the dough, pelletising the dough and, if necessary, adding water to adjust the moisture content to from 35 to 60% by weight based on the weight of the pellets before sterilising the pellets by steam treatment. The preparation of the pellets as substrate support for Koji fermentation

from the above raw materials and the conditions for koji fermentation are described in our copending SG-A-9800488-0

5 The protein containing material is a substrate which may contain from 30 to 100% of protein, preferably from 70 to 90% of protein

If desired, the protein containing material substrate may be inoculated with a lactic acid bacteria for protective purposes. The lactic acid bacteria may be, for instance, *L. sake*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. pentosaceus*

10

The source of the enzyme containing proteolytic activities may be microorganisms such as bacteria, fungi or yeasts, etc., for instance the enzyme may be the enzyme produced during koji fermentation, the proteolytic enzymes produced by the lactic acid bacteria used to inoculate the protein material substrate, a technical

15

proteolytic enzyme, or it may be a combination of two or more of these enzymes. The technical enzyme may be, for instance, a protease, peptidase or glutaminase (e.g. Alcalase and Flavorzyme from Novo Nordisk, Glutaminase from Amano Pte Ltd). Technical enzymes are generally enzymes that have been isolated and purified to remove interfering activities which would be detrimental to processing.

20

The technical enzyme containing proteolytic activities may be added to the plant protein substrate prior to koji fermentation or it may be added to the hydrolysate.

The source of the enzyme containing fiber hydrolysing activities may be microorganisms such as bacteria, fungi or yeasts, etc., for instance it may be the small amount of fiber hydrolysing enzyme produced during koji fermentation, the fiber hydrolysing enzymes produced by the lactic acid bacteria used to inoculate the protein material substrate, a technical fiber hydrolysing enzyme, or it may be a combination of two or more of these sources. The technical fiber hydrolysing enzyme may be, for instance, Hemicellulase from Amano Pte Ltd, Celluclast from Novo Nordisk, or Depol 40L from Biocatalyst Pte Ltd. The enzyme containing fiber hydrolysing activities may be added to the plant protein substrate prior to koji fermentation, or it may be added to the hydrolysate.

25

30

Among the protein substrates, corn gluten has the most significant improvement of the hydrolysis yield using an enzyme that possesses the fiber hydrolysing enzyme activity. Corn gluten contains a high percentage of carbohydrates (16.5%)

35

and fibers (5-7%) These complex carbohydrates form an intact membrane where corn proteins are found within The masking effect of the carbohydrate network greatly affects the accessibility of the corn protein by proteases or peptidases To increase the accessibility of the corn protein, it is therefore necessary to break
5 down the carbohydrate membrane by fiber hydrolysing enzymes Although not wishing to be bound by theory, for the koji system, it is thought that these fiber hydrolysing enzymes hydrolyse the cell walls of the *Aspergillus* mycelia in koji, causing the release of intracellular koji peptidases and glutaminases into the hydrolysate These extracellular peptidases and glutaminases would definitely be
10 more efficient, leading to an increase in formol nitrogen and glutamic acid yields

The hydrolysis of the protein containing material substrate may be carried out at a temperature from 2° to 65°C at a pH from 4.5 to 10 for a period of from 6 hours to 28 days, e.g. as described in EP 0640294 or our co-pending patent applications
15 EP-A-0829205, EP-A-0824873 or EP-A-0913097, the entirety of which are hereby incorporated by reference In the latter two applications, inoculation with a culture of a lactic acid bacteria at an inoculation density of from 10^3 to 10^7 cfu/g of fermented protein koji is carried out either in the fermented protein koji stage or in the hydrolysis stage In the present invention, inoculation in the protein
20 containing material substrate with a culture of a lactic acid bacteria at an inoculation density of from 10^3 to 10^9 cfu/g of protein containing material may be carried out either in the fermented protein koji stage or in the hydrolysis stage The hydrolysis is preferably carried out at a temperature between 15°C and 37°C for a period of from 12hr to 5 days, and more preferably at a temperature between
25 37°C and 55°C for a period of from 8hr to 2 days Advantageously, the hydrolysis is carried out at a pH of from 4.5 to 7.5 The hydrolysis may be carried out in the absence or presence of salt, and when salt is present, the amount of salt may be up to 100% by weight based on the weight of the protein material

30 After the hydrolysis, the hydrolysed protein material may be pressed to separate a liquid sauce from a solid residue The liquid sauce is advantageously pasteurised e.g. at a temperature of from 90° to 140°C for a period of from 15 seconds to 30 minutes and then filtered to give a liquid seasoning If desired, salt may be added either before or after pressing or filtering to give a product having a salt content of
35 0-60% by weight based on the weight of dried matter If desired, the liquid sauce

may be made into a powder for instance, by concentration, then dried, e g vacuum dried to a low moisture content and finally milled into a powder to give a solid seasoning

5 EXAMPLES

The following Examples further describe the present invention

Example 1

10

Water was added directly to a mixture of corn gluten (6 04kg), wheat flour (2 16kg) and wheat bran (0 43kg) to obtain a moisture content of 45% The dough formed was fed into a mincer to form cylindrical pellets each having a diameter of 4mm and a length of 10mm Additional moisture was introduced to the pellets
15 such that the moisture content of the pellets was 47% by weight

20

The pellets were heated to 100°C and held at the same temperature for 10 minutes and cooled to below 40°C The cooked extrudates were mixed with a liquid suspension of 2 5g of *Aspergillus oryzae* spores inoculum and 10 g of a culture of *L. sake* at 10⁹ cfu/g The technical hemicellulase enzyme, Hemicellulase from Amano Pte Ltd (activity= 90,000u/g), was added at a concentration of 0 43% of weight of cooked extrudate

25

During the 42 hours of Koji fermentation, the following temperature profiles were maintained for the culture bed

0 - 25 hours	30°C
25 - 42 hours	27°C

30

The Koji was mixed at 18th and 25th hours to ensure sufficient airflow through the culture bed for good ventilation After the koji fermentation, the matured koji was harvested Hydrolysis was carried out in a hydrolysis tank by adding water to obtain a hydrolysate with a total solid of 18%_{m/m} The hydrolysis was carried out at 35°C for 48 hours and the pH was kept constant at 6 0 with addition of a 40%
35 NaOH solution

The corn gluten hydrolysed product has a high glutamic acid content of 1.01% m/m. The hydrolysed product was pressed to separate corn gluten sauce from solid residue. Salt was added to the level of 15% m/m before pressing. The corn gluten sauce was heat treated at 90°C for 20 minutes. The liquid sauce was concentrated by evaporation. The concentrate obtained was dried in a vacuum oven and milled into powder.

For organoleptic evaluation, 12.5g of liquid sauce or 3.5g of powder were diluted with 250 ml of boiling water. In both cases, a tasting panel of 8 experienced tasters found the product to have a better body than a product without the addition of the technical hemicellulase enzyme to the cooked extrudates.

Example 2

A similar procedure was carried out as example 1 except that the technical hemicellulase enzyme was added to the hydrolysate at a concentration of 0.25% of the weight of hydrolysate during hydrolysis instead of to the cooked extrudates before koji fermentation. The corn gluten hydrolysed product thus produced also has a high glutamic acid content of 0.97% m/m. For organoleptic evaluation, 12.5g of liquid sauce or 3.5g of powder were diluted with 250 ml of boiling water. In both cases, a tasting panel of 8 experienced tasters found the product to have a better body than a product without the addition of the technical hemicellulase enzyme.

Example 3

220kg of water was heated up to 35°C in a reactor. 60 kg of corn gluten powder was added into the water with stirring. 380g of technical protease enzyme, Flavourzyme 2.4L (from Novo Nordisk) were added into the hydrolysate. *L. sake* culture was also inoculated in the hydrolysate such that a count of 10^6 cfu/ml was obtained. Temperature and pH were controlled at 35°C and 6.0 respectively, for 48 hours. The hydrolysed product produced this way was found to have a higher glutamic acid (0.4% m/m) compared to the product without the inoculation of *L. sake* (0.2% m/m).

The hydrolysate was further processed as in example 1 to produce corn gluten sauce powder. A better microbiological quality during hydrolysis was also achieved compared to the product without the inoculation of *L. sake*. A tasting panel of 8 experienced tasters found the product to have a better body than a product without the addition of *L. sake*.

Example 4

A similar procedure was carried out as example 3 except that 380g of technical protease enzyme, Flavourzyme 24L (from Novo Nordisk) and 700g of technical hemicellulase enzyme, Hemicellulase from Amano Pte Ltd (activity = 90,000u/g), was added in the hydrolysate at the onset of hydrolysis. The corn gluten hydrolysed product thus produced has a high glutamic acid content of 0.83% m/m. A tasting panel of 8 experienced tasters found the product to have a better body than a product without the addition of the technical hemicellulase enzyme, i.e. an even better body to that of the product of example 3 due to the presence of further fiber hydrolysing enzyme, hemicellulase in addition to that derived from the *L. sake*.

Example 5

A similar procedure was carried out as in example 1 except that the koji was produced based on wheat gluten instead of corn gluten and that technical hemicellulase enzyme, Hemicellulase from Amano Pte Ltd (activity = 90,000u/g), was added to the hydrolysate at a concentration of 0.25% of the weight of hydrolysate at the onset of hydrolysis. Wheat gluten powder, at a ratio of 7:3 to the wheat gluten koji was added in the hydrolysate during the hydrolysis. The water quantity was adjusted such that the hydrolysate has a total solid of 18% m/m.

The hydrolysed product was found to have a higher glutamic acid (2.10% m/m) and formol nitrogen (0.95% m/m) compared to the product without the inoculation of the technical hemicellulase enzyme (1.76% m/m and 0.88% m/m respectively). A tasting panel of 8 experienced tasters found the product to have a better body than a product without the addition of the technical hemicellulase enzyme.

65

Example 6

A similar procedure was carried out as example 5 except that fiber hydrolysing enzyme was not added, corn gluten powder was added in the hydrolysate instead of wheat gluten powder and the ratio of koji to powder was 7 3 instead of 3 7 380g of technical protease enzyme, Flavourzyme 2 4L (from Novo Nordisk) and 380g of technical protease enzyme, Alcalase 1 5L (from Novo Nordisk) were also added into the hydrolysate at the onset of hydrolysis The hydrolysed product thus produced has a high glutamic acid content of 1 83%*m/m*

A tasting panel of 8 experienced tasters found the product to have a better body than a product without the addition of the *L sake* as the source of the fiber hydrolysing enzyme

Example 7

A similar procedure was carried out as example 1 except that the culture of *L. sake* was omitted

A tasting panel of 8 experienced tasters found the product to have a better body than a product without the addition of the technical hemicellulase enzyme

CLAIMS

- 1 A process for the production of a hydrolysate seasoning which comprises
hydrolysing a protein containing material substrate with enzymes containing
5 proteolytic activities and fiber hydrolysing activities
- 2 A process according to claim 1 wherein the protein containing material
substrate is soya, wheat germ, corn gluten, rice gluten or wheat gluten
- 10 3 A process according to claim 1 wherein the protein containing material
substrate is a fermented protein koji prepared from the protein containing
material and a carbohydrate
- 15 4 A process according to claim 3 wherein the fermented protein koji is prepared
by fermenting one or more protein containing materials together with a
carbohydrate with a culture of *Aspergillus oryzae* and/or *Aspergillus sojae*
- 20 5 A process according to claim 1 wherein the enzyme containing proteolytic
activities is derived from bacteria, fungi or yeasts
- 25 6 A process according to claim 1 wherein the enzyme containing proteolytic
activities is the enzyme produced during koji fermentation, the proteolytic
enzymes produced by the lactic acid bacteria used to inoculate the protein
material substrate, a technical proteolytic enzyme, or a combination of two or
more of these enzymes
- 30 7 A process according to claim 1 wherein the enzyme containing fiber
hydrolysing activities is derived from bacteria, fungi, or yeasts
- 35 8 A process according to claim 1 wherein the enzyme containing fiber
hydrolysing activities is a fiber hydrolysing enzyme produced during koji
fermentation, the fiber hydrolysing enzymes produced by the lactic acid
bacteria used to inoculate the protein material substrate, a technical fiber
hydrolysing enzyme, or it may be a combination of two or more of these
enzymes

- 9 A process according to claim 1 wherein the enzyme containing proteolytic activity is added to the plant protein substrate before koji fermentation or to the hydrolysate
- 5 10 A process according to claim 1 wherein the fiber hydrolysing enzyme is added to the plant protein substrate before koji fermentation or to the hydrolysate
- 10 11 A process according to claim 1 wherein the hydrolysis of the protein containing material substrate is carried out at a temperature from 2° to 65°C at a pH from 4.5 to 10 for a period of from 6 hours to 28 days
- 15 12 A process according to claim 1 wherein a culture of a lactic acid bacteria is inoculated in the protein containing material substrate at an inoculation density of from 10^3 to 10^9 cfu/g of protein containing material either in the fermented protein koji stage or in the hydrolysis stage
- 13 A process according to claim 1 wherein the hydrolysis is carried out at a temperature between 15°C and 37°C for a period of from 12hr to 5 days
- 20 14 A process according to claim 1 wherein the hydrolysis is carried out at a temperature between 37°C and 55°C for a period of from 8hr to 2 days
- 25 15 A process according to claim 1 wherein the hydrolysis is carried out at a pH of from 4.5 to 7.5
- 30 16 A process according to claim 1 wherein the hydrolysis of the protein material is carried out in the absence or presence of salt
- 17 A process according to claim 16 wherein when salt is present, the amount is up to 100% by weight based on the weight of the protein material
- 18 A process according to claim 1 wherein, after the hydrolysis, the hydrolysed protein material is pressed to separate a liquid sauce from a solid residue

- 19 A process according to claim 18 wherein the liquid sauce is pasteurised at a temperature of from 90° to 140°C for a period of from 15 seconds to 30 minutes and then filtered to give a liquid seasoning
- 5 20 A process according to claim 19 wherein when salt is absent during the hydrolysis, salt is added either before or after pressing to give a product having a salt content of 0-60% by weight based on the weight of dried matter
- 10 21 A process according to claim 20 wherein the liquid sauce is made into a powder by concentration, then dried to a low moisture content and finally milled into a powder to give a solid seasoning
- 15 22 A process for the preparation of a dry hydrolysate for use as a base for an aromatisation agent in culinary products which comprises drying the paste obtained according to claim 21 to a residual water level of up to 2%
- 23 A hydrolysate seasoning obtainable by a process according to any of the preceding claims

PRODUCTION OF HYDROLYSATE SEASONING

ABSTRACT

5

A process for the production of a hydrolysate seasoning which comprises hydrolysing a protein containing material with enzymes which contain proteolytic activities and fiber hydrolysing activities. The hydrolysate may be used as a liquid sauce, a paste or as a dried powder as a base for an aromatisation agent in culinary

10
products