

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

Example 3

Transformation of ABICyano1 with a p6.8 kb Based Shuttle Vector

[00204] The endogenous 6.8 kb plasmid of ABICyano1 was used as a means of shuttling exogenous DNA to cyanobacterial host cells. By inserting an origin of replication that is effective in *E. coli* (such as R6KOri), the p6.8 kb plasmid DNA was able to be manipulated in bacteria, such as *E. coli*, to incorporate genes and sequences of interest into a recombinant p6.8 kb. For example, modifications to decrease the effectiveness of endogenous restriction systems that are present in ABICyano1, such as methylation, were performed.

[00205] The presence of the endogenous origin of replication on the p6.8 plasmid allowed for replication of the recombinant p6.8 kb once it was transferred into a host cell. In some instances, multiple cloning sites were added to allow for several different antibiotic resistance genes to be added, if desired. Multiple cloning sites were also inserted, for example, to allow for ease of insertion of various expression cassettes. In this way, various sequence segments of the plasmid could be replaced with other sequence segments as needed.

Example 4

Competent ABICyano1 Cells for Transformation by Conjugation

[00206] The following method was used to decrease the EPS layer of the strain *Cyanobacterium* sp. ABICyano1 prior to conjugation. The method involved several steps: treatment of cells with NAC, washing steps that utilize NaCl, treatment with lysozyme, and subsequent washing followed by a conjugation procedure.

[00207] Two hundred mL of an exponentially growing culture (OD_{750nm} greater than about 0.5 and less than about 1.0) was incubated with NAC for 2 days at 16 °C (end concentration of NAC is about 0.1 mg/mL) without shaking. This pretreatment was followed by several steps to degrade the EPS and to weaken the cell wall. The pretreated culture was pelleted at 4,400 rpm and washed with 0.9% NaCl containing 8 mM EDTA.

[00208] For further treatment with lysozyme, the cell pellet was resuspended in 0.5 M sucrose and incubated 60 minutes at room temperature (RT) with slow shaking (85 rpm). Cells were then centrifuged and resuspended in 40 mL of a solution containing 50mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 4% sucrose, and 20-40 µg/mL lysozyme. After incubation at room temperature for 10-15 minutes, cells were centrifuged and washed three times using different

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

washing solutions; i) 30 mM Tris containing 4% sucrose and 1 mM EDTA; ii) 100 mM Tris containing 2 % sucrose; and iii) BG11 medium. All centrifugation steps before lysozyme treatment were performed at 4,400 rpm for 10 minutes at 10 °C. All centrifugation steps after the lysozyme treatment were performed at 2,400 rpm for 5 minutes at 4 °C. Resuspended cells were used for conjugation.

Example 5

Transformation of ABICyano1 by Conjugation

[00209] Gene transfer to ABICyano1 (using modified plasmids containing oriVT) was performed using conjugation. The shuttle vectors were transformed into ABICyano1 following a modified conjugation protocol which includes the pretreatment of ABICyano1 to reduce its EPS layer as described in the above example.

[00210] Triparental mating was performed as follows: *E. coli* strain J53 bearing a conjugative RP4 plasmid and *E. coli* strain HB101 bearing the cargo to be introduced into ABICyano1 and the pRL528 helper plasmid (for in vivo methylation) were used. *E. coli* strains were grown in LB broth supplemented with the appropriate antibiotic overnight at 37 °C with shaking at 100 rpm. An aliquot of 3 – 5 mL of each culture was centrifuged, washed twice with LB medium and resuspended in 200 µL LB medium. Subsequently, the *E. coli* strains were mixed, centrifuged and resuspended in 100 µL BG11 medium. Two hundred mL of exponentially growing cyanobacterial culture (OD_{750nm} of greater than 0.5 and less than 1.0) was centrifuged (3,000 rpm, 10 min), pretreated to degrade the EPS layer as described above in Example 4, and subsequently washed and resuspended in 400 µL BG11 culture medium containing Tris/sucrose buffer. A 100 µL aliquot of resuspended cyanobacterial and *E. coli* cultures was mixed and applied onto a membrane filter (Millipore GVWP, 0.22 µm pore size) placed on the surface of solid BG11 medium supplemented with 5% LB. Petri dishes were incubated under dim light (5 µE m⁻² s⁻¹) for 2 days. Cells were then resuspended in fresh BG11 medium and plated onto selective medium containing 10 and 15 µg/mL kanamycin, respectively. The following selection conditions were used: light intensity of approximately 20 – 40 µE m⁻² s⁻¹ at a temperature of approximately 28 °C. Transformants were visible after approximately 7-10 days. The transformant colonies were then plated on BG11 media containing 15 µg/mL

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

kanamycin and then transferred stepwise to higher kanamycin concentrations (up to 60 µg/mL) to aid in the selection process.

Example 6

Transformation of ABICyano1 by Electroporation

[00211] Electroporation can also be used for successful transformation of *Cyanobacterium* sp. ABICyano1, or other strains such as *Arthrospira*, *Synechococcus*, and *Synechocystis*, using, for example, the same plasmids as for conjugation, but with lower efficiency.

[00212] As with the conjugation transformation protocol (above), strain-specific adaptations of standard electroporation protocols can be made to avoid DNA digestion by endogenous restriction enzymes and to allow DNA entry through the EPS layer. To achieve successful electroporation, DNA is protected against endogenous restriction enzymes by methylation. Prior to electroporation, ABICyano1 cells are pretreated with positively charged polyaminoacids such as poly-L-lysine hydrobromide or poly-L-ornithine hydrochloride or combinations thereof (in particular poly-L-lysine hydrobromide) in order to increase the DNA uptake efficiency.

[00213] As an example, a one hundred mL aliquot of exponentially growing ABICyano1 culture (corresponding to a cell density of approximately 2×10^7 cells/mL), was harvested, washed and resuspended in 0.9 % NaCl containing 25 mM Tris-HCl (pH 8.0). Poly-L-lysine hydrobromide was added to the resuspended cells to obtain a final concentration of 50 µg/mL. ABICyano1 cells were then incubated for several hours or overnight before electroporation.

[00214] In a typical procedure, 50 mL of poly-L-lysine hydrobromide treated ABICyano1 cells were harvested and treated with 30 mL ice-cold BG11 containing 6% DMSO. After incubation on ice for 20 minutes, cells were harvested and frozen in liquid nitrogen for 15 minutes. These pre-frozen cells were thawed by adding 15 mL ice-cold buffer containing 1 mM HEPES (pH7.5), 0.2 mM K₂HPO₄ and 0.2 mM MgCl₂. The cells were washed sequentially once more with 1 mM HEPES and ETMT buffer containing 0.1 mM HEPES, 0.2 mM K₂HPO₄ and 0.2 mM MgCl₂. The cells were harvested by centrifugation at 15,000 x g for 5 minutes. All of the washes and centrifugations were carried out on ice or in a pre-chilled centrifuge (4 °C). For each electroporation procedure, 3 µg methylated DNA was added to 100 µL of concentrated cells.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

Cells were electroporated in a cuvette with a 2 mm gap between the electrodes and pulsed once in a Gene Pulse X-cell (Bio-Rad) using an exponential decay protocol (electric field strength of 8 kV/cm, capacitance of 25 μ F, resistance of 400 ohms, for a time of approximately 8-9 ms). After electroporation, 1-2 mL BG11 medium was immediately added to the cyanobacterial suspension, which was subsequently transferred to a 50 mL flask containing 15 mL fresh BG11 medium. After incubation for 1- 2 days under normal light ($30 - 40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with gentle shaking at 30 °C, recovered cultures were centrifuged, resuspended in 500 μ L BG11 medium and placed onto selective media (BG11 containing 20 μ g/mL Km or 40-60 μ g/mL of spectinomycin).

Example 7

Transformation of *Arthrospira platensis* PCC9108 by Conjugation

[00215] Gene transfer to *Arthrospira platensis* PCC9108 (using modified plasmids containing oriVT) was performed using conjugation. Biparental mating was performed as follows: *E. coli* strain EC100DC bearing a modified conjugative RP4 plasmid (pRL443), the cargo plasmid to be introduced into *Arthrospira platensis* and the pRL528 helper plasmid (for in vivo methylation) was used. The *E. coli* strain was grown in LB broth supplemented with the appropriate antibiotics overnight at 37 °C with shaking at 100 rpm. The *E. coli* culture was centrifuged, washed twice with Zarrouk's medium and resuspended in 100 μ L Zarrouk's medium. 10 mL of a late exponentially growing *Arthrospira platensis* culture ($\text{OD}_{750\text{nm}}$ between 0.5 and 1.0) was centrifuged (3,000 rpm, 10 min), washed and resuspended in 200 μ L Zarrouk's medium. A 100 μ L aliquot of resuspended cyanobacterial and *E. coli* cultures was then mixed and incubated under dim light ($5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 2-3 days. Cells were then plated onto selective Zarrouk's plates containing 10 μ g/mL zeocin, respectively. The following selection conditions were used: light intensity of approximately $10 - 20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at a temperature of approximately 28 °C. Transformants were visible after approximately 7-14 days. The transformant colonies were then transferred onto fresh Zarrouk's plates containing 30 μ g/mL zeocin and then transferred stepwise to higher zeocin concentrations (up to 100 μ g/mL) to aid in the selection process.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

Example 8

Expression of a *Synechocystis* PCC 6803 Heme-containing Protein Cyanoglobin (GlbN) in *Cyanobacterium* sp. ABICyano1

[00216] The cyanoglobin (glbN) gene from *Synechocystis* PCC 6803 (SEQ ID NO: 11), which was codon optimized for optimal expression, was inserted to the p6.8 modified endogenous plasmid of *Cyanobacterium* sp. ABICyano1, under the control of an endogenous zinc-inducible smtA promoter. This created a 10,340 bp construct which was designated #2887\pABICyano1_6.8::PsmA-glbN_S6803(ABICyano1 opt)-TpsaB, as shown in the plasmid map in FIG. 5, and present in Table 3 as Construct #2887, strain AB1307. The plasmid was transformed to *Cyanobacterium* sp. ABICyano1 following the methods described in Examples 3-5.

[00217] Transformed cells were then grown in culture medium and examined for cyanoglobin production under varied zinc concentrations. The cells were isolated from the medium, and protein extracts were separated on a 16% native PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. Expression of the cyanoglobin protein (arrow) was induced with 20 μ M zinc sulfate, as shown in FIG. 15. The protein gel shows that because of the zinc-inducible promoter, expression of the *Synechocystis* cyanoglobin did not begin until zinc was added to the medium.

Example 9

Additional Genetic Modification with an Inducible sRNA

[00218] In order to determine if one could increase the heme-containing protein production by lowering the level of the endogenous heme oxygenase enzyme in cyanobacterial cells (and thus divert heme production away from phycobilin production and towards production of the heme-containing protein), the following genetic modification was designed. An antisense construct (SEQ ID NO: 16) that targets the nucleic acid that encodes heme oxygenase, operably linked to an inducible promoter, was inserted into the plasmid. Upon induction, the antisense sRNA lessened the presence of heme oxygenase, causing a higher content of the heme groups to be available to bind to the heterologous heme-containing protein being expressed in the cyanobacteria. This resulted in higher production of the mature heme-protein complex (See Example 10, below).

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

[00219] Alternatively, the inducible sRNA is designed to increase the flux through the ferrochelatase. An increased flux through the ferrochelatase is accomplished by different means such as, for example, a knockdown of the gene encoding magnesium chelatase (MgCh), the overexpression of ferrochelatase (FeCh), the knockdown of *gun4* (MgCh activator), a *gun4*(W192A) mutation, magnesium-starvation, iron supplementation, or nitrogen-starvation.

Example 10

Production of *Synechocystis* PCC 6803 Heme-containing Protein Cvanoglobin (GlbN)

Increased by Decreasing the Level of Heme Oxygenase in the Cell

[00220] To determine whether the host cyanobacterial cells were able to produce more heme-containing protein when the level of the heme oxygenase ABICyano1.1_orf29000 was genetically reduced in the host cell, the following experiment was performed. An anti-HO1 sRNA construct #2890\ pABICyano1_6.8::PsmA-glbN_S6803(ABICyano1opt)-TpsaB-PnirA'-anti_HO1_v1 (SEQ ID NO: 16) was prepared in order to inducibly decrease the heme oxygenase level in the cell. The plasmid is present in Table 3 as Construct #2890, strain AB1310. The sRNA sequence was placed upstream of the gene encoding the heme-containing protein, having its own endogenous nitrate-inducible promoter from *Cyanobacterium* sp. ABICyano1.

[00221] The cells were transformed with the plasmid construct, and were then grown in culture medium. Cells were isolated from the medium, and the protein was extracted from the cell material. The protein extracts were separated on a 16% native PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue (FIG. 16). The data shows that when nitrate was added to the culture to induce production of the anti-heme oxygenase sRNA, less heme oxygenase and thereby more heme-containing protein was produced (black arrow, right lane, FIG. 16).

Example 11

Expression of Leghemoglobin C2 from Soybean in *Cyanobacterium* sp. ABICyano1

[00222] To demonstrate that plant-derived leghemoglobin proteins can be produced in cyanobacteria, the following experiment was performed. The leghemoglobin C2 gene from soybean (SEQ ID NO: 1) was codon optimized (SEQ ID NO: 2) for optimal expression in *Cyanobacterium* sp. ABICyano1. The gene was placed under the control of an endogenous zinc-inducible *smtA* promoter on the p6.8 modified endogenous ABICyano1 plasmid.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

[00223] The plasmid also encoded an sRNA directed against the ribosomal binding site of the heme oxygenase ABICyano1.1_orf29000, under control of the endogenous nitrate-inducible promoter from *Cyanobacterium* sp. ABICyano1. This resulted in a 10,456 bp plasmid designated as #2889\pABICyano1_6.8::PsmA-legH_GmC2(ABICyano1opt)-TpsaB-PnirA'-anti_HO1_v1, as shown in Table 3 as Construct #2889, strain AB1309, and in the plasmid map in FIG. 7. The plasmid was then transformed to *Cyanobacterium* sp. ABICyano1 following the methods described in Examples 3-5.

[00224] Transformed cells were then grown in culture medium and examined for leghemoglobin production under various induction conditions. Protein extracts were separated by denaturing electrophoresis on a 16% Tricine-SDS-PAGE including 6 M urea and subjected to a Coomassie Brilliant Blue staining.

[00225] The protein gel (FIG. 17) demonstrated that the zinc-inducible promoter delayed expression of the soybean leghemoglobin C2 protein (arrow) until zinc was added to the medium. Upon addition of zinc, the leghemoglobin was produced. Upon addition of nitrate, the sRNA against heme oxygenase was also induced. The combination of the induction of the leghemoglobin gene and the anti-heme oxygenase sRNA resulted in strong production of the leghemoglobin protein.

Example 12

A Stronger Promoter and Multiple Copies of the Gene Encoding the Heme-containing Protein on the Plasmid Construct Increased Protein Production

[00226] Constructs #2942 and #3022, strains AB1336 and AB4005: The cyanoglobin (glbN) gene from *Synechocystis* strain PCC 6803 (SEQ ID NO: 11), which was codon optimized for optimal expression, was inserted to the p6.8 modified endogenous plasmid of *Cyanobacterium* sp. ABICyano1, following the method described in the above example, except that the cyanoglobin gene was placed under the regulatory control of an endogenous, strong constitutive promoter PcpCB, rather than an inducible smtA promoter. The plasmid #2942\pABICyano1_6.8::PcpCB-glbN_S6803(ABICyano1opt)-TpsaB-Porf0316'-anti_HO1_v1 allowed constitutive and high expression of the glbN gene during the full length of the culture growth. This was found to result in greater cyanoglobin production per day.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

[00227] The p6.8 plasmid that carried the heterologous gene is generally present in many copies per cell. However, in order to maximize production of the heterologous heme-containing protein, an additional construct #3022\ pABICyano1_6.8::PcpcB-glbN_S6803(ABICyano1opt)-TpsaB-PcpcB-glbN_S6803(ABICyano1opt)-TpsaB-Porf0316'-anti_HO1_v1 (SEQ ID NO: 58) was created that has two copies of the gene encoding the cyanoglobin glbN protein, each with its own PcpcB promoter. Both plasmids encode the anti-HO1 sRNA sequence downstream of the endogenous copper-inducible promoter from *Cyanobacterium* sp. ABICyano1.

[00228] The plasmids were transformed to *Cyanobacterium* sp. ABICyano1 following the method described in Examples 3-5. The cells were then grown in culture medium. Cells were isolated from the medium, and the protein was extracted from the cell material. Protein extracts were separated by denaturing electrophoresis on a 16% Tricine-SDS-PAGE including 6 M urea. The protein gel of FIG. 18A was unstained, and the heme-containing protein can be seen as a reddish band. FIG. 18B shows a duplicate protein gel, which was subjected to Coomassie Brilliant Blue stain to visualize the total proteins.

[00229] The data show that by using a stronger promoter and two sets of heme protein genes, more protein is made. Further, when copper was added to induce production of the sRNA fragment, less heme oxygenase was produced and thereby more heme-containing protein was produced (FIG. 18A and FIG. 18B).

Example 13

Generation of a Phycocyanin-deficient Cyanobacterial Strain

[00230] The *Cyanobacterium* sp. ABICyano1 strain was grown under high-light stress in order to isolate derivatives with altered phycocyanin expression. The applied conditions were as follows: a BG11-agar plate with a cell lawn of ABICyano1 was exposed to high-light ($3,000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 90 minutes, resulting in a cell death rate of about 99.99 %. Individual colonies that survived the treatment were picked and patched onto new plates for later characterization. UV-VIS absorbance spectra from individual isolates identified cell lines with reduced phycocyanin content. FIG. 19 shows the absorbance spectrum of one of the isolated pale green cell lines, designated #AB0492, in comparison with the absorbance spectrum of wild type cells. Genome sequencing of the strain #AB0492 revealed that a spontaneous deletion within the cpcA gene was the cause of the phycocyanin-deficient phenotype.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

Example 14

Expression of the Heme-containing Protein in a Phycocyanin-deficient Background

[00231] Constructs #2942 and #3022, strains AB4011 and AB4012: To determine whether several gene modifications would work together to improve heterologous heme production even further, a construct was created that had constitutive expression of codon-optimized cyanoglobin from *Synechocystis* sp. PCC6803 (2 copies in tandem) and copper inducible sRNA knockdown of heme oxygenase ABICyano1.1_orf29000.

[00232] To determine whether more heme-containing protein would be made if the heterologous gene encoding the heme protein was inserted into a cell having a genetic phycocyanin deficiency (AB0492), the following method was used. The phycocyanin-deficient mutant host cell was prepared by the method described in the above example, and was then transformed with the two constructs #2942\pABICyano1_6.8::PcpcB-glbN_S6803(ABICyano1opt)-TpsaB-Porf0316'-anti_HO1_v1 (SEQ ID NO: 56) and #3022\pABICyano1_6.8::PcpcB-glbN_S6803(ABICyano1opt)-TpsaB-PcpcB-glbN_S6803(ABICyano1opt)-TpsaB-Porf0316'-anti_HO1_v1 (SEQ ID NO: 58). Both plasmids lead to constitutive expression of codon-optimized cyanoglobin from *Synechocystis* sp. PCC6803 (1 and 2 copies in tandem) and a copper inducible sRNA knockdown of heme oxygenase ABICyano1.1_orf29000.

[00233] The production of the heme-containing protein was compared with that of host cells that had a normal amount of phycocyanin. The strains were grown in the absence and presence of 10 μ M copper-EDTA to induce the knockdown of the heme oxygenase via anti-HO1 sRNA. AB4011 has a single copy of the PcpcB-glbN_S6803, whereas AB4012 comprises two PcpcB-glbN_S6803 copies on the same plasmid. Protein extracts were separated on a 16% native PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue.

[00234] The results (FIG. 20) show that expression of the cyanoglobin (glbN) gene from *Synechocystis* strain PCC 6803 in the Δ cpcA derivative AB4011 (1x PcpcB-glbN) was generally lower compared to the expression in the phycocyanin-rich ABICyano1 derivative AB1336. However, the copper-induced knockdown of the heme oxygenase in AB4011 had a much stronger effect on the expression of glbN, compared to the relatively mild effects of the heme oxygenase knockdown in AB1336 on the glbN expression (FIG. 20). In alignment with this observation, AB4012 (2x PcpcB-glbN copies) expressed a significant amount of apo-GlbN

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

(cyanoglobin without heme), indicating a lack of sufficient heme caused by a potential higher turnover of heme via the heme oxygenase. By contrast, knockdown of the heme oxygenase in AB4012 resulted in strongly expressed and fully assembled heme protein.

Example 15

Expression of an *Arthrospira platensis* PCC 8005 Cyanoglobin (glbN) Gene in *Cyanobacterium* sp. ABICyano1

[00235] Construct #2994, strain AB1364: A codon-optimized cyanoglobin (glbN) gene (SEQ ID NO: 14) from *Arthrospira platensis* PCC 8005 was inserted to the p6.8 modified endogenous plasmid of *Cyanobacterium* sp. ABICyano1, under the control of the endogenous constitutive promoter PcpCB. This created a 10491 bp construct which was designated #2994)pABICyano1_6.8::PcpCB-glbN_Ap8005(ABICyano1opt)-TpsaB, as shown in the plasmid map in FIG. 10. The plasmid was transformed into *Cyanobacterium* sp. ABICyano1 following the methods described in Examples 3-5.

[00236] Cell cultures were grown, and the cellular material was isolated. Protein extracts were prepared, separated on a 16% native PAGE, and stained with Coomassie Brilliant Blue (FIG. 21). The data shows that this modification resulted in constitutive and high expression of the glbN gene from *Arthrospira platensis* PCC 8005 during the full length of the culture growth (FIG. 21).

Example 16

Expression of an *Arthrospira platensis* Cyanoglobin (glbN) Gene in *Arthrospira platensis* PCC9108

[00237] Construct #2949 (SEQ ID NO: 59), strain AB4041: The codon optimized cyanoglobin (glbN) gene from *Arthrospira* sp. PCC 8005 (SEQ ID NO: 14) was inserted into chromosome of *Arthrospira platensis* PCC9108 via homologous recombination. The cyanoglobin gene was placed under the control of the endogenous constitutive promoter PcpCB from *Arthrospira platensis* PCC9108. The gene cassette was inserted into the chromosome of *Arthrospira platensis* PCC9108 via homologous recombination following the methods described in Examples 6-7.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

[00238] Construct #3057 (SEQ ID NO: 60), strains AB4065 and AB4066: In order to maximize production of the heterologous heme-containing protein, an additional construct #3057\ oriVT-nblA2_2293_up-PcpcB1918-glbN_Ap8005-PcpcB1918_glbN_Ap8005-TpsaB-PrbcL2293-ble-TB1002-nblA2_2293_down was created that has two copies of the codon-optimized gene encoding the cyanoglobin glbN protein *Arthrospira* sp. PCC 8005 (SEQ ID NO: 14), each with its own PcpcB promoter from *Arthrospira platensis* PCC9108. The gene cassette was inserted into chromosome of *Arthrospira platensis* PCC9108 and the derivative strain *Arthrospira platensis* AB1298 via homologous recombination following the methods described in Examples 6-7.

[00239] Cell cultures were grown in Zarrouk's medium and protein was extracted from the cells. The protein extracts (FIG. 22A and FIG. 22B) were separated on a 16% native PAGE. FIG. 22A is a photograph of the unstained protein gel. FIG. 22B is a photograph of an identical gel, stained with Coomassie Brilliant Blue to identify total protein.

[00240] The results show the expression of the cyanoglobin (GlbN) protein from *Arthrospira platensis* PCC 8005 in *Arthrospira platensis* PCC9108 (AB4041, AB4065) and the derivative strain *Arthrospira platensis* AB1298 (AB4066). AB4041 has a single copy of the PcpcB-glbN_Ap8005, whereas AB4065 and AB4066 comprise two PcpcB-glbN_Ap8005 copies on the same plasmid.

Example 17

Purification of the Heme-containing Protein from Cyanobacterial Cells

[00241] *Cyanobacterium* sp. ABICyano1 strain AB4005 was grown in stirred 1 L photobioreactors (12/12 h day/night cycle) in artificial seawater, supplemented with BG11 trace elements and 100 μ M Fe(II)NH₄ sulfate. The pH was maintained at pH 7.3 by addition of 5 % CO₂ on demand with a flow-rate of 20 – 40 ml/min. AB4005 exhibited constitutive expression of a codon-optimized cyanoglobin from *Synechocystis* sp. PCC6803 (2 copies in tandem). 10 μ M CuEDTA was added to induce the sRNA knockdown of heme oxygenase ABICyano1.1_orf29000. 200 ml of the culture was harvested via centrifugation for preparation of a soluble protein extract (Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 10 mM sodium dithionite), followed by a concentration step with 10kDa centrifugal filters. 100 μ L of the soluble protein concentrate was loaded on a 30 mL Sephacryl 100-HR gel filtration column driven by gravity

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

flow (FIG. 23A). Elution fractions E1 through E14 (FIG. 23B) were collected for further analysis.

[00242] The eluted samples were then separated on a 16% native PAGE gel. A photograph of the unstained gel (showing the reddish-colored heme fractions) is shown in FIG. 24A. A duplicate gel that has been stained with Coomassie Brilliant Blue stain to identify total protein is shown in FIG. 24B. The left lane of both gels is the control sample (water soluble extract; labeled “CE”).

Example 18

Quantitation and Analysis of Cyanobacterially-produced Heme-containing Protein

[00243] Two methods can be used for determination of the concentration of heme-containing proteins in the bulk extraction. One method is the use of absorbance spectroscopy with known extinction coefficients. The ferric form of GlnN from *Synechocystis* strain PCC 6803 has a main absorbance peak at 410 nm. In this way, one can determine the relative induction of the heme-containing protein in the induced versus either non-induced or wild type strains.

[00244] As an example, FIG. 25 depicts the relative absorbance spectra of cell extracts from *Cyanobacterium* sp. ABICyano1 expressing the cyanoglobin (GlnN) protein from *Synechocystis* strain PCC 6803. AB4005 contains two PcpB-glnN copies in tandem and an inducible sRNA to knockdown expression of the heme oxygenase ABICyano1.1_orf29000. AB4005 cells were grown in either the absence or presence of 10 μ M copper-EDTA to induce the anti-HO1 sRNA. The absorbance peak at 410 nm (arrow) shows the ferric form of GlnN from *Synechocystis* strain PCC 6803.

[00245] Another method of analysis involves heme staining following gel electrophoresis. This method is used to determine accumulation levels in producers since the heme component of heme-containing proteins remains bound to the protein as it migrates through the gel. Molecular weights of all heme proteins present can also be determined using this method.

Example 19

Scale-up of Modified Cyanobacteria to Produce Heme-containing Protein

[00246] A culture of modified cyanobacteria is scaled-up to flasks, then 1 liter containers, then 5 liter containers, then to outdoor vertical photobioreactors. The host cells are then grown

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

without induction of the inserted genes for most of the length of the culture period (such as, for example, about 20 days). Near the end of the culture period (approximately 2 to 4 days prior to culture harvest), the production of the heme-containing protein is induced. At this time, other modifications can also be induced, such as modifications to increase the heme that is available for binding. The culture can then be harvested, and the cells can be dried to produce a dried biomass material containing the heme-containing protein. Alternatively, the total protein can be isolated from the cell material. Further, the heme-containing protein can be substantially purified from the total protein fraction, if desired.

Example 20

Cell Extracts: Total Protein Assay

[00247] Protein concentration in the cellular extracts is determined using the Bio-Rad DC protein assay Kit (Bio-Rad; Hercules, CA; Cat# 500-0111) according to the manufacturer's instructions. Bovine serum albumin is used as the standard.

Example 21

Production of an Iron-rich Food Product from Cyanobacteria

[00248] A modified strain of *Arthrospira platensis* is modified as described in one of the above examples, to produce large amounts of an exogenous heme-containing protein. The culture is grown for 3 weeks in an outdoor photobioreactor. The culture is harvested, and the biomass is dried. The resulting biomass has a heme-bound iron content that is much higher than the iron content of wild type *Arthrospira*, and can thus be used as an iron-rich food supplement that is also rich in other nutrients. The food supplement can be formed into flakes, a powder, a tablet, or a capsule.

Example 22

Production of an Iron-rich Food Product and Phycocyanin from Cyanobacteria

[00249] A modified strain of *Arthrospira platensis* is modified as described in the above example, except that a substantial amount of the phycocyanin is isolated from the biomass before it is processed for its use as an iron-rich food supplement. In this way, two valuable products, phycocyanin and an iron-rich food supplement, can be obtained from the cyanobacterial culture. If desired, the product can be pasteurized or sterilized during the processing step.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

Example 23

Preparation of a Product Rich in Heme-containing Protein

[00250] Extraction and isolation of a protein product enriched with a heme-containing protein is achieved by removal of the lipid and hydrophobic fraction of the biomass with a nonpolar solvent. The remaining material is then precipitated using a pH shift. The protein-rich fraction is collected. The protein-rich material is desalted by filtration or buffer exchange. Optionally, the desalted protein-rich material is then dried to a fine powder.

Example 24

Production of a meat-like protein meal rich in a heme-containing protein

[00251] The protein-rich material of the above example is obtained and formulated into a vegetarian, meat-like food product. The gene encoding the heme-containing protein can be derived from a cyanobacterial source, an algal source, a plant source, or from an animal source.

Example 25

Heme Apoprotein Production

[00252] If desired, the heme-containing protein can be first produced in the cell as an apoprotein without bound heme, and can then be extracted from the cell biomass, purified, then further modified chemically to add in the heme-containing moiety.

[00253] Although the present invention has been described in considerable detail with reference to certain embodiments thereof, other embodiments are possible. Therefore, the spirit and scope of the appended claims should not be limited to the description of the embodiments contained therein.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

CLAIMS

What is Claimed is:

1. A genetically modified cyanobacterium comprising a polynucleotide encoding a heterologous heme-containing protein.
2. The genetically modified cyanobacterium of claim 1, wherein said polynucleotide encodes a leghemoglobin or a cyanoglobin.
3. The genetically modified cyanobacterium of claim 2, wherein said polynucleotide has a nucleic acid sequence that is at least 85% identical to the polypeptide sequence of a plant-derived leghemoglobin or a cyanobacterial cyanoglobin.
4. The genetically modified cyanobacterium of any one of the above claims, wherein the cyanobacterium is from a genus selected from the group consisting of *Arthrospira* sp., *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Acaryochloris*, *Anabaena*, *Aphanothece*, *Thermosynechococcus*, *Chamaesiphon*, *Chroococcus*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Dactylococcopsis*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeothece*, *Microcystis*, *Prochlorococcus*, *Prochloron*, *Chroococcidiopsis*, *Cyanocystis*, *Dermocarpella*, *Myxosarcina*, *Pleurocapsa*, *Stanieria*, *Xenococcus*, *Arthrospira*, *Borzia*, *Crinalium*, *Geitlerinema*, *Halospirulina*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Cyanodictyon*, *Aphanocapsa*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*, *Starria*, *Symploca*, *Trichodesmium*, *Tychonema*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Cyanospira*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Chlorogloeopsis*, *Fischerella*, *Geitleria*, *Nostochopsis*, *Iyengariella*, *Stigonema*, *Rivularia*, *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Cyanothece*, *Phormidium*, and *Adrianema*.
5. The genetically modified cyanobacterium of any one of the above claims, wherein the polynucleotide is codon optimized for optimal expression in the cyanobacterium.
6. The genetically modified cyanobacterium of any one of the above claims, wherein the polynucleotide is linked to a constitutive promoter.
7. The genetically modified cyanobacterium of any of claims 1-5, wherein the polynucleotide is linked to an inducible promoter.
8. The genetically modified cyanobacterium of claim 6 or 7, wherein the promoter is selected from the group consisting of PrbcL, PntcA, PnblA, PisiA, PpetJ, PpetE, PcorT, PsmtA, PziaA, PsigB, PlrtA, PhtpG, PhspA, PclpB1, PhliB, PggpS, PpsbA2, PpsaA, PnirA, PnarB, PnrtA, PisiB, PnrsB, PlrtA, PmrgA, PpstS, and PcrhC, PpetJ, PpsbD, PnblA, PrpoA, PisiB, PrnpA, PrpsL, PpsbD, PpcpB, PnirA*2, PnirA*3, PnirA*4, PmntC, PrpsL*4, Prbc*, PrpsL*4, PpcpB (SEQ ID NO: 55), PnirA (SEQ ID NO: 25), PlrtA, PmrgA, PnblA, PggpS, PpetJ (SEQ ID NO: 28), PppsA, PrnpA (SEQ ID NO: 49), PpstS, Porf0128 (SEQ ID NO: 34), Porf1486 (SEQ ID

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

NO: 35), Porf3164 (SEQ ID NO: 39), Porf3293 (SEQ ID NO: 36), Porf3621 (SEQ ID NO: 37), Porf3635 (SEQ ID NO: 38), Porf3858, Porf1071 (SEQ ID NO: 30), Porf1072 (SEQ ID NO: 40), Porf1074 (SEQ ID NO: 41), Porf1075 (SEQ ID NO: 42), Porf1542 (SEQ ID NO: 43), Porf1823 (SEQ ID NO: 44), Porf1824, Porf3126 (PsmA) (SEQ ID NO: 26), Porf3389, Porf0221 (SEQ ID NO: 31), Porf0222 (SEQ ID NO: 45), Porf0223 (SEQ ID NO: 32), Porf0316 (SEQ ID NO: 33), Porf3232 (SEQ ID NO: 46), Porf3461 (PpetJ) (SEQ ID NO: 28), Porf3749, and (SEQ ID NO: 47).

9. The genetically modified cyanobacterium of any one of the above claims, wherein the polynucleotide is located on an endogenous or heterologous extrachromosomal plasmid.
10. The genetically modified cyanobacterium of any of claims 1-8, wherein said polynucleotide is integrated into the chromosome.
11. The genetically modified cyanobacterium of any one of the above claims, further comprising a modification that increases the heme level in the cyanobacterium.
12. The genetically modified cyanobacterium of claim 11, wherein the genetic modification that increases the heme level in the cyanobacterium is a knockdown of endogenous heme oxygenase.
13. The genetically modified cyanobacterium of claim 12, wherein the knockdown of the heme oxygenase is due to the presence of a polynucleotide that generates a small RNA that is capable of reducing expression of the endogenous heme oxygenase.
14. The genetically modified cyanobacterium of claim 13, wherein the polynucleotide that encodes the heterologous heme-containing protein and the polynucleotide that generates the small RNA capable of reducing the expression of endogenous heme oxygenase are operably linked to an inducible promoter.
15. The genetically modified cyanobacterium of claim 13, wherein the polynucleotide that encodes the heterologous heme-containing protein and the polynucleotide that generates the small RNA capable of reducing the expression of endogenous heme oxygenase are linked to different inducible promoters, inducible by different chemical compounds.
16. The genetically modified cyanobacterium of any one of the above claims comprising a polynucleotide encoding a heterologous heme-containing protein and a small RNA able to reduce endogenous expression of heme oxygenase, wherein the polynucleotide for the heme-containing protein and the small RNA are linked to the same inducible promoter.
17. The genetically modified cyanobacterium of claim 11, wherein the modification increases the flux through ferrochelatase.
18. The genetically modified cyanobacterium of claim 17, wherein the modification that increases the flux through ferrochelatase is selected from the group consisting of: a knockdown

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

of the gene encoding magnesium chelatase (MgCh), the overexpression of ferrochelatase (FeCh), the knockdown of gun4 (MgCh activator), a gun4(W192A) mutation, magnesium-starvation, iron supplementation, and nitrogen-starvation.

19. The genetically modified cyanobacterium of any one of the above claims, further comprising a modification that results in a lower amount of phycocyanin.

20. A method of producing heme-containing protein in a cyanobacterium, comprising:

- a) growing the genetically modified cyanobacterium of any of claims 1-10 under conditions to produce said heme-containing protein; and
- b) obtaining the heme-containing protein from the cyanobacterium.

21. A method of producing heme-containing protein in a cyanobacterium, comprising:

- a) growing the genetically modified cyanobacterium of any of claims 11-19 under conditions to produce said heme-containing protein and under conditions to increase the heme level in the cyanobacterium; and
- b) obtaining the heme-containing protein from the cyanobacterium.

22. A dried biomass containing the genetically modified cyanobacterium of any of claims 1-19.

23. A dried meal (or bulk protein) obtained from the genetically modified cyanobacterium of any of claims 1-19.

24. A partially purified heme-containing protein, obtained from the genetically modified cyanobacterium of any of claims 1-19.

25. An iron-rich nutritional supplement comprising the material of any one of claims 22-24.

26. A food product made from the heme-containing protein made from the genetically modified cyanobacterium of any of claims 1-19.

27. The food product of claim 26, wherein the food product is a meat substitute.

28. The food product of claim 27, wherein the food product has a red color.

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

1/37

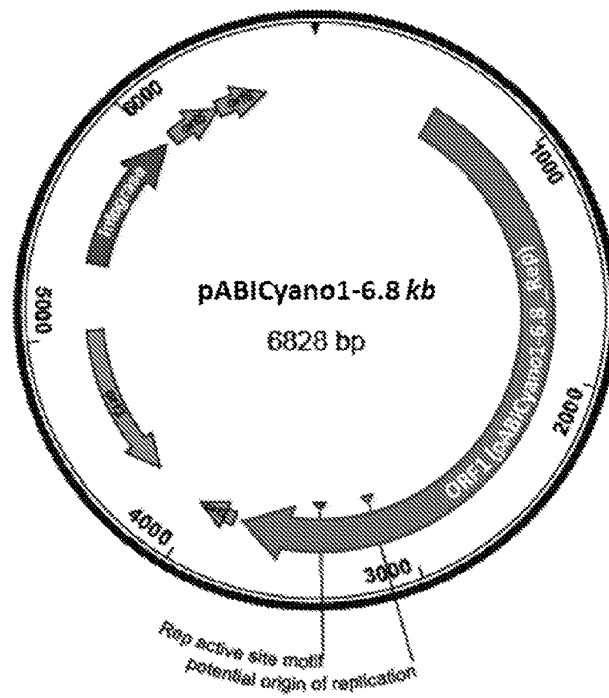


FIG. 1

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

2/37

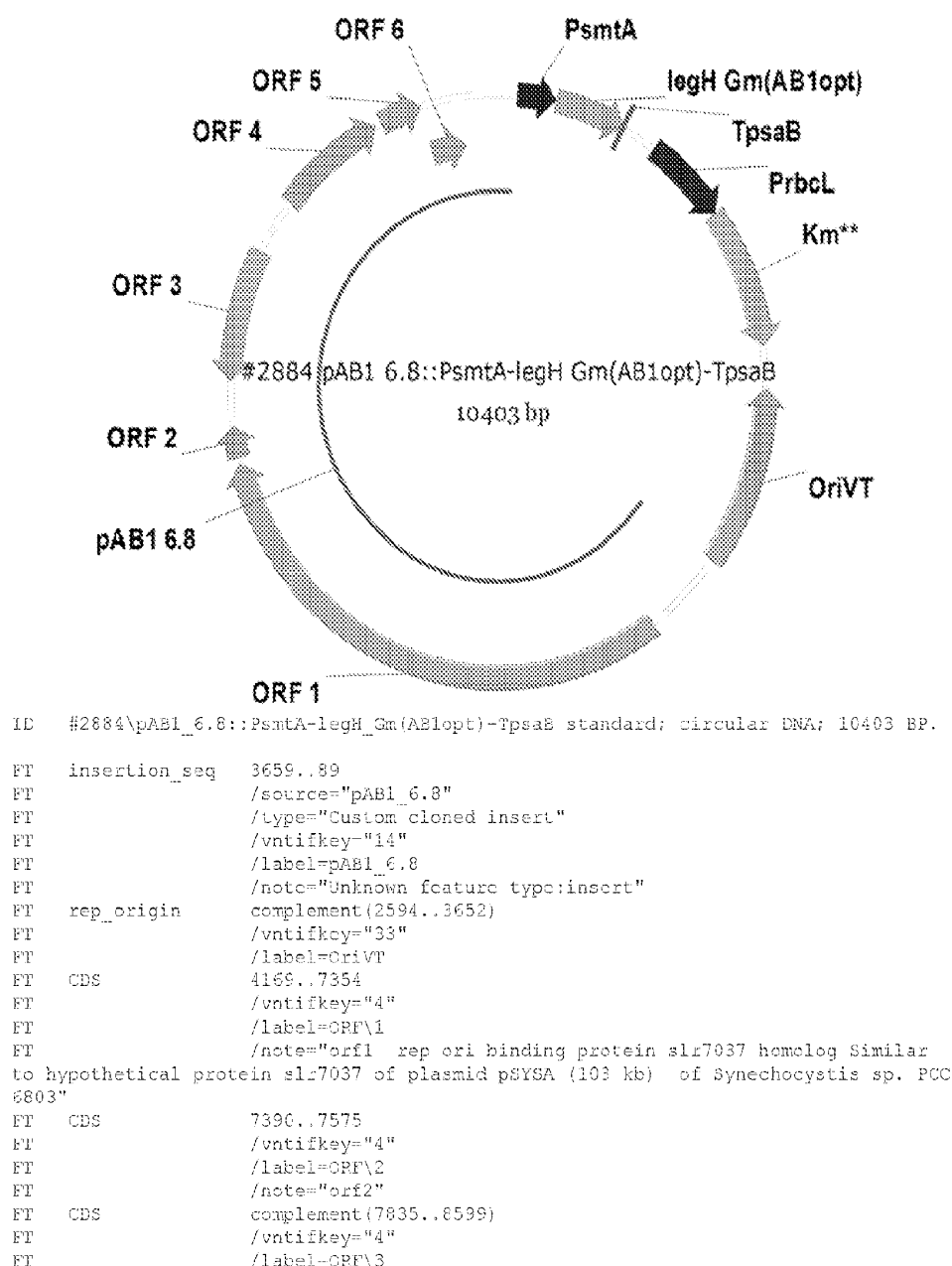


FIG. 2

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

3/37

```

FT          /note="orf3"
FT   CDS      8925..9611
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\4
FT          /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT   CDS      9653..9916
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\5
FT          /note="orf5"
FT   CDS      9913..10161
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\6
FT          /note="orf6"
FT   CDS      1537..2352
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=Km**
FT          /note="Km**"
FT   promoter 1010..1536
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PrbcL
FT   promoter 101..344
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PamtA
FT   CDS      347..784
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=legH_Gm(ABlopt)
FT   terminator 785..822
FT          /vntifkey="43"
FT          /label=TpsaB
SQ   Sequence 10403 BP; 3347 A; 1858 C; 2006 G; 3192 t;

```

FIG. 2 (Continued)

4/37

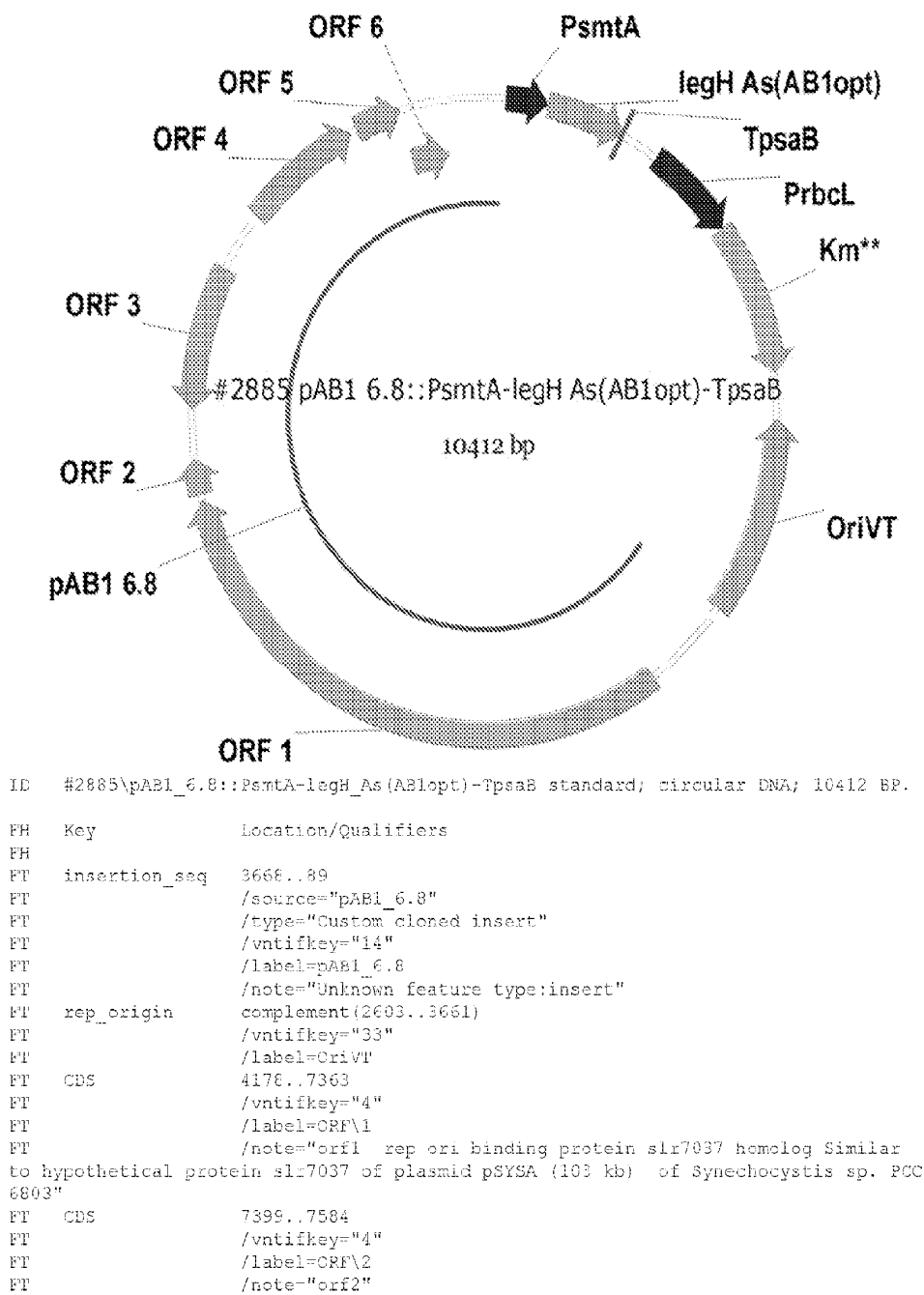


FIG. 3

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

5/37

```

FT      CDS      complement(7844..8608)
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=ORF\3
FT      /note="orf3"
FT      CDS      8934..9620
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=ORF\4
FT      /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT      CDS      9662..9925
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=ORF\5
FT      /note="orf5"
FT      CDS      9922..10170
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=ORF\6
FT      /note="orf6"
FT      CDS      1546..2361
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=Km**
FT      /note="Km**"
FT      promoter  1019..1545
FT      /vntifkey="30"
FT      /label=PrbcL
FT      promoter  101..344
FT      /vntifkey="30"
FT      /label=PsmA
FT      terminator 794..831
FT      /vntifkey="43"
FT      /label=TpsaB
FT      CDS      347..793
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=legH_As(ABlopt)
SQ      Sequence 10412 BP; 3348 A; 1855 C; 2010 G; 3199 t;

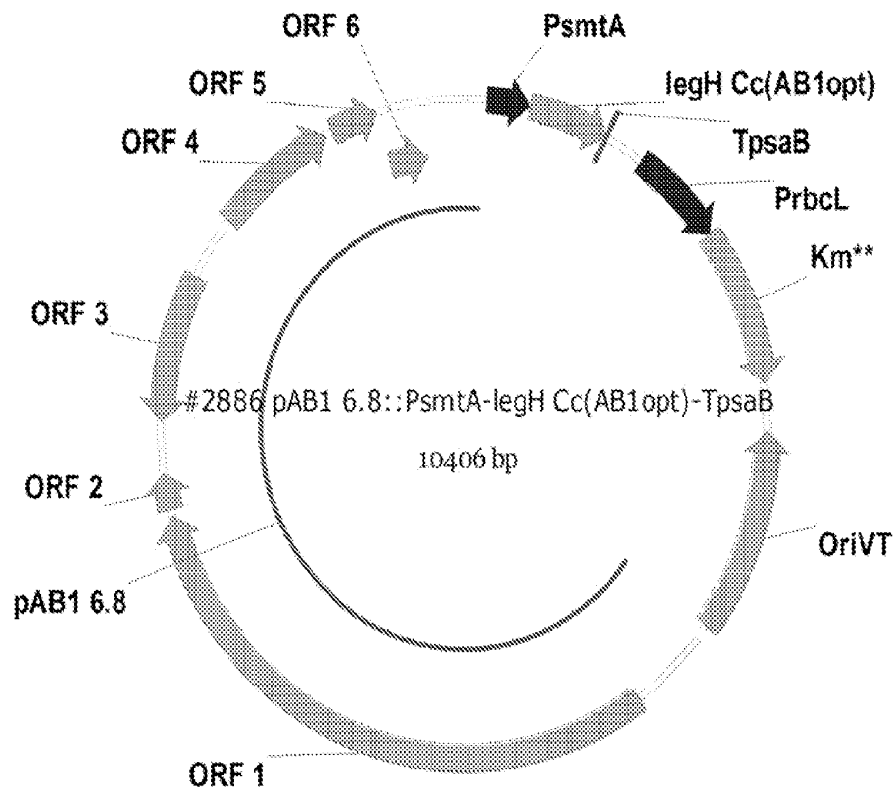
```

FIG. 3 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

6/37



ID #2886\pAB1_6.8::PsmtA-legH_Cc(AB1opt)-TpsaB standard; circular DNA; 10406 BP.

FH	Key	Location/Qualifiers
FH		
FT	insertion_seq	3662..89
FT		/source="pAB1_6.8"
FT		/type="Custom cloned insert"
FT		/vntifkey="14"
FT		/label=pAB1_6.8
FT		/note="Unknown feature type:insert"
FT	rep_origin	complement(2597..3655)
FT		/vntifkey="33"
FT		/label=OriVT
FT	CDS	4172..7357
FT		/vntifkey="4"
FT		/label=ORF\1
FT		/note="orf1 rep ori binding protein slr7037 homolog Similar to hypothetical protein slr7037 of plasmid pSYSA (103 kb) of Synechocystis sp. PCC 6803"
FT	CDS	7393..7578
FT		/vntifkey="4"
FT		/label=ORF\2

FIG. 4

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

7/37

```

FT          /note="orf2"
FT   CDS      complement(7838..8602)
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\3
FT          /note="orf3"
FT   CDS      8928..9614
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\4
FT          /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT   CDS      9656..9919
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\5
FT          /note="orf5"
FT   CDS      9916..10164
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\6
FT          /note="orf6"
FT   CDS      1540..2355
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=Km**
FT          /note="Km**"
FT   promoter 1013..1539
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PrbcL
FT   promoter 101..344
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=Psm1A
FT   terminator 788..825
FT          /vntifkey="43"
FT          /label=TpsaB
FT   CDS      347..787
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=legH_Cc(ABlopt)
SQ   Sequence 10406 BP; 3344 A; 1863 C; 2007 G; 3192 T;

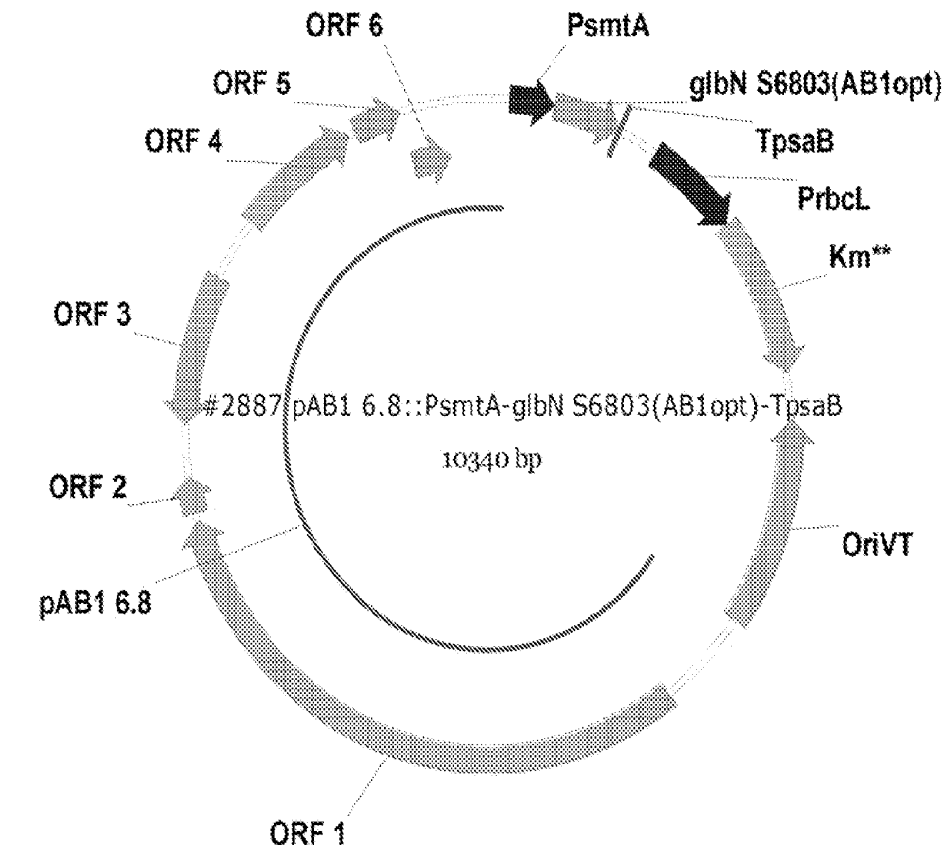
```

FIG. 4 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

8/37



ID #2887\pAB1_6.8::PsmtA-glnN_S6803(AB1opt)-TpsaB standard; circular DNA; 10340 BP.

Key	Location/Qualifiers
FT insertion_seq	3596..89
FT	/source="pAB1_6.8"
FT	/type="Custom cloned insert"
FT	/vntifkey="14"
FT	/label=pAB1_6.8
FT	/note="Unknown feature type:insert"
FT rep_origin	complement(2531..3589)
FT	/vntifkey="33"
FT	/label=OriVT
FT CDS	4106..7291
FT	/vntifkey="4"
FT	/label=ORF\1
FT	/note="orf1 rep ori binding protein slr7037 homolog similar to hypothetical protein slr7037 of plasmid pSYSA (103 kb) of Synechocystis sp. PCC 6803"
FT CDS	7327..7512
FT	/vntifkey="4"
FT	/label=ORF\2
FT	/note="orf2"

FIG. 5

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

9/37

```

FT   CDS           complement(7772..8536)
FT               /vntifkey="4"
FT               /label=ORF\3
FT               /note="orf3"
FT   CDS           8862..9548
FT               /vntifkey="4"
FT               /label=ORF\4
FT               /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT   CDS           9590..9853
FT               /vntifkey="4"
FT               /label=ORF\5
FT               /note="orf5"
FT   CDS           9850..10098
FT               /vntifkey="4"
FT               /label=ORF\6
FT               /note="orf6"
FT   CDS           1474..2289
FT               /vntifkey="4"
FT               /label=Km**
FT               /note="Km**"
FT   promoter      947..1473
FT               /vntifkey="30"
FT               /label=PrbcL
FT   promoter      101..344
FT               /vntifkey="30"
FT               /label=PsmA
FT   terminator     722..759
FT               /vntifkey="43"
FT               /label=TpsaB
FT   CDS           347..721
FT               /vntifkey="4"
FT               /label=glbN_56803(ΔB1opt)
SQ   Sequence 10340 BP; 3329 A; 1838 C; 2002 G; 3171 T;

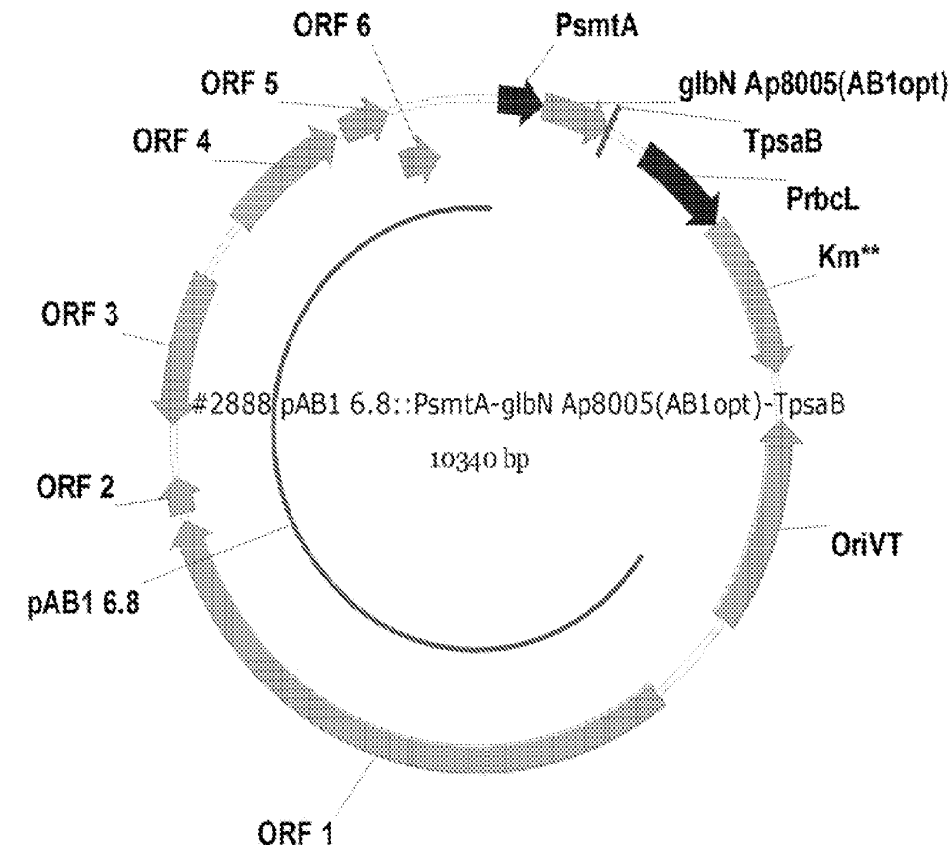
```

FIG. 5 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

10/37



ID #2888\pAB1_6.8::PsmtA-glbN_Ap8005(AB1opt)-TpsaB standard; circular DNA; 10340 BP.

Key	Location/Qualifiers
insertion_seq	3596..89
	/source="pAB1_6.8"
	/type="Custom cloned insert"
	/vntifkey="14"
	/label=pAB1_6.8
	/note="Unknown feature type:insert"
rep_origin	complement(2531..3589)
	/vntifkey="33"
	/label=OriVT
CDS	4106..7291
	/vntifkey="4"
	/label=ORF\1
	/note="orf1 rep ori binding protein slr7037 homolog Similar to hypothetical protein slr7037 of plasmid pSYSA (103 kb) of Synechocystis sp. PCC 6803"
CDS	7327..7512
	/vntifkey="4"
	/label=ORF\2
	/note="orf2"

FIG. 6

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

11/37

```

FT      CDS      complement(7772..8536)
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=ORF\3
FT      /note="orf3"
FT      CDS      8862..9548
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=ORF\4
FT      /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT      CDS      9596..9853
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=ORF\5
FT      /note="orf5"
FT      CDS      9850..10098
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=ORF\6
FT      /note="orf6"
FT      CDS      1474..2289
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=Km**
FT      /note="Km**"
FT      promoter  947..1473
FT      /vntifkey="30"
FT      /label=PrbcL
FT      promoter  101..344
FT      /vntifkey="30"
FT      /label=PsmA
FT      terminator 722..759
FT      /vntifkey="43"
FT      /label=TpsaB
FT      CDS      347..721
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=globW_Ap8005(ABiopt)
SQ      Sequence 10340 BP; 3334 A; 1832 C; 2001 G; 3173 T;

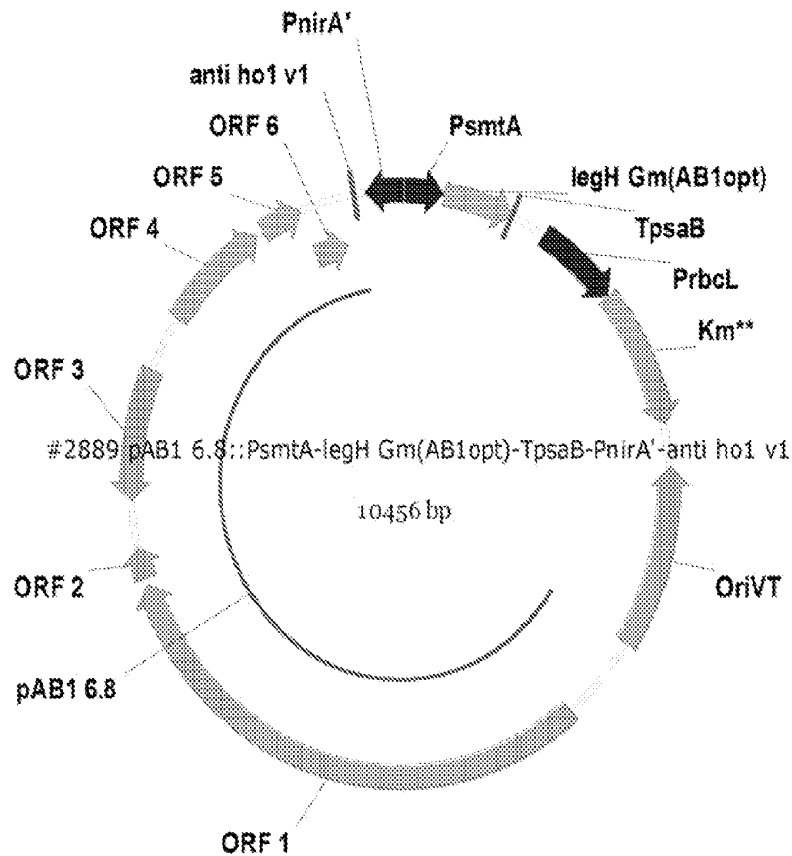
```

FIG. 6 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

12/37



ID: #2889\pAB1_6.8::PsmtA-legH_Gm(AB1opt)-TpsaB-PnirA'-anti_ho1_v1 standard;
circular DNA; 10456 BP.

Key	Location/Qualifiers
insertion_seq	3565..10164
	/source="pAB1_6.8"
	/type="Custom cloned insert"
	/vntifkey="14"
	/label=pAB1_6.8
	/note="Unknown feature type:insert"
rep_origin	complement(2500..3558)
	/vntifkey="33"
	/label=OriVT
CDS	4075..7260
	/vntifkey="4"
	/label=ORF\1
	/note="orf1 rep ori binding protein slr7037 homolog Similar to hypothetical protein slr7037 of plasmid pSYSA (103 kb) of Synechocystis sp. PCC 6803"
CDS	7296..7481

FIG. 7

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

13/37

```

FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\2
FT          /note="orf2"
FT  CDS      complement(7741..8505)
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\3
FT          /note="orf3"
FT  CDS      8831..9517
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\4
FT          /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT  CDS      9559..9822
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\5
FT          /note="orf5"
FT  CDS      9819..10067
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\6
FT          /note="orf6"
FT  CDS      1443..2258
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=Km**
FT          /note="Km**"
FT  promoter  916..1442
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PrbcL
FT  promoter  7..250
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PsmA
FT  CDS      253..690
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=legH_Gm(ABlopt)
FT  terminator 691..728
FT          /vntifkey="43"
FT          /label=TpsaB
FT  promoter  complement(10235..10456)
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PnirA'
FT  misc_RNA  complement(10165..10234)
FT          /vntifkey="53"
FT          /label=anti_hol_v1
SQ  Sequence 10456 BP; 3364 A; 1872 C; 2027 G; 3193 t;

```

FIG. 7 (Continued)

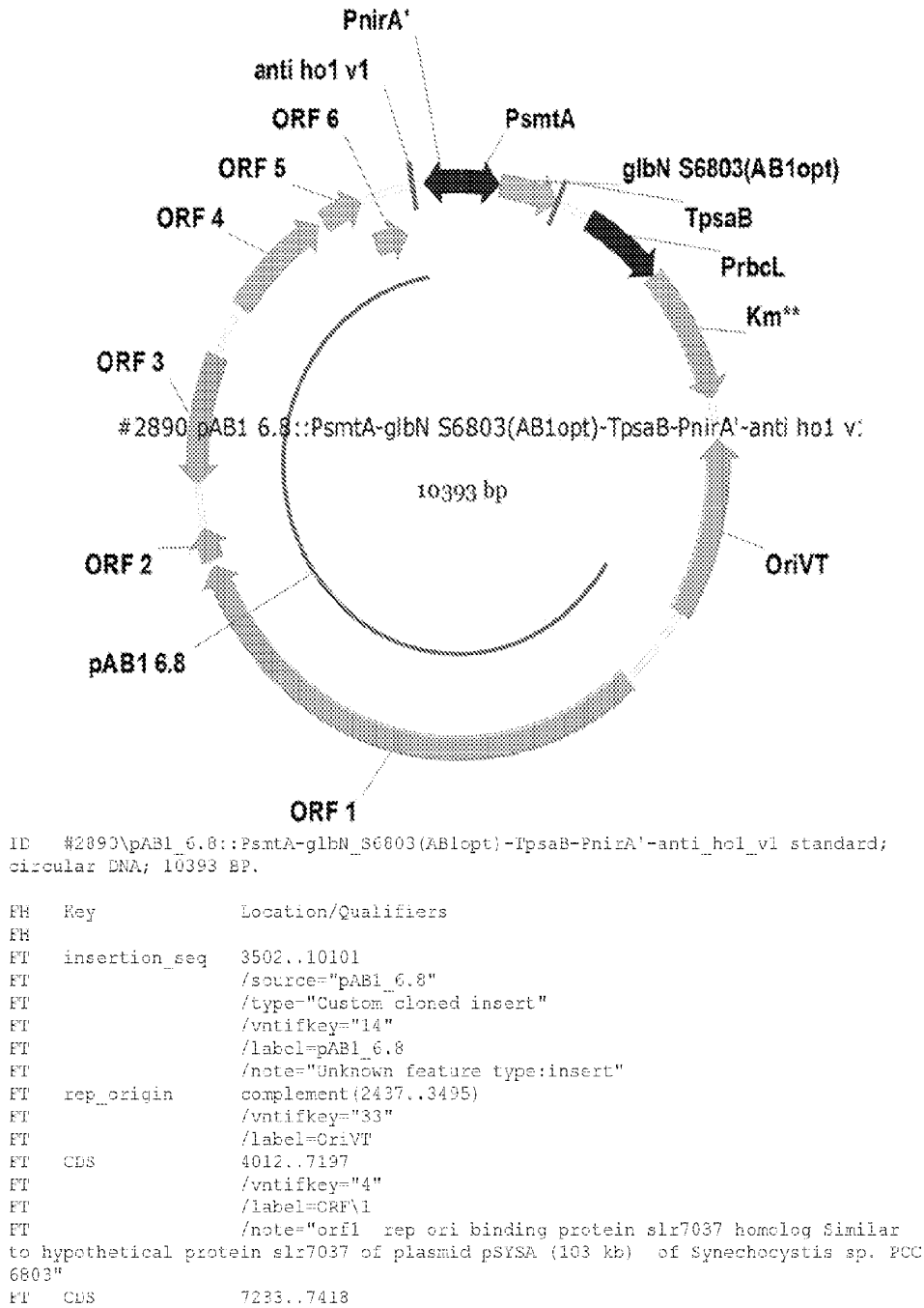


FIG. 8

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

15/37

```

FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\2
FT          /note="orf2"
FT  CDS      complement(7678..8442)
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\3
FT          /note="orf3"
FT  CDS      8768..9454
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\4
FT          /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT  CDS      9496..9759
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\5
FT          /note="orf5"
FT  CDS      9756..10004
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\6
FT          /note="orf6"
FT  CDS      1380..2195
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=Km**
FT          /note="Km**"
FT  promoter  853..1379
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PrbcL
FT  promoter  7..250
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PsmA
FT  terminator 628..665
FT          /vntifkey="43"
FT          /label=TpsaB
FT  CDS      253..627
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=gibN_56803(ABlopt)
FT  promoter  complement(10172..10393)
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PnirA'
FT  misc_RNA  complement(10102..10171)
FT          /vntifkey="53"
FT          /label=anti_hol_v1
SQ  Sequence 10393 BP; 3346 A; 1852 C; 2023 G; 3172 t;

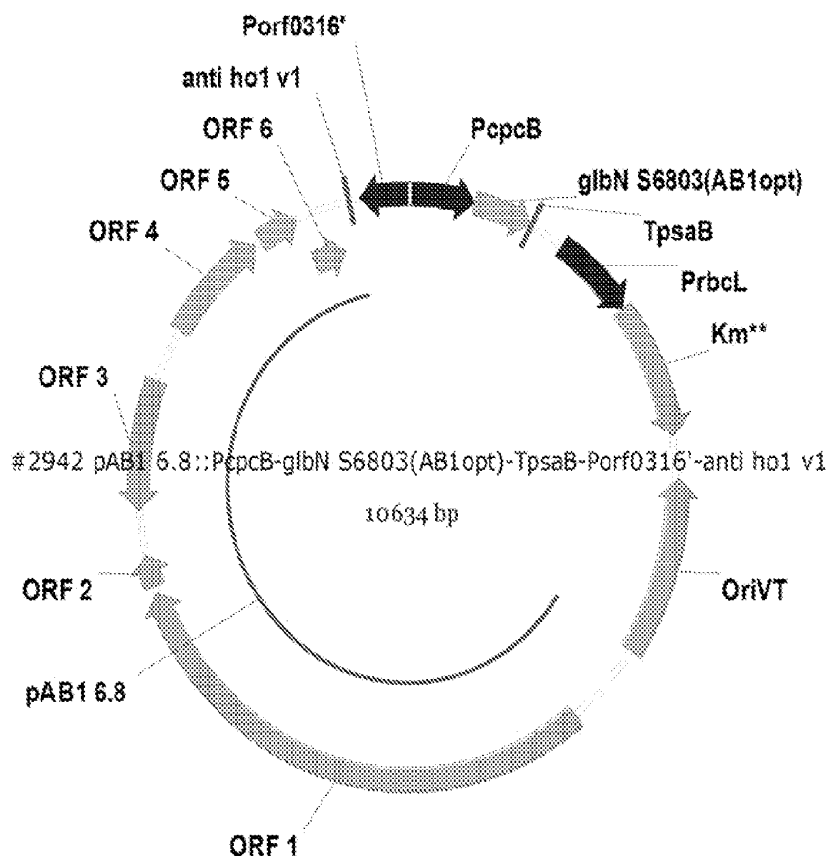
```

FIG. 8 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

16/37



```
ID #2942\pAB1_6.8::PcpCB-glnN_S6803(AB1opt)-TpsaB-Porf0316'-anti_ho1_v1 standard;
circular DNA; 10634 BP.
CC This file is created by Vector NTI
CC VNTDATE|-12052391|
CC VNTDBDATE|-12052391|
FH Key Location/Qualifiers
FT insertion_seq 3656..10257
FT /source="p171-6HindIII18amHi"
FT /type="Custom cloned insert"
FT /vntifkey="14"
FT /label=pAB1_6.8
FT /note="Unknown feature type:insert"
FT rep_origin complement(2593..3651)
FT /vntifkey="33"
FT /label=OriVT
FT CDS 4168..7353
FT /vntifkey="4"
FT /label=ORF\1
```

FIG. 9

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

17/37

```

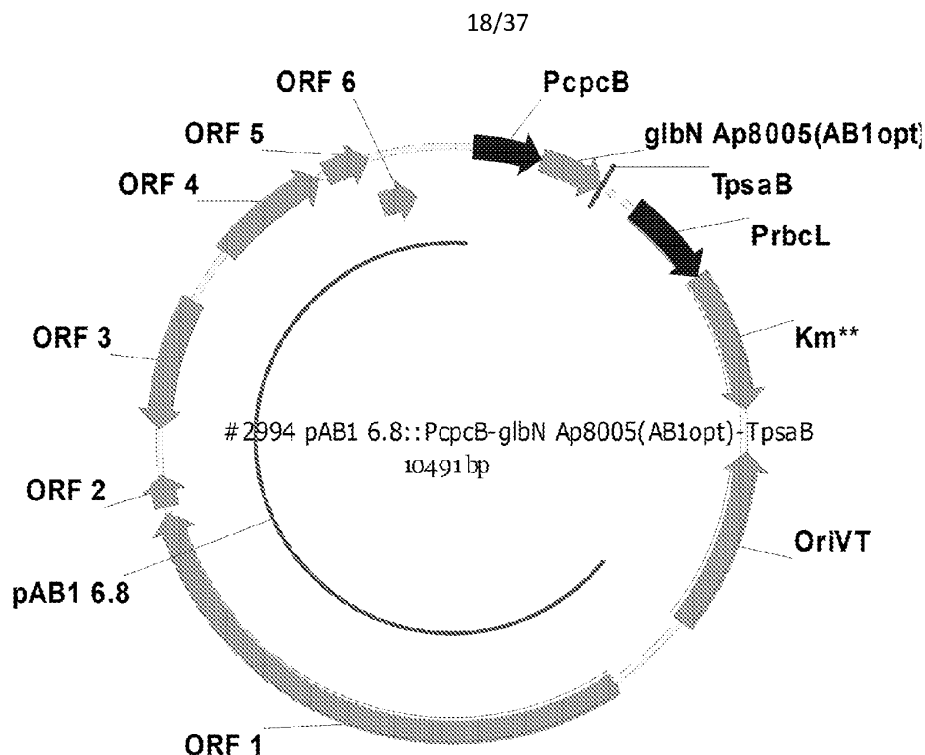
FT          /note="orf1 rep ori binding protein slr7037 homolog Similar
to hypothetical protein slr7037 of plasmid pSYSA (103 kb) of Synechocystis sp. PCC
6803"
FT   CDS           7389..7574
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\2
FT          /note="orf2"
FT   CDS           complement(7834..8598)
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\3
FT          /note="orf3"
FT   CDS           8924..9610
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\4
FT          /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT   CDS           9652..9915
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\5
FT          /note="orf5"
FT   CDS           9912..10160
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\6
FT          /note="orf6"
FT   CDS           1536..2351
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=Km**
FT          /note="Km**"
FT   promoter      1009..1535
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=Prbcl
FT   terminator     784..821
FT          /vntifkey="43"
FT          /label=TpsaB
FT   promoter      6..402
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PcpcB
FT   CDS           403..777
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=g1bW_56803(AB10pt)
FT   promoter      complement(10328..10633)
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=Porf0316'
FT   misc_RNA       complement(10258..10327)
FT          /vntifkey="53"
FT          /label=anti_hol_v1
SQ   Sequence 10634 BP; 3482 A; 1875 C; 2052 G; 3225 t;

```

FIG. 9 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785



```
ID #2994\pAB1_6.8::PcpcB-glbN_Ap8005(AB1opt)-TpsaB standard; circular DNA; 10491
BP.
CC This file is created by Vector NTI
CC VNTDATE|-12118699|
CC VNTDBDATE|-12118699|
FH Key Location/Qualifiers
FT insertion_seq 3747..89
FT /source="p171-6HindIII1BanHI"
FT /type="Custom cloned insert"
FT /vntifkey="14"
FT /label=pAB1_6.8
FT /note="Unknown feature type:insert"
FT rep_origin complement(2682..3740)
FT /vntifkey="33"
FT /label=OriVT
FT CDS 4257..7442
FT /vntifkey="4"
FT /label=ORF\1
FT /note="orf1 rep ori binding protein slr7037 homolog Similar
to hypothetical protein slr7037 of plasmid pSYSA (103 kb) of Synechocystis sp. PCC
6803"
FT CDS 7478..7663
```

FIG. 10

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

19/37

```

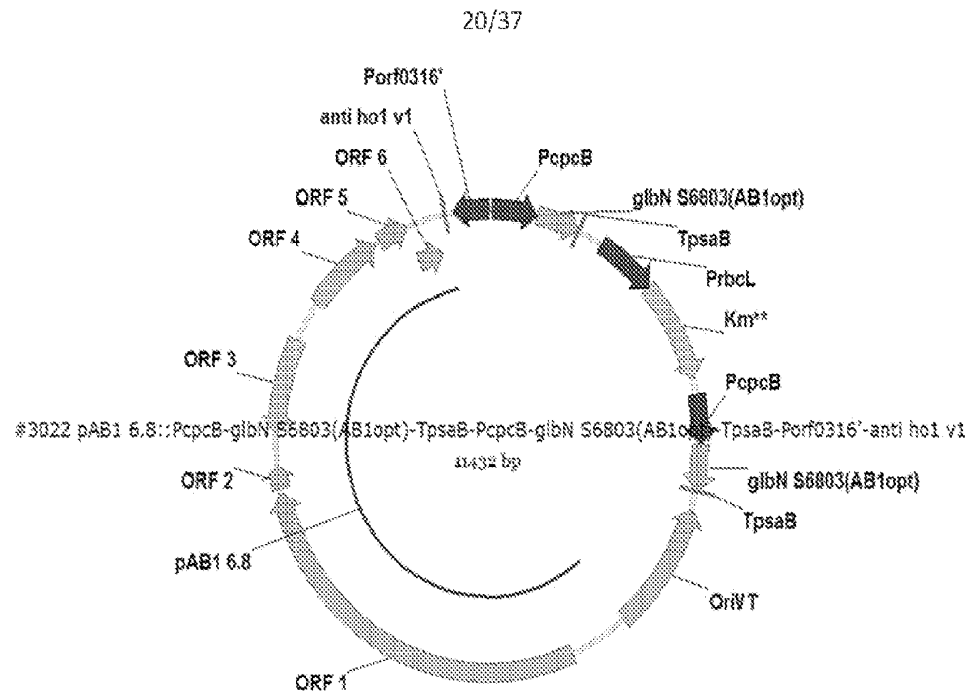
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\2
FT          /note="orf2"
FT  CDS      complement(7923..8687)
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\3
FT          /note="orf3"
FT  CDS      9013..9699
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\4
FT          /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT  CDS      9741..10004
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\5
FT          /note="orf5"
FT  CDS      10001..10249
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\6
FT          /note="orf6"
FT  CDS      1625..2440
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=Km**
FT          /note="Km**"
FT  promoter 1098..1624
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PrbcL
FT  terminator 873..910
FT          /vntifkey="43"
FT          /label=TpsaB
FT  promoter  101..497
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PcpCB
FT  CDS      498..872
FT          /vntifkey="4"
FT          /label-glbN_Ap8005(ABlopt)
SQ  Sequence 10491 BP; 3440 A; 1839 C; 2033 G; 3179 t;

```

FIG. 10 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785



ID #3022\pAB1_6.8::PcpCB-glbN_S6803(AB1opt)-TpsaB-PcpCB-glbN_S6803(AB1opt)-TpsaB-Porf0316'-anti ho1 v1 standard; circular DNA; 11432 BP.

CC This file is created by Vector NTI

CC VNTDATE|-12142984|

CC VNTDBDATE|-12163173|

Key	Location/Qualifiers
insertion_seq	4456..11055
	/source="p171-6HindIIIIBamHI"
	/type="Custom cloned insert"
	/vntifkey="14"
	/label=pAB1_6.8
	/note="Unknown feature type:insert"
rep_origin	complement(3391..4449)
	/vntifkey="33"
	/label=OriVT
CDS	4966..8151
	/vntifkey="4"
	/label=ORF\1
	/note="orf1 rep ori binding protein slr7037 homolog Similar to hypothetical protein slr7037 of plasmid pSYSA (103 kb) of Synechocystis sp. PCC 6803"
CDS	8187..8372
	/vntifkey="4"
	/label=ORF\2
	/note="orf2"
CDS	complement(8632..9396)
	/vntifkey="4"
	/label=ORF\3

FIG. 11

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

21/37

```

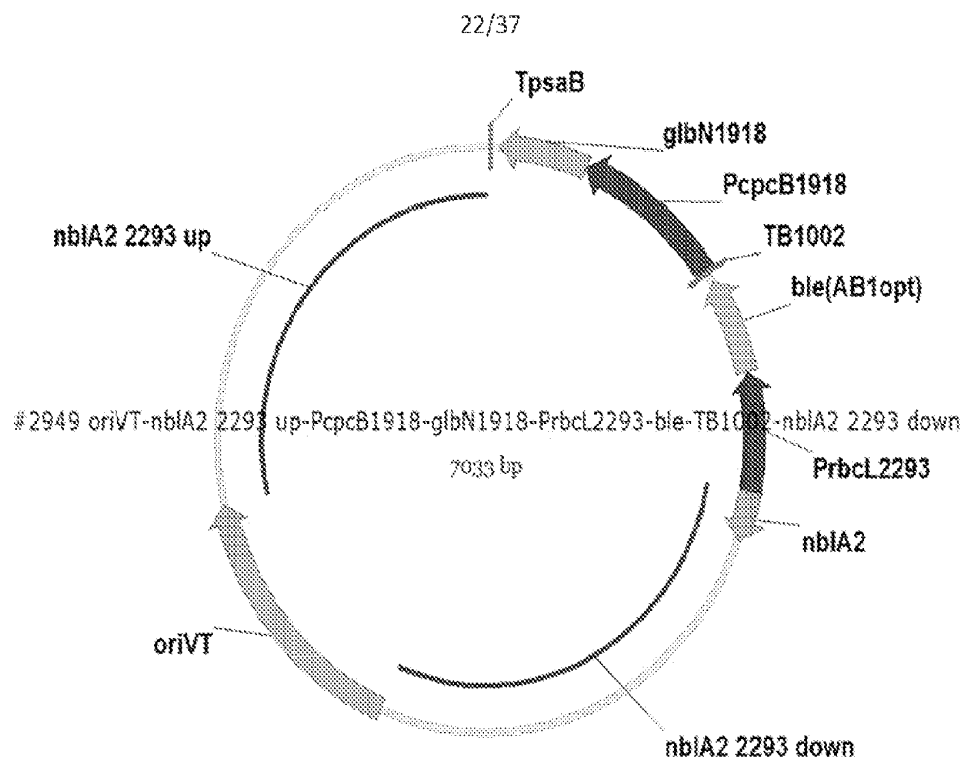
FT          /note="orf3"
FT   CDS      9722..10408
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\4
FT          /note="orf4 Integrase/Recombinase Similar to Site-specific
recombinase of Bacillus thuringiensis serovar israelensis ATCC 35646"
FT   CDS      10450..10713
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\5
FT          /note="orf5"
FT   CDS      10710..10958
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=ORF\6
FT          /note="orf6"
FT   CDS      1530..2345
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=Km**
FT          /note="Km**"
FT   promoter 1003..1529
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PrbcL
FT   terminator 778..815
FT          /vntifkey="43"
FT          /label=TpsaB
FT   promoter  6..402
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PcpCB
FT   CDS      403..777
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=glibN_S6803(ABlopt)
FT   promoter  complement(11126..11431)
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=Porf0316'
FT   misc_RNA  complement(11056..11125)
FT          /vntifkey="53"
FT          /label=anti_hol_v1
FT   promoter  2473..2869
FT          /vntifkey="30"
FT          /label=PcpCB
FT   CDS      2876..3244
FT          /vntifkey="4"
FT          /label=glibN_S6803(ABlopt)
FT   terminator 3245..3282
FT          /vntifkey="43"
FT          /label=TpsaB
SQ   Sequence 11432 BP; 3788 A; 1982 C; 2205 G; 3457 T;

```

FIG. 11 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785



ID #2949\oriVT-nblA2_2293_up-PcpcB1918-glbN1918-PrbcL2293-ble-TB1002-nblA2_2293_down standard; circular DNA; 7033 BP.

CC This file is created by Vector N11

CC VNTDATE|-12076613|

CC VNTDBDATE|-12076654|

Key	Location/Qualifiers
rep_origin	3964..5021
	/vntifkey="33"
	/label=oriVT
insertion_seq	1957..3949
	/vntifkey="14"
	/label=nblA2_2293_down
terminator	complement(1070..1102)
	/vntifkey="43"
	/label-TB1002
promoter	complement(1489..1948)
	/vntifkey="30"
	/label=PrbcL2293
CDS	complement(1109..1486)
	/vntifkey="4"
	/label=ble(AB1opt)
CDS	1957..2145
	/vntifkey="4"
	/label=nblA2
insertion_seq	5026..7027
	/vntifkey="14"

FIG. 12

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

23/37

```
FT      /label=nblA2_2293_up
FT promoter complement(418..1061)
FT      /vntifkey="30"
FT      /label=PcpbBi918
FT terminator complement(6..42)
FT      /vntifkey="43"
FT      /label=TpsaB
FT CDS complement(43..417)
FT      /vntifkey="4"
FT      /label=gibN1918
SQ      Sequence 7033 BP; 1878 A; 1718 C; 1541 G; 1896 T;
```

FIG. 12 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

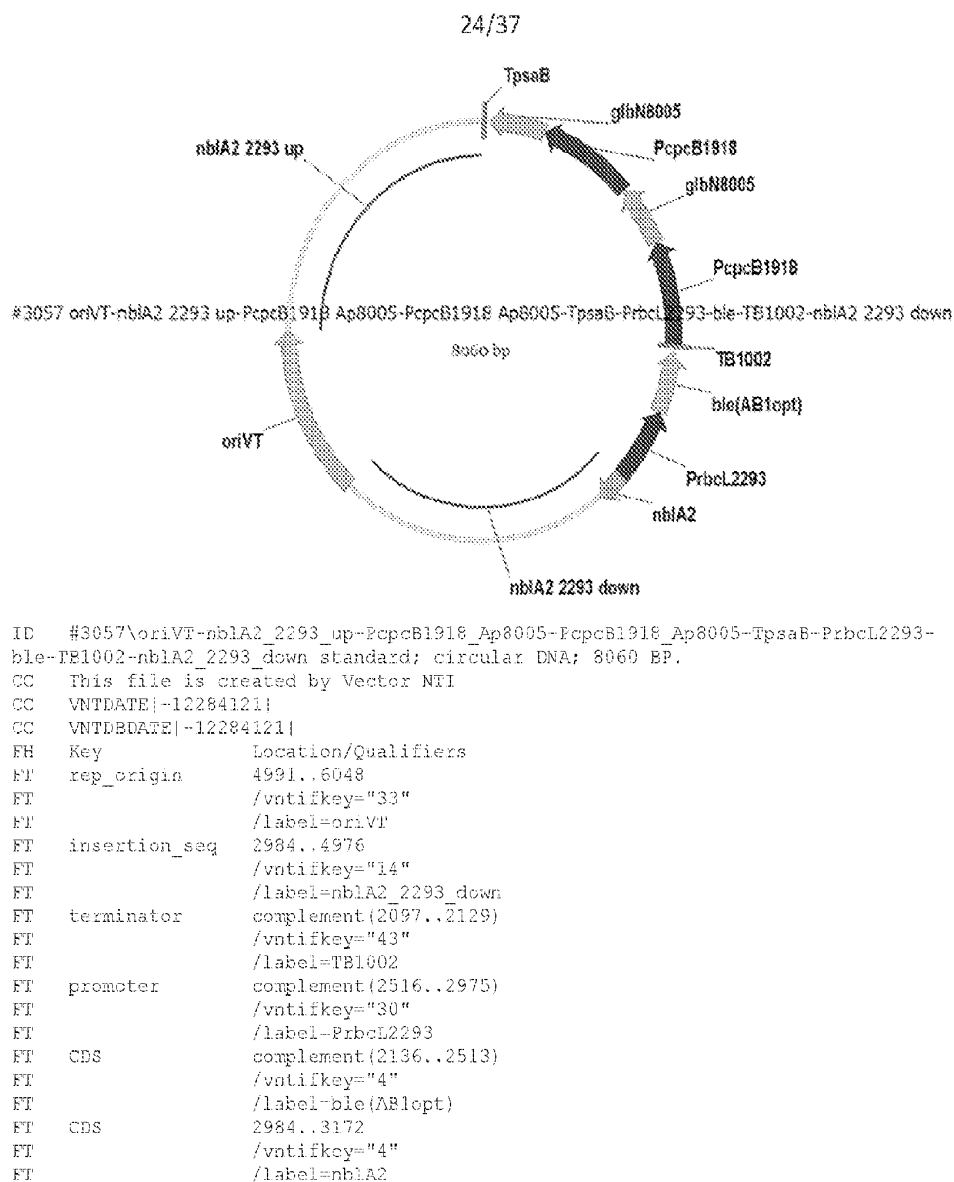


FIG. 13

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

25/37

```

FT   insertion_seq   6055..8054
FT                               /vntifkey="14"
FT                               /label=nbiA2_2293_up
FT   promoter        complement(418..1061)
FT                               /vntifkey="30"
FT                               /label=PcpcBi918
FT   terminator      complement(6..42)
FT                               /vntifkey="43"
FT                               /label=TpsaE
FT   CDS              complement(43..417)
FT                               /vntifkey="4"
FT                               /label=gibW8005
FT   promoter        complement(1445..2088)
FT                               /vntifkey="30"
FT                               /label=PcpcBi918
FT   CDS              complement(1070..1444)
FT                               /vntifkey="4"
FT                               /label=gibW8005
SQ   Sequence 8060 BP; 2179 A; 1972 C; 1727 G; 2182 t;

```

FIG. 13 (Continued)

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

26/37

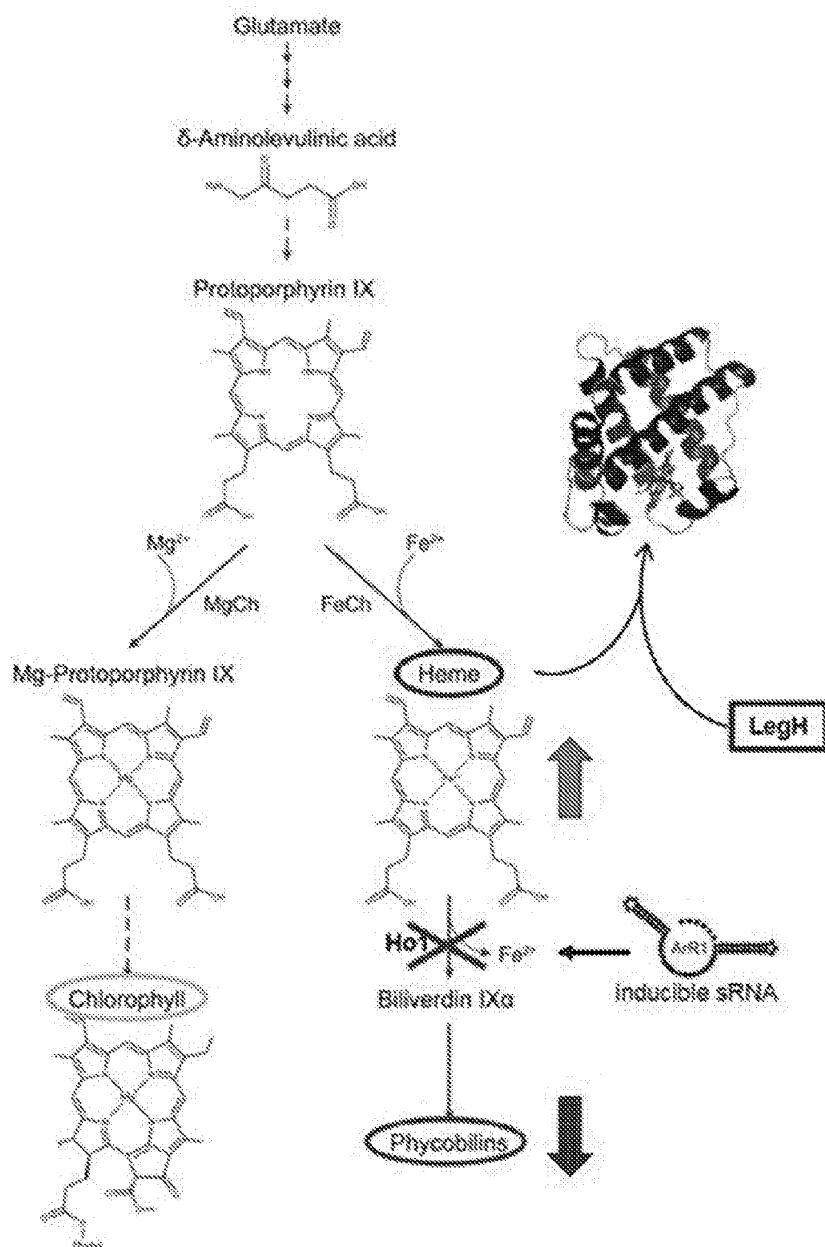


FIG. 14

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

27/37

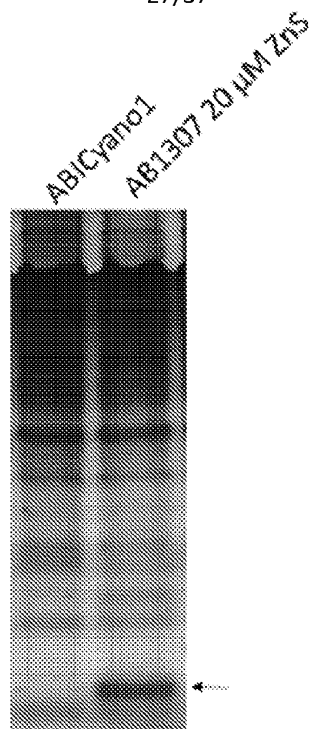


FIG. 15

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

28/37

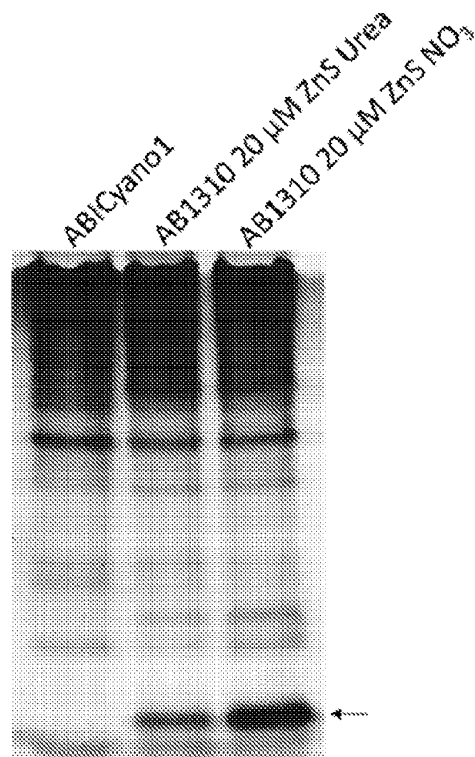


FIG. 16

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

29/37

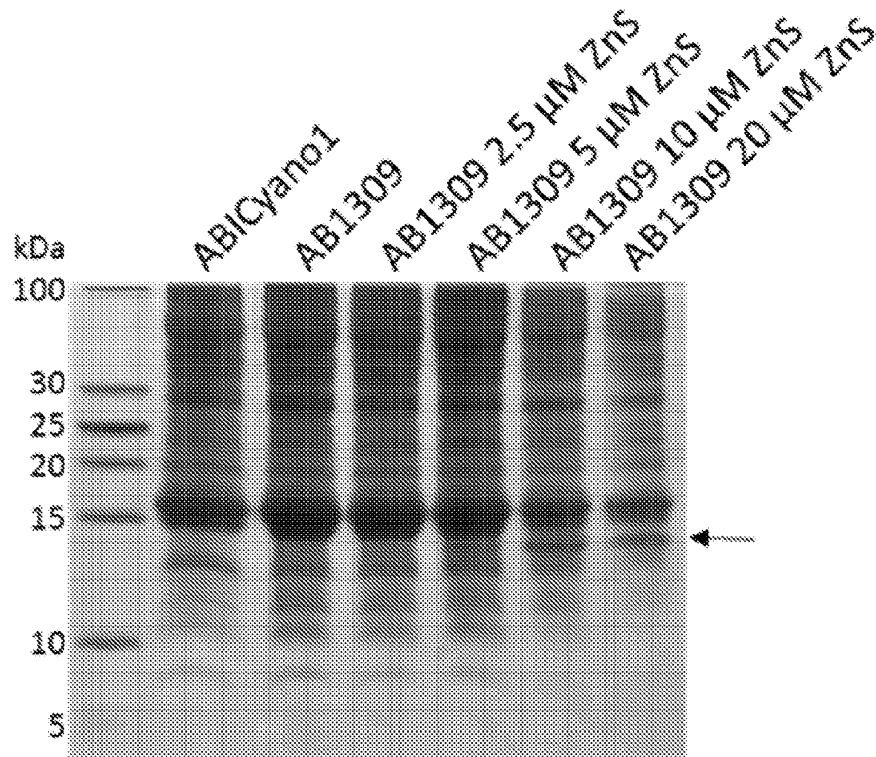


FIG. 17

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

30/37

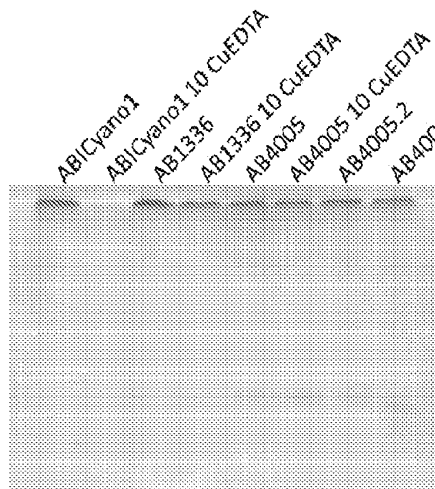


FIG. 18A

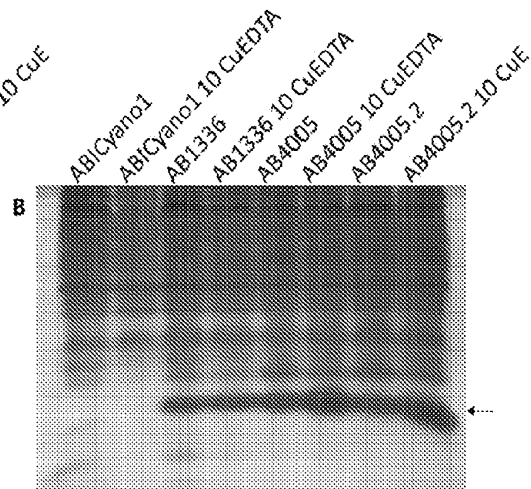


FIG. 18B

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

31/37

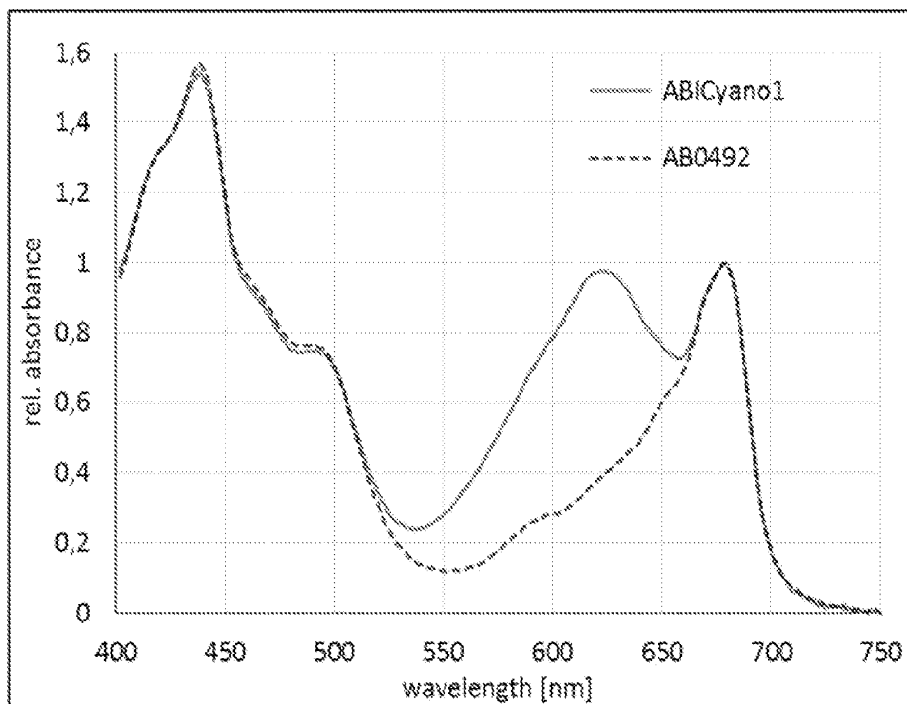


FIG. 19

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

32/37

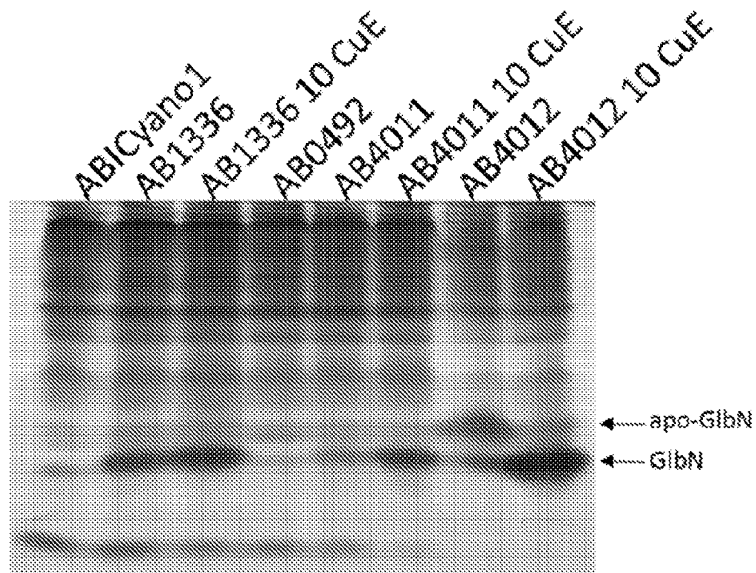


FIG. 20

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

33/37

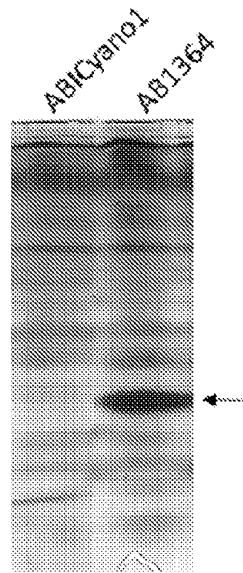


FIG. 21

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

34/37

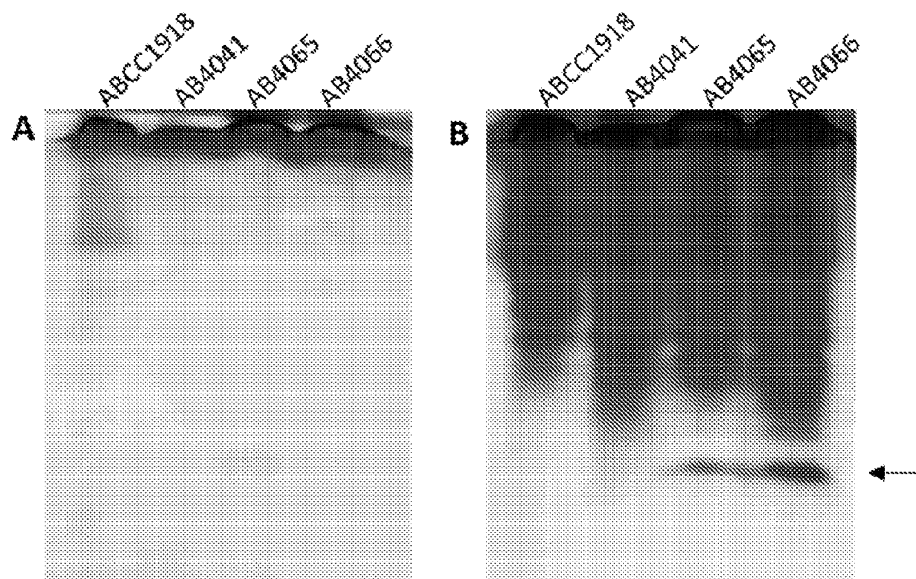


FIG. 22

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

35/37

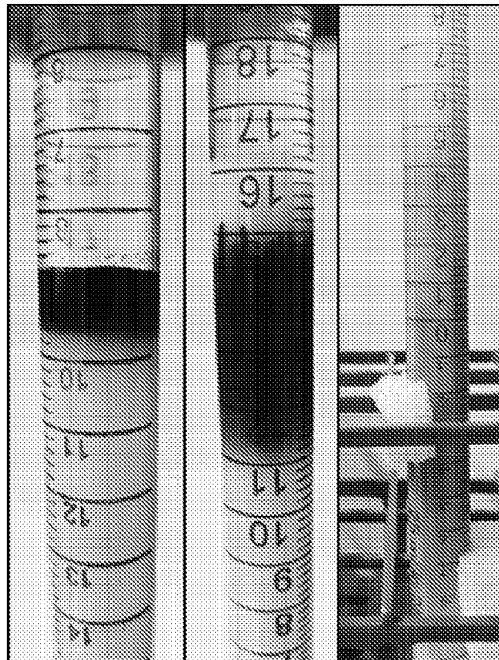


FIG. 23A

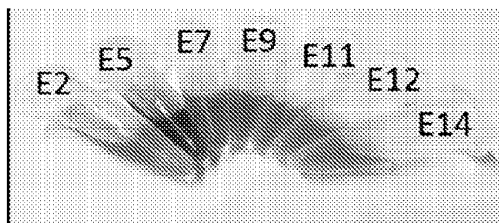


FIG. 23B

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

36/37

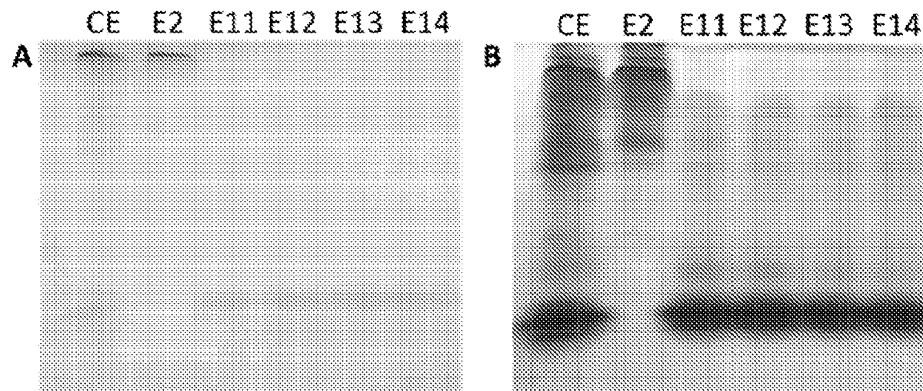


FIG. 24

WO 2019/079135

PCT/US2018/055785

37/37

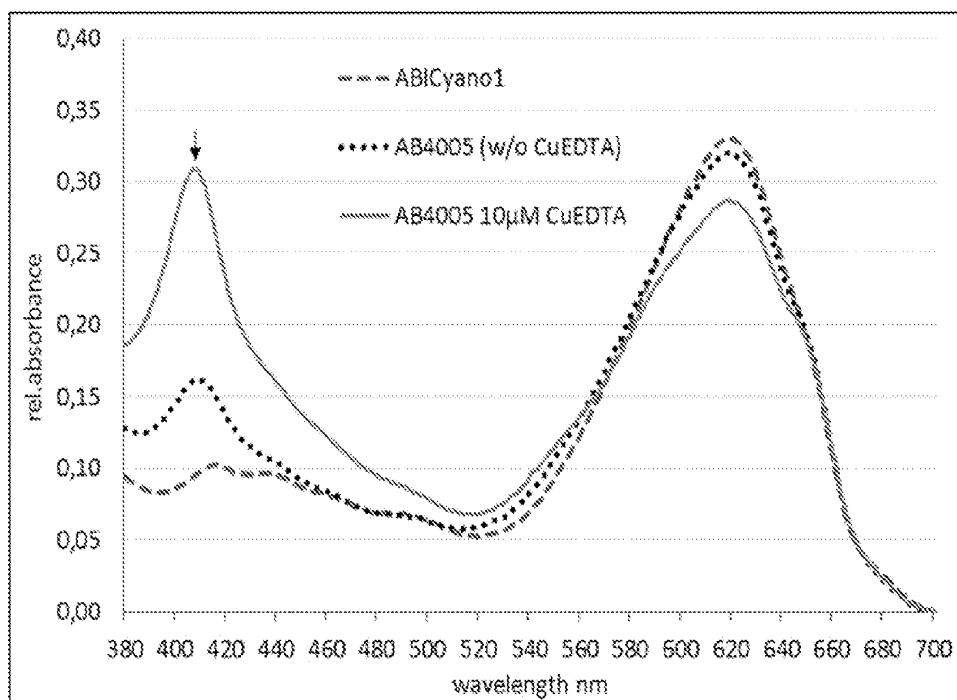


FIG. 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/55785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12P 21/04; C12N 15/74; C12N 1/12; C12N 1/20; A23J 1/00; A23L 1/30 (2018.01)
CPC - A23J 1/00; C12N 15/74; C12N 1/12; C12N 15/63; A23J 3/14; A23J 3/16; A23J 1/006; A23J 1/008; A23J 1/009

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2015/0322442 A1 (ALGENOL BIOFUELS INC.) 12 November 2015 (12.11.2015), para [0004], [0005], [0012], [0014], [0045], [0046], [0051], and [0068]	1-4
Y	US 2016/0340411 A1 (IMPOSSIBLE FOODS INC.) 24 November 2016 (24.11.2016), Abstract, para [0016], [0018], [0036], [0054], [0070], [0180], [0213], [0272], and SEQ ID NO: 4	1-4
A	GODIARD et al., MtbHLH1, a bHLH transcription factor involved in Medicago truncatula nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges. New Phytol. 2011, Vol. 191(2), p. 391-404. pg 399, col 1, to para, and Table 1	1-4
A	KOPKA et al., Systems analysis of ethanol production in the genetically engineered cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002. Biotechnol Biofuels. 2017 Mar, Vol. 10:56. PDF File: pg 1-21. Entire documentation, especially Abstract	1-4
A	LIU et al., Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, Vol. 108(17), p. 6899-904. Entire documentation, especially Abstract; and pg 6900, Fig 1 and Fig 2	1-4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 December 2018

Date of mailing of the international search report

19 FEB 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 18/55785

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-28
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-4, directed to a genetically modified cyanobacterium comprising a polynucleotide encoding a heterologous heme-containing protein. The polynucleotide encoding a heterologous heme-containing protein will be searched to the extent that wherein said polynucleotide encodes a leghemoglobin. It is believed that claims 1, 2-3(in part), 4/[1, 2-3(in part)] encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass wherein said polynucleotide encodes a leghemoglobin. Additional polynucleotide encoding a heterologous heme-containing protein will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected polynucleotide encoding a heterologous heme-containing protein. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be wherein said polynucleotide encodes a cyanoglobin [claims: (1), 2-3(in part), 4/[(1), 2-3(in part)]]. *****Continued in the extra sheet*****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2-3(in part), 4/[1, 2-3(in part)], limited to leghemoglobin

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/55785

Continuation of:
Box No III (unity of invention is lacking)

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Feature

Among Groups I+, a leghemoglobin is structurally different from a cyanoglobin, and vice versa; each is from a different recourse (see claim 3).

Common Technical Features

The inventions of Groups I+ share the technical features of a genetically modified cyanobacterium comprising a polynucleotide encoding a heterologous heme-containing protein (claim 1).

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being obvious over US 2015/0322442 A1 to ALGENOL BIOFUELS INC. (hereinafter 'ALGENOL'), in view of US 2016/0340411 A1 to IMPOSSIBLE FOODS INC. (hereinafter 'IMPOS_FOODS') as follows:

ALGENOL discloses a genetically modified cyanobacterium (para [0005] - 'Cyanobacteria can be modified to produce many types of secondary products'; para [0012] - 'genetically modified cyanobacteria') comprising --a polynucleotide encoding a heterologous protein of interest (para [0014] - 'a nucleic acid construct for expressing a recombinant gene in a cyanobacterium is provided...with a gene encoding a protein... a gene encoding pyruvate dehydrogenase, ... alcohol dehydrogenase E enzyme (AdhE)'; para [0045] - 'host cell...recombinant host cell...which can incorporate heterologous polynucleotide sequences ...transformed... the cell is...a cyanobacterial cell'; para [0051] - 'polynucleotide ... include nucleic acid molecules having an open reading frame encoding a polypeptide'; para [0068] - 'A host cell that comprises the recombinant polynucleotide is referred to as a 'recombinant host cell' ..."recombinant cyanobacterium....gene is then expressed in the recombinant host cell to produce...a recombinant protein').

ALGENOL further discloses wherein the genetically modified cyanobacterium comprising a vector, which can be used for efficiently transforming different species of Cyanobacteria (para [0004] - 'genetic enhancement of Cyanobacteria. A novel vector is described which is capable of efficiently transforming a broad range of cyanobacterial species'; para [0046] - 'a host cell that provides a sufficient cellular environment for expression of ... exogenous polynucleotides') for producing different products of interests including products of nutrients (para [0005] - 'Cyanobacteria can be modified to produce many types of secondary products, such as biofuels, pharmaceuticals, nutrients, carotenoids, etc'; para [0014]; para [0068]; All quotations as above).

ALGENOL does not specifically teach wherein the heterologous protein of interest is a heterologous heme-containing protein. IMPOS_FOODS discloses a method for producing a heterologous heme-containing protein using a genetically modified organism/cell (para [0036] - 'a genetically modified organism such as a genetically modified bacterium or yeast'; para [0016] - 'a genetically modified organism comprising a vector comprising a polynucleotide sequence encoding a heme-containing polypeptide'; Abstract - 'methods and compositions for the expression and secretion of heme-containing polypeptides'; para [0070] - 'an exogenous nucleic acid encoding a polypeptide of the disclosure (e.g., a heme-containing polypeptide, a globin)'), for food and/or nutrients production (para [0180] - 'methods for the use of a polypeptide of the disclosure in a meat consumable. The consumables can compete with, supplement or replace animal based foods...A meat consumable (e.g., substitute) can have similar physical characteristics as traditional meat ... nutrients'; para [0213] - 'Food Products Comprising Purified Polypeptide'; Abstract).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time the invention was made to combine the teachings of ALGENOL and IMPOS_FOODS, to obtain a genetically modified cyanobacterium comprising a polynucleotide encoding a heterologous protein of interest, as taught by ALGENOL, and further wherein the heterologous protein of interest is a heterologous heme-containing protein, based on the combination of IMPOS_FOODS and ALGENOL, in order to combine methods, cyanobacterium expression systems, and polynucleotide sequences encoding heme-containing proteins available in the art for facilitating obtaining a genetically modified cyanobacterium for producing a heterologous heme-containing protein with desired production levels with an expected success and without undue experimentation.

Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Continuation of item 4: Claims 5-28 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

OK TO ENTER: /E.G./

04/21/2021

Attorney Docket No.: 38767-0015008

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Named Inventor :	Rachel Fraser	Art Unit :	1796
Application No. :	15/913,090	Examiner :	Elizabeth A.
Filed :	March 6, 2018		Gwartney
		Conf. No. :	9878
Title :	METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES		

MAIL STOP AF

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

AMENDMENT AND REPLY TO ACTION OF FEBRUARY 8, 2021
FILED WITH REQUEST UNDER AFCP 2.0

This reply is in response to the Office Action dated February 8, 2021, with a three-month shortened statutory period set to expire May 8, 2021.

EAST Search History

EAST Search History (Prior Art)

Ref #	Hits	Search Query	DBs	Default Operator	Plurals	Time Stamp
L1	8	"2019079135"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2021/04/21 15:39
S1	1	"15913090"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2020/05/05 12:26
S2	9	"20120093994"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2020/05/06 10:51
S3	9	"20120093994"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2020/05/06 12:27
S4	46	A23J3/227.cpc. AND heme	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2020/05/06 14:40

EAST Search History (Interference)

Ref #	Hits	Search Query	DBs	Default Operator	Plurals	Time Stamp
S5	576	A23L13/426.cpc.	US-PGPUB; USPAT	OR	OFF	2021/04/21 14:11
S6	480	A23J3/227.cpc.	US-PGPUB; USPAT	OR	OFF	2021/04/21 14:14

4/21/2021 3:41:09 PM

C:\Users\egwartney\Documents\EAST\Workspaces\15913090.wsp



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

BIB DATA SHEET

CONFIRMATION NO. 9878

SERIAL NUMBER	FILING or 371(c) DATE	CLASS	GROUP ART UNIT	ATTORNEY DOCKET NO.		
15/913,090	03/06/2018	426	1796	38767-0015008		
APPLICANTS Impossible Foods Inc., Redwood City, CA;						
INVENTORS Rachel Fraser, San Francisco, CA; Patrick O'Reilly Brown, Stanford, CA; Jessica Karr, San Francisco, CA; Celeste Holz-Schietinger, East Palo Alto, CA; Elysia Cohn, Sunnyvale, CA;						
** CONTINUING DATA ***** This application is a CON of 15/398,479 01/04/2017 PAT 9943096 which is a CON of 14/797,006 07/10/2015 PAT 9700067 which is a CON of PCT/US2014/011347 01/13/2014 which is a CON of 13/941,211 07/12/2013 ABN and claims benefit of 61/908,634 11/25/2013 and claims benefit of 61/751,816 01/11/2013						
** FOREIGN APPLICATIONS *****						
** IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED ** 04/06/2018						
Foreign Priority claimed ☐ Yes ☒ No 35 USC 119(a-d) conditions met ☐ Yes ☒ No Verified and /ELIZABETH A Acknowledged GWARTNEY/ Examiner's Signature		☐ Met after Allowance Initials	STATE OR COUNTRY CA	SHEETS DRAWINGS 5	TOTAL CLAIMS 23	INDEPENDENT CLAIMS 1
ADDRESS FISH & RICHARDSON P.C. (TC) PO BOX 1022 MINNEAPOLIS, MN 55440-1022 UNITED STATES						
TITLE METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES						
FILING FEE RECEIVED 2020	FEES: Authority has been given in Paper No. _____ to charge/credit DEPOSIT ACCOUNT No. _____ for following:			☐ All Fees ☐ 1.16 Fees (Filing) ☐ 1.17 Fees (Processing Ext. of time) ☐ 1.18 Fees (Issue) ☐ Other _____ ☐ Credit		

PTO/SB/30 (11-17)
Approved for use through 11/30/2020. OMB 0651-0031
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

Request for Continued Examination (RCE) Transmittal Address to: Mail Stop RCE Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, VA 22313-1450	Application Number	15/913,090
	Filing Date	March 6, 2018
	First Named Inventor	Rachel Fraser
	Art Unit	1796
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney
	Attorney Docket Number	38767-0015008

This is a Request for Continued Examination (RCE) under 37 CFR 1.114 of the above-identified application.
Request for Continued Examination (RCE) practice under 37 CFR 1.114 does not apply to any utility or plant application filed prior to June 8, 1995, or to any design application. See Instruction Sheet for RCEs (not to be submitted to the USPTO) on page 2.

1. **Submission required under 37 CFR 1.114** Note: If the RCE is proper, any previously filed unentered amendments and amendments enclosed with the RCE will be entered in the order in which they were filed unless applicant instructs otherwise. If applicant does not wish to have any previously filed unentered amendment(s) entered, applicant must request non-entry of such amendment(s).

a. ☐ Previously submitted. If a final Office action is outstanding, any amendments filed after the final Office action may be considered as a submission even if this box is not checked.

i. ☐ Consider the arguments in the Appeal Brief or Reply Brief previously filed on _____

ii. ☐ Other _____

b. ☒ Enclosed

i. ☐ Amendment/Reply

ii. ☐ Affidavit(s)/ Declaration(s)

iii. ☒ Information Disclosure Statement (IDS)

iv. ☐ Other _____

2. **Miscellaneous**

Suspension of action on the above-identified application is requested under 37 CFR 1.103(c) for a

a. ☐ period of _____ months. (Period of suspension shall not exceed 3 months; Fee under 37 CFR 1.17(i) required)

b. ☐ Other _____

3. **Fees**

The RCE fee under 37 CFR 1.17(e) is required by 37 CFR 1.114 when the RCE is filed.
The Director is hereby authorized to charge the following fees any underpayment of fees, or credit any overpayments to

a. ☒ Deposit Account No. 06-1050

i. ☒ RCE fee required under 37 CFR 1.17(e)

ii. ☐ Extension of time fee (37 CFR 1.136 and 1.17)

iii. ☒ Other any deficiencies

b. ☐ Check in the amount of \$ _____ enclosed

c. ☐ Payment by credit card (Form PTO-2038 enclosed)

d. ☒ Payment by EFS-Web

WARNING: Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT REQUIRED			
Signature	/Molly R. Kelley, Reg. No. 76,691/	Date	May 5, 2021
Name (Print/Type)	Molly R. Kelley	Registration No.	76691

CERTIFICATE OF MAILING OR TRANSMISSION			
I hereby certify that this correspondence is being EFS-Web transmitted to the United States Patent and Trademark Office (USPTO), deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Mail Stop RCE, Commissioner for Patents, P. O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 or facsimile transmitted to the USPTO on the date shown below.			
Signature			
Name (Print/Type)		Date	

This collection of information is required by 37 CFR 1.114. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Mail Stop RCE, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
3 March 2005 (03.03.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/019165 A1

(51) International Patent Classification⁷: **C07C 323/58**,
A23L 1/231

(21) International Application Number:
PCT/CH2004/000504

(22) International Filing Date: 13 August 2004 (13.08.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0319463.6 20 August 2003 (20.08.2003) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): **GIVAUDAN SA** [CH/CH]; Chemin de la Parfumerie 5, CH-1214 Vernier (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DE ROOS, Kris** [NL/NL]; Frans Tromplaan 77, NL-3871 EM Hoevelaken (NL). **WOLSWINKEL, Kees** [NL/NL]; Valkenhorst 45, NL-3925TG Scherpenzeel (NL).

(74) Agent: **MCSTEA, John, Anthony**; Ueberlandstrasse 138, CH-8600 Duebendorf (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PI, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

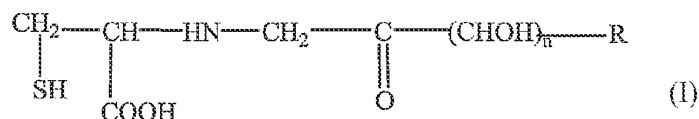
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2005/019165 A1

(54) Title: MAILLARD REACTION COMPOUNDS OF CYSTEINE AND A SUGAR HAVING MEATLIKE FLAVOUR



(57) Abstract: The Amadori compounds of cysteine of Formula (I) in which R is hydrogen when n=1-4, or methyl when n=0-3. The compounds are useful for conferring meaty tastes and aromas on foodstuffs.

WO 2005/019165

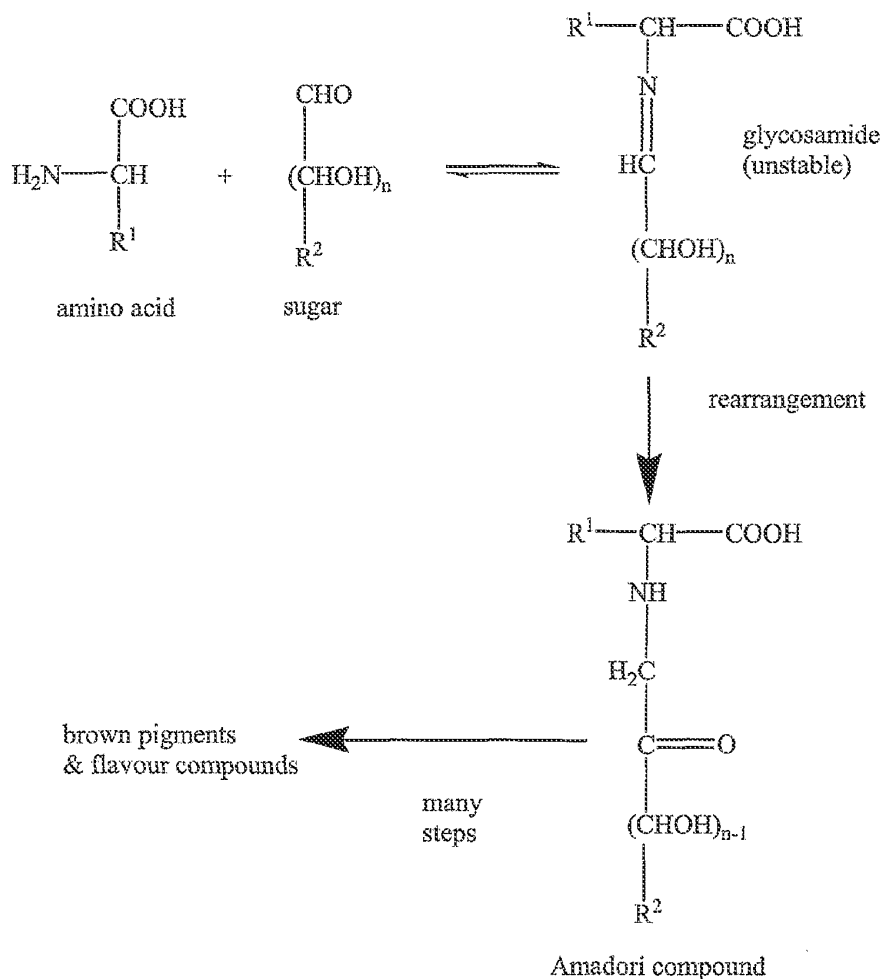
PCT/CH2004/000504

MAILLARD REACTION COMPOUNDS OF CYSTEINE AND A SUGAR HAVING MEATLIKE FLAVOUR

This invention relates to a method of providing meat flavouring to foodstuffs and to novel compounds for providing such flavouring.

5

It is known that the formation of meat flavour proceeds via a sequence of steps known as the Maillard reaction. The sequence may be represented as follows:



10 The Maillard reaction is also known as non-enzymatic browning. The Amadori compounds are key intermediates in the formation of flavours.

WO 2005/019165

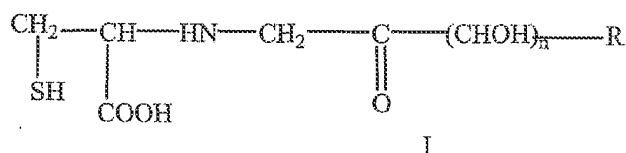
PCT/CH2004/000504

2

One amino acid for which no Amadori compound has hitherto been identified is cysteine ($\text{CH}_2(\text{SH}).\text{CH}(\text{NH}_2).\text{COOH}$). Cysteine plays an important role in the development of flavour in meat, and this is believed to result from its ability to release hydrogen sulphide under the conditions of the Maillard reaction (see, for example, Kobayashi and Fujimaki in Agric. Biol. Chem., 29, 698-81965). Numerous references have attributed to sulphur compounds a central role in the formation of meat flavours. However, unlike all other amino acids, cysteine has hitherto been believed to inhibit the Maillard reaction, because it tends to form relatively stable 2-glycosylthiazolidine-4-carboxylic acids, and this reaction competes with, and may even prevent, the formation of Amadori compounds.

10

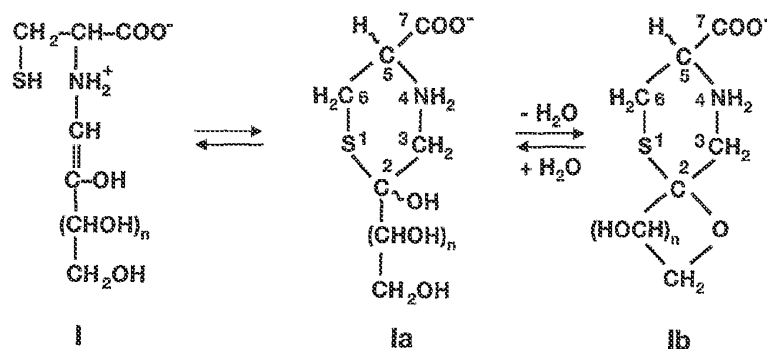
It has now been found, surprisingly, that, not only is it possible to make Amadori compounds from cysteine, but also that these compounds are particularly effective at conferring meat flavour in foodstuffs. The invention therefore provides a compound of the formula I:



15

in which R is hydrogen when $n=1-4$, or methyl when $n=0-3$.

Although the compound is depicted as being of formula I, this form of the compound is in fact in equilibrium with two other forms, Ia and Ib, as shown below:



20

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

3

All three forms are included within the scope of this invention. Also included are all other isomeric forms, of which a number are possible (for example, when L-cysteine reacts with a D- or L-sugar).

- 5 The compounds may be prepared by known methods. Amino acids or their salts may be reacted with an aldose either in the presence of about 20% of water (see E.F.L.J. Anet, Austr. J. Chem. 10, 193-197 (1957)) or in an organic solvent (see K. Heyns and H. Paulen, Liebigs Ann. Chem., 622, 160 (1959)). In all preparations of Amadori compounds so far known, a reaction medium with low water content is essential to bring about the required condensation
10 with aldoses to glycosyl amines. However, the preparation of the Amadori compounds of cysteine can also conveniently be carried out in dilute aqueous solutions or in mixtures of water with water-miscible solvents. It is not necessary to isolate the initially-formed 2-glycosylthiazolidine-4-carboxylic acids. The formation of the Amadori compounds from cysteine plus sugar or from 2-glycosylthiazolidine-4-carboxylic acid is subject to general acid
15 catalysis. For this reason, the reactions are preferably carried out in the presence of buffers having a pH of between 1 and 9, preferably between 2 and 6.

Although the Amadori rearrangement proceeds at room temperature, it is preferred to accelerate it by heating. The preferred temperature will depend on the solvents used and on the
20 reactant concentrations, but the temperature generally lies between 60° and 110°C. At 90°-100°C, the preferred reaction time of the aqueous buffered reaction mixture is from 1-12 hours.

The sugars to be used for the present invention are aldoses with 3-6 carbon atoms, including
25 aldopentoses, aldohexoses and deoxyaldohexoses. Specific sugar examples are the aldopentoses ribose, arabinose, xylose and lyxose, the aldohexoses glucose, mannose and galactose and the 6-deoxyaldohexoses rhamnose, fucose and chinovose. Mixtures thereof can also be used. In addition, all stereoisomeric forms of these sugars may be used.

- 30 The cysteine may be used as the compound itself or in the form of a derivative or a salt, which form free cysteine under the reaction conditions. Both L- and D-cysteine and mixtures thereof

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

4

may be used. The molar proportions of the cysteine and the aldose may vary between 2:1 and 1:5, preferably between 1.2:1 and 1:1.5.

The buffers used may comprise mixtures of weak acids and bases or compounds that possess
5 both an acidic and a basic function. Suitable acids include carboxylic acids and phosphoric acid. Typical examples of bases include the salts of the previously-mentioned acids, for example, their alkali metal salts of their salts with nitrogen-containing bases such as pyridine, α -picoline and tertiary amines. Primary and secondary amines may also be used, but preferably only if the reaction medium contains a large excess of water, to prevent the
10 competitive reactions of these amines with the aldose to glycosylamines and Amadori rearrangement compounds of these amines. Examples of compounds with both acidic and basic functions are amino acids or their salts, for example glycine, proline and monosodium glutamate, or ribonucleotides or their salts, such as disodium inosine-5'-monophosphate. The buffers are preferably used in concentrations of from 0.1 to 10 times the molar concentration
15 of cysteine.

The Amadori compounds thus prepared may be isolated as crude products and purified by known methods to give the compounds in colourless, crystalline form.

20 The Amadori compounds of this invention may be used to impart a meat-like taste to foodstuffs, both meat and non-meat, by incorporation of the compounds or compositions containing them into the foodstuff and subsequent heating. The preferred heating time depends on the water activity, the temperature used and the nature of the Amadori compound, but typically it is about the time needed to fry or cook meat.

25

The invention therefore also provides a method of conferring a meaty flavour or aroma on a foodstuff, comprising the addition to the foodstuff before heating of a compound as hereinabove described. The invention additionally provides the use of a compound as hereinabove described to confer on a foodstuff a meaty flavour or aroma.

30

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

5

The concentration required may vary over a wide range, depending on the desired taste and aroma effects, but as a general guide, they are employed in concentrations of from 5 to 5000 ppm by weight of foodstuff in consumable form. Good results are obtained by using from 200-2000 ppm.

5

The Amadori compounds of this invention may be used in combination with other known food additives, such as flavour compounds, aroma enhancers, and the like.

The invention is further described with reference to the following non-limiting examples.

10

EXAMPLE 1

Preparation of Amadori compound of L-cysteine and D-xylose

A solution of 60.5 g (0.50 mol) L-cysteine 82.5 g (0.55 mol) D-xylose and 50 g (about 0.60
15 mol) of a mixture of methylated pyridines in 750 ml demineralised water was heated to about 95°C on a water bath in a 1L round-bottomed flask equipped with a reflux condenser. After 0.5 h, 120 g (2.0 mol) acetic acid was added and the solution was heated for a further 6 h at 90°C. The conversion to Amadori compound was then about 25%. The solution was cooled to room temperature and the solution was then continuously extracted with ether to remove the
20 methylated pyridines. The solution was passed through a 40 x 4 cm column of Bio-Rad AG 50W-X4 (H⁺) cation exchange resin. The column was washed with 1 L water and the absorbed substances were displaced from the column with 0.3N ammonia. Fractions containing more than 50% of the compound were combined and evaporated *in vacuo* to small volume. After the addition of just enough ethanol to cause no cloudiness, crystalline compound separated. The
25 pure compound did not melt but decomposed above 170°C.

Found : C 37.87; H 5.96; N 5.51; S 12.65; O 37.80.

Calc. for C₈H₁₅NSO₆ (253.27) : C 37.94; H 5.97; N 5.53; S 12.66; O 37.90.

The product was dried prior to element analysis (*in vacuo* over P₂O₅, 18 h at 69°C).

30 The results of a ¹³C NMR spectrum (in D₂O; δ in ppm, referenced to sodium 3-trimethylsilyl [2,2,3,3-²H₄]-propionate) were as follows:

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

6

<u>Major isomer</u>	<u>Minor isomer</u>	<u>assignment</u>
26.9(t)	25.6(t)	C6
53.8(t)	50.2(t)	C3
61.5(d)	57.0(d)	C5
5 65.2(t)	65.2(t)	CH ₂ OH
71.9(d)	71.6(d)	} CHOH
75.0(d)	76.6(d)	
81.5(s)	80.9(s)	C2
173.4(s)	173.0(s)	carboxyl carbon

10

EXAMPLE 2

Preparation of Amadori compound of L-cysteine and D-xylose

L-cysteine.HCl monohydrate (17.6 g; 0.1 mol) was dissolved in 50 ml of demineralized water
15 contained in a 150-ml round-bottomed flask. Disodium hydrogen phosphate (14.2 g; 0.10 mol)
or 90% lactic acid (10 g; 0.10 mol) was added and the pH of the resulting solution adjusted to
5.0 by slowly adding with stirring an aqueous 50% sodium hydroxide solution. The sugar
(0.11 mol) was then added and the mixture stirred for 1 h at 50 °C to obtain an equilibrium
mixture of thiazolidine, cysteine and sugar. After cooling to room temperature, the pH was re-
20 adjusted to 5.4 by addition of 50% sodium hydroxide solution. The water content was adjusted
by evaporation *in vacuo* to 30%. The flask was then equipped, via a double neck adapter, with
a mechanical stirrer and a reflux condenser, and heated with stirring for 7 h in a thermostated
water bath of 80 °C. The conversion to Amadori compound is 35%. Isolation was performed
as described in Example 1.

25

EXAMPLE 3

Continuous process for production of Amadori compound of L-cysteine and D-xylose

The continuous reactor consisted of a 45x2.5 ID cm glass column with temperature control
30 jacket packed with Bio-Rex 9 anion exchange resin (OH⁻), 100-200 mesh. A restriction
consisting of a 500 x 0.3 mm ID TeflonTM tubing was connected to the column outlet to
prevent the formation of gas bubbles in the column. The column was thermostated at 90 °C. A

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

7

50% thiazolidine solution, prepared by heating equimolar amounts of cysteine and xylose in water for 1 h at 50 °C, was pumped through the column at a rate of 0.5 ml/min. Analysis of samples taken at regular time intervals showed that the conversion to Amadori compound increased from 12% after 2 hrs to 35% after 6 hrs. The yield of the corresponding batch process was 22.5%. The Amadori compound was isolated from the column eluate by *evaporation in vacuo* and crystallization of the residue from water-ethanol as in Example 1.

EXAMPLE 4

Preparation of the Amadori compound of L-cysteine and D-ribose

10

The same equipment was used as was used in Example 1. 12.1g (0.1 mol) of L-cysteine, 15g (0.1 mol) of D-ribose and 27.2g (0.2 mol) of potassium dihydrogen phosphate in 150 ml demineralised water were heated for 6h at ca. 90°C under nitrogen. The resulting brown solution was passed through a 35 x 2.5cm column of Dowex™ 50W-X4 (H⁺) cation exchange resin. The neutral components were washed from the column with 1L water and the nitrogen-containing substances were displaced from the column with 0.3N ammonia. Fractions containing more than 50% of the compound were combined and evaporated *in vacuo* to small volume. After the addition of just enough ethanol to cause no cloudiness, crystalline compound separated. The pure compound did not have a sharp melting point but decomposed at 132°-135°C. The results of a ¹³C NMR spectrum (in D₂O; δ in ppm) were as follows:

	<u>Major isomer</u>	<u>Minor isomer</u>	<u>assignment</u>
	26.8(t)	25.7(t)	C6
	55.2(t)	51.1(t)	C3
25	61.9(d)	57.3(d)	C5
	65.6(t)	65.3(t)	CH ₂ OH
	74.0(d)	73.4(d)	} CHOH
	75.9(d)	77.8(d)	
	82.7(s)	81.1(s)	C2
30	174.0(s)	173.5(s)	carboxyl carbon

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

8

EXAMPLE 5

Preparation of the Amadori compound of L-cysteine and L-arabinose

The process of Example 3 was repeated with L-arabinose instead of D-xylose. The resulting
5 crystalline material melted with decomposition at 171-173 °C.

The results of a ^{13}C NMR spectrum (in D_2O ; δ in ppm) were as follows:

	<u>Major isomer</u>	<u>Minor isomer</u>	<u>assignment</u>
	26.9(t)	25.8(t)	C6
10	54.9(t)	51.7(t)	C3
	62.1(d)	57.2(d)	C5
	65.4(t)	65.6(t)	} CH_2OH } CHOH
	73.7(d)	73.9(d)	
	77.7(d)	76.2(d)	
15	81.1(s)	82.8(s)	C2
	174.0(s)	173.6(s)	carboxyl group

EXAMPLE 6

Preparation of the Amadori compound of L-cysteine and D-glucose

20

An aqueous solution of 12.1g (0.1 mol) of L-cysteine, 19.8g (0.1 mol) of D-glucose and 11.5g (0.1 mol) of L-proline was concentrated *in vacuo* to a syrup containing approximately 20% of water. The syrupy mixture was heated on a water bath at 95°C for 2.5h. HPLC analysis showed that, in addition to the Amadori compound of L-cysteine, the Amadori compound of
25 L-proline was also formed, in the ratio of 3:1. The brown reaction mixture was dissolved in 500ml water and the Amadori compounds recovered as described in Example 2. The results of a ^{13}C NMR spectrum (in D_2O ; δ in ppm) were as follows:

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

9

	<u>Major isomer</u>	<u>Minor isomer</u>	<u>assignment</u>
	27.1(t)	25.9(t)	C6
	54.1(t)	50.3(t)	C3
	61.6(d)	57.2(d)	C5
5	65.1(t)	65.1(t)	C6'
	63.3(t)	63.0(t)	CH ₂ OH
	71.6(d)	71.3(d)	} CHOH
	73.3(d)	73.5(d)	
	74.4(d)	76.1(d)	
10	81.8(s)	81.1(s)	C2
	173.6(s)	173.0(s)	carboxyl carbon

EXAMPLE 7

Preparation of the Amadori compound of L-cysteine and L-rhamnose

15

A solution of 3.3 g (0.30 mol) L-cysteine 49g (0.27 mol) L-rhamnose monohydrate and 30 g (about 0.0 mol) of a mixture of methylated pyridines and 72g (1.20 mol) acetic acid in 450 ml demineralised water was heated for 8h on a steam bath in a 1L round-bottomed flask equipped with a reflux condenser. The resulting brown reaction mixture was purified as described in

20 Example 1. The resulting crystalline compound decomposed at 183°C. The results of a ¹³C NMR spectrum (in D₂O; δ in ppm) were as follows:

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

10

	<u>Major isomer</u>	<u>Minor isomer</u>	<u>assignment</u>
	21.1 or 21.2(q)	21.1 or 21.2(q)	CH ₃
	26.9(t)	25.9(t)	C6
	54.3(t)	50.8(t)	C3
5	62.1(d)	57.0(d)	C5
	69.9(d)	69.7(d)	
	75.2(d)	74.7(d)	CHOH
	75.8(d)	75.4(d)	
	81.3(s)	81.8(s)	C2
10	173.9(s)	173.5(s)	carboxyl carbon

EXAMPLE 8

Sensory evaluation of Amadori compounds

15 A beef broth was prepared. Four portions of this broth were treated as follows:

- Portion A: no treatment (control);
- Portion B: addition of 480ppm (4.0mmol/L) L-cysteine + 552ppm (4.0 mmol/L) D-xylose;
- Portion C: addition of 1000ppm (4.0 mmol/L) 2-xylosylthiazolidine-4-carboxylic acid
- 20 (prepared according to R. Bognár *et al*, Liebigs Ann.Chem.738, 68 (1970);
- Portion D: addition of 1000ppm (4.0 mmol/L) of the Amadori compound of Example 1.

The mixtures were bottled and sterilised in an autoclave for 1h at 100°C. On sensory evaluation, Mixture D was preferred, because of its much stronger meaty taste. Moreover, it

25 lacked the cysteine-like off-taste of Mixture B and the hydrogen sulphide-like off-odour of Mixture C.

WO 2005/019165

PCT/CH2004/000504

11

EXAMPLE 9

Test in a gravy

A gravy was prepared by heating 100g of commercial, flavoured margarine to 160°C. On
5 reaching this temperature, 35ml water was added. This was used as an unflavoured control.

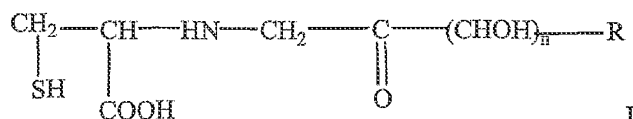
A second gravy was prepared by adding 100mg (1000ppm) of the Amadori compound of
Example 2 to 100g of margarine and heating to 160°C. When this temperature was reached,
35ml water was added.

10

A taste comparison revealed a considerable preferment for the gravy containing the Amadori
compound, because of its pronounced, nicely roast, meaty taste.

CLAIMS

1. A compound of the formula I:



5

in which R is hydrogen when n=1-4, or methyl when n=0-3.

2. A method of preparing a compound according to claim 1, comprising the reaction of cysteine with a sugar in either aqueous solution or in a mixture of water and water-miscible solvents.
3. A method according to claim 2, in which the reaction is accelerated by heating, preferably to between 60° and 110°C.
4. A method according to claim 2, in which the reaction is carried out in the presence of a buffer having a pH of from 1-9, preferably of from 2-6.
5. A method of conferring a meaty flavour or aroma on a foodstuff, comprising the addition to the foodstuff before heating of a compound according to claim 1.
6. Use of a compound according to claim 1 to confer on a foodstuff a meaty flavour or aroma.

20

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
.../CH2004/000504A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07C323/58 A23L1/231

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07C A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3 620 772 A (KITADA NAGAYOSHI ET AL) 16 November 1971 (1971-11-16) the whole document	1-6
X	GB 1 232 719 A (AJINOMOTO CO.) 19 May 1971 (1971-05-19) the whole document	1-6
X	GB 1 469 331 A (PFIZER LTD) 6 April 1977 (1977-04-06) the whole document	1-6
X	GB 836 694 A (UNILEVER LTD) 9 June 1960 (1960-06-09) the whole document	1-6
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 October 2004

Date of mailing of the international search report

07/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lorenzo Varela, M.J.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
/CH2004/000504

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 592 917 A (TANDY JOHN S) 3 June 1986 (1986-06-03) the whole document	1-6
X	US 3 741 775 A (LEE C) 26 June 1973 (1973-06-26) the whole document	1-6
X	US 3 532 514 A (MAY CHARLES GERARD) 6 October 1970 (1970-10-06) the whole document	1-6
X	US 3 660 114 A (THOMAS PAUL D) 2 May 1972 (1972-05-02) the whole document	1-6
X	GB 1 082 504 A (PFIZER & CO C) 6 September 1967 (1967-09-06) the whole document	1-6
X	US 5 723 504 A (MIODUSZEWSKI JAN ZBIGNIEW ET AL) 3 March 1998 (1998-03-03) the whole document	1-6
X	GB 1 285 568 A (UNILEVER LTD.) 16 August 1972 (1972-08-16) the whole document	1-6
X	EP 0 320 057 A (UNILEVER PLC ; UNILEVER NV (NL)) 14 June 1989 (1989-06-14) the whole document	1-6

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

/CH2004/000504

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3620772	A	16-11-1971	FR 2005135 A5 GB 1206265 A IT 1045511 B	05-12-1969 23-09-1970 10-05-1980
GB 1232719	A	19-05-1971	CH 503470 A FR 2012745 A5	28-02-1971 20-03-1970
GB 1469331	A	06-04-1977	BE 825417 A1 CA 1047306 A1 DE 2506715 A1 DK 57175 A FR 2260957 A1 IE 40609 B1 JP 50111265 A LU 71861 A1 NL 7501741 A US 3966985 A	11-08-1975 30-01-1979 21-08-1975 27-10-1975 12-09-1975 04-07-1979 01-09-1975 05-01-1977 20-08-1975 29-06-1976
GB 836694	A	09-06-1960	NONE	
US 4592917	A	03-06-1986	AT 35372 T AU 572626 B2 AU 3956685 A CA 1233692 A1 DE 3563506 D1 EP 0160794 A1 ES 8608294 A1 GB 2157538 A ,B HK 4989 A JP 60232073 A KR 9205996 B1 NZ 211228 A PH 21430 A ZA 8501457 A	15-07-1988 12-05-1988 24-10-1985 08-03-1988 04-08-1988 13-11-1985 01-12-1986 30-10-1985 27-01-1989 18-11-1985 25-07-1992 30-10-1987 15-10-1987 30-10-1985
US 3741775	A	26-06-1973	NONE	
US 3532514	A	06-10-1970	GB 1130631 A DE 1692794 A1 FR 1470924 A IT 1050403 B NL 6603250 A ,B SE 341316 B SE 362004 B US 3493395 A	16-10-1968 03-06-1971 24-02-1967 10-03-1981 12-09-1966 20-12-1971 26-11-1973 03-02-1970
US 3660114	A	02-05-1972	AT 290272 B BE 713352 A CH 497138 A DE 1767138 B1 ES 352535 A1 FR 1569864 A GB 1182976 A NL 6805127 A	25-05-1971 08-10-1968 15-10-1970 04-05-1972 16-07-1969 06-06-1969 04-03-1970 14-10-1968
GB 1082504	A	06-09-1967	AT 273636 B BE 670702 A CH 468157 A	25-08-1969 08-04-1966 15-02-1969

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

/CH2004/000504

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB 1082504	A		DE 1517100 A1	11-12-1969
			FR 1450072 A	06-05-1966
			IT 1008502 B	30-11-1976
			NL 6513067 A	12-04-1966
US 5723504	A	03-03-1998	PL 293464 A1	23-08-1993
			AT 187734 T	15-01-2000
			AU 3496693 A	03-09-1993
			BG 62172 B1	30-04-1999
			BG 98956 A	28-07-1995
			BR 9305878 A	19-08-1997
			CA 2130106 A1	14-08-1993
			CN 1075969 A	08-09-1993
			CZ 9401945 A3	15-12-1994
			DE 69327310 D1	20-01-2000
			DE 632813 T1	15-02-1996
			WO 9316087 A2	19-08-1993
			EP 0632813 A1	11-01-1995
			ES 2072244 T1	16-07-1995
			FI 943733 A	12-08-1994
			GR 95300017 T1	30-04-1995
			HU 70434 A2	30-10-1995
			JP 7506344 T	13-07-1995
			MX 9300759 A1	01-11-1993
			NO 942930 A	08-08-1994
			PL 171319 B1	30-04-1997
			RO 115633 B1	28-04-2000
			RU 2141337 C1	20-11-1999
			SG 52390 A1	28-09-1998
			SK 86994 A3	08-02-1995
GB 1285568	A	16-08-1972	BE 747962 A1	25-09-1970
			CH 570120 A5	15-12-1975
			DE 2014477 A1	28-01-1971
			ES 377811 A1	16-10-1972
			FR 2039923 A5	15-01-1971
			IT 1050422 B	10-03-1981
			NL 7004242 A	29-09-1970
EP 0320057	A	14-06-1989	ZA 7001973 A	24-11-1971
			AT 88063 T	15-04-1993
			CA 1339870 C	19-05-1998
			DE 3880278 D1	19-05-1993
			DE 3880278 T2	16-09-1993
			EP 0320057 A2	14-06-1989
			ES 2041304 T3	16-11-1993
			JP 1206968 A	21-08-1989
			US 5045335 A	03-09-1991

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 January 2009 (15.01.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/007424 A1

(51) International Patent Classification:
A23L 1/229 (2006.01) C12N 1/06 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

(74) Agents: MISSET, Onno et al.; DSM Intellectual Property,
Delft Office (600-0240), P.O. Box 1, NL-2600 MA Delft
(NL).

(21) International Application Number:
PCT/EP2008/059013

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(22) International Filing Date: 10 July 2008 (10.07.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07112167.7 10 July 2007 (10.07.2007) EP

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for all designated States except US): DSM IP
ASSETS B.V. [NL/NL]; Het Overloon 1, NL-6411 TE
Heerlen (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): NOORDAM,
Bertus [NL/NL]; Brederolaan 26, NL-2692 DA 's-graven-
zande (NL). KORTES, Jan, Gerrit [NL/NL]; van
Daatselaarhof 18, NL-3833 HV Leusden (NL).

Published:
— with international search report



WO 2009/007424 A1

(54) Title: YEAST AUTOLYSATES

(57) Abstract: The present invention relates to a yeast autolysate with taste enhancing properties which is high in solubilised solids and which comprises a dry solids ratio of at least 50%. The present invention also relates to a process for preparing the autolysates of the invention. The process comprises subjecting a yeast or yeast fraction to autolysis or hydrolysis, immediately followed by concentration of the total reaction mixture, to form a yeast autolysate. Yeast autolysates according to the invention may advantageously be used in a flavour provider, in a flavour enhancer, in meat applications, in a flavour improver or in a top note carrier. The autolysate of the present invention is particularly useful in feed or food applications which do not permit the use of yeast autolysates with high solid contents, such as in meat injectors.

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

YEAST AUTOLYSATES

5

Field of the invention

The present invention relates to yeast autolysates, to a process for producing yeast autolysates and to the use of yeast autolysates in food applications.

10

Background of the invention

"Autolyzed yeast" or "yeast autolysate" has been known for many years as a source of protein, peptides, amino acids, fats, minerals and B-vitamins. The Food Chemical Codex defines Autolysed Yeast as follows: *"Autolysed Yeast is the concentrated, not extracted, partially soluble digest obtained from food-grade yeasts. Solubilisation is accomplished by enzyme hydrolysis or autolysis of yeast cells. Autolysed Yeast contains both soluble and insoluble components derived from the whole yeast cell"*.

A "yeast autolysate" is not the same as a "yeast extract" as can be deduced from the same Food Chemical Codex which defines a "yeast extract" as follows: *"Yeast Extract comprises the water soluble components of the yeast cell, the composition of which is primarily amino-acids, peptides, carbohydrates and salts. Yeast Extract is produced through the hydrolysis of peptide bonds by the naturally occurring enzymes present in edible yeast or by the addition of food-grade enzymes"*.

The yeast autolysate therefore differs from the "yeast extract" because the yeast autolysate, in addition to all the interesting components present in yeast extracts, also contains interesting components like β -glucans, mannoproteins and the yeast lipid fraction, present in the yeast cell wall. Another major difference is that the yeast autolysate contains a lot of insoluble components whereas the yeast extracts only comprise the water-soluble components of the yeast cell. A yeast extract contains more than 95% soluble material and usually up to 100%. In the production process of the yeast extract, the insoluble are removed by a suitable solid liquid separation whereas in the production of the yeast autolysate this step is lacking. The entire autolysate is subjected to a concentrating/drying step.

The presence of the high amount of insolubles in the prior art yeast autolysates is a severe disadvantage and limitation for their use in the food and/or feed industry. The high amount of insoluble solid matter results in rapid sedimentation when suspended in water.

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

2

For instance, a commercially available yeast autolysate BioSpringer BS2000 was found to contain approximately 60% insolubles (based on dry weight) which directly sediment when suspended in water.

5 The high amount of insolubles make the yeast autolysates unsuitable for modern applications such as the injection of flavour in for instance meat. In addition, their flavour profile is rather limited. On top of that, the low amount of solubilized protein, peptides and amino acids in classic yeast autolysates makes them less attractive for savoury food applications where the final flavour profile is amongst others dependent on for instance Maillard reactions (reactions in which the soluble fraction is involved).

10 Another disadvantage of prior art yeast autolysates is the almost complete absence or at least very low levels of 5'-GMP and 5'-IMP. This makes the prior art yeast autolysates unsuitable for applications where taste enhancement is desired. No commercially available yeast autolysate has been found which contains more than 1.5 wt% [5'-GMP + 5'-IMP] based on sodium chloride free dry matter (and wherein 5'-GMP and 5'-IMP are expressed as their
15 2Na.7H₂O salts).

It is an object of the present invention to solve the problem associated with the prior art yeast autolysates and to provide yeast autolysates with a higher amount of solubles as well as a process for their production.

20 **Detailed description of the invention**

Definitions

- Food Chemical Codex: Autolysed Yeast is the concentrated, not extracted, partially soluble digest obtained from food-grade yeasts. Solubilisation is accomplished by
25 enzyme hydrolysis or autolysis of yeast cells. Autolysed Yeast contains both soluble and insoluble components derived from the whole yeast cell.
- Food Chemical Codex: Yeast Extract comprises the water soluble components of the yeast cell, the composition of which is primarily amino-acids, peptides, carbohydrates and salts. Yeast Extract is produced through the hydrolysis of peptide bonds by the naturally
30 occurring enzymes present in edible yeast or by the addition of food-grade enzymes.
- The "dry solids ratio" is defined herein as the ratio between solubilised solids and total solids of the yeast autolysate. The dry solids ratio is determined as follows: 5 grams of yeast autolysate is added to 100 grams of boiling water in a 200 ml glass beaker. The pH is approximately 6. The resulting suspension is stirred for 20 minutes with no extra
35 heating. The experiment is carried out at room temperature and therefore the

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

3

temperature of the suspension will slowly decrease. After 20 minutes and when the suspension has reached a temperature of between 20 and 70°C, 5 mL of the suspension is filtered over a 0.45 µm filter (0.45 µm GD/X PVDF syringe filter, 25 mm diameter, Whatman), and the permeate is collected. The dry solids in the permeate and the dry solids in the initial suspension are determined using a dry solids balance. Approximately 2 grams of the suspension is applied onto a filter paper, which is then applied to a Smart System⁵ Moisture / Solids Analyzer Infra Red reader (CEM Matthews). The dry solids ratio is calculated as follows:

$$\text{Dry solids ratio} = \frac{\text{dry solids in the permeate (g)}}{\text{dry solids in the initial suspension (g)}} \times 100\%$$

10

- Yeast is defined herein as a solid, paste or liquid comprising yeast cells such as a fermentation broth used for the production of yeast or a cream yeast as used in the baking industry and which is a concentrated and washed suspension of yeast cells and which may have a yeast dry matter between 20-25% or even higher, or an active or instant dried yeast or any other form of product which comprises yeast cells.

15

In a first aspect the present invention provides a yeast autolysate having a dry solids ratio as defined hereinbefore of $\geq 50\%$ and $\leq 95\%$. More preferably, the yeast autolysate has a dry solids ratio of $\geq 55\%$, more preferably $\geq 60\%$, more preferably $\geq 65\%$, more preferably $\geq 70\%$, more preferably $\geq 75\%$, more preferably $\geq 80\%$, more preferably ≥ 85 and $\leq 95\%$ based on sodium chloride free dry matter of the yeast autolysate. Preferably, the yeast autolysate has a dry solids ratio of $\leq 90\%$. For a yeast autolysate containing sodium chloride, the value of the corresponding dry solid ratios will be higher due to the high solubility of sodium chloride. For instance, when a yeast autolysate without sodium chloride with a dry solids ratio of 50% is formulated with sodium chloride to a final sodium chloride concentration of 40 wt% (i.e. 60% yeast material), the resulting formulated yeast autolysate will have a dry solids ratio of 40 (NaCl) + 50% of 60% (yeast material) = 70%.

20

25

In a preferred embodiment, the yeast autolysate of the invention further comprises 5'-ribonucleotides. In the context of the present invention, "5'-ribonucleotides" refers to the total amount of 5'-monophosphate ribonucleotides formed during RNA degradation: 5'-

30

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

4

monophosphate guanine (5'-GMP), 5'-monophosphate uracil (5'-UMP), 5'-monophosphate cytosine (5'-CMP), 5'-monophosphate adenine (5'-AMP), where 5'-AMP may be partially or completely converted into 5'-monophosphate inosine (5'-IMP). Preferably, the yeast autolysate of the invention comprises at least 0.75% w/w 5'-GMP on sodium chloride free dry matter, more preferably at least 1% w/w 5'-GMP, more preferably at least 1.5% w/w 5'-GMP more preferably at least 2% w/w and most preferably, the yeast autolysate of the invention comprises at least 2.5% w/w 5'-GMP on sodium chloride free dry matter. Weight percentage calculations of the 5'-ribonucleotides are based on the disodium salt heptahydrate thereof unless otherwise specified. All percentages are calculated on sodium chloride free dry matter. In the present invention, the phrase "sodium chloride free dry matter" refers to the fact that for the calculation of the weight percentage the weight of any sodium chloride present is excluded from the yeast autolysate of the invention. The measurement of sodium chloride in the composition and the above-mentioned calculation can be performed by methods known to those skilled in the art.

Due to the constitution of RNA, 5'-UMP, 5'-CMP and 5'-AMP will also be present, but these nucleotides do not contribute significantly to taste or flavour enhancement. When 5'-AMP is transformed into 5'-IMP, typically by adenylic deaminase, the autolysate will comprises 5'-IMP, which contributes to flavour enhancement. Therefore, yeast autolysates containing 5'-IMP are also encompassed by the present invention. Preferably, the yeast autolysate of the invention comprises at least 0.75% w/w 5'-IMP on sodium chloride free dry matter, more preferably at least 1% w/w 5'-IMP, more preferably at least 1.5% w/w 5'-IMP, more preferably at least 2% w/w 5'-IMP and most preferably, the yeast autolysate of the invention comprises at least 2.5% w/w 5'-IMP on sodium chloride free dry matter. It will be understood by the skilled person, that it is highly preferred that the yeast autolysate of the invention comprises both 5'-GMP and 5'-IMP in the concentrations given above.

The yeast autolysate of the invention may further comprise salt, preferably sodium chloride. Preferably, the yeast autolysate of the invention comprises $\geq 5\%$ and $\leq 50\%$ w/w sodium chloride. More preferably, the yeast autolysate of the invention comprises at least 10%, more preferably at least 20%, more preferably at least 30%, more preferably between 35 and 45%, most preferably 40% - all w/w. Preferably, the yeast autolysate of the invention comprises $\leq 50\%$ sodium chloride (w/w).

The yeast autolysate according to the present invention has as a major advantage in comparison with the prior art yeast autolysates that a greater fraction of the cell yeast constituents is solubilised. As a result thereof, a larger fraction of the cell constituents can contribute to flavour formation or enhancement in subsequent food applications. In fact, the

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

5

functionality of the cell's constituents is utilised more efficiently. This is also reflected in the wider flavour profile which may be achieved with the autolysates according to the invention. A yeast autolysate of the present invention may therefore suitably be used in or as a carrier of top notes, in or as an ingredient for reaction flavour generation or in or as a flavour enhancer. The degree of solubilisation is so high that the autolysate of the present invention may advantageously be used in feed or food applications which require solubility higher than those of classic yeast autolysates. For example, the yeast autolysate of the present invention may suitably be used for meat injection, because it will not clog the injector. Solubilisation is reflected by the dry solids ratio in that a higher dry solids ratio results in a higher solubility.

10 The higher the dry solids ratio, the higher the degree of solubilisation and the more peptides, amino acids and other compounds are available for participating in flavour generating reactions.

The yeast autolysate of the present invention differs from a yeast extract because it also contains valuable cell wall constituents, like beta-glucans, mannoproteins and the yeast lipid fraction. Beta glucans are known to have a positive effect on the immune response, while mannoproteins may contribute to Maillard reactions (and hence to flavour and taste). Similarly, lipids also positively influence the taste and/or flavour profile.

15

In a second aspect the invention provides a process for preparing the yeast autolysate of the invention having a dry solids ratio of $\geq 50\%$ and $\leq 95\%$, more preferably having a dry solids ratio of $\geq 55\%$, more preferably $\geq 60\%$, more preferably $\geq 65\%$, more preferably $\geq 70\%$, more preferably $\geq 75\%$, more preferably $\geq 80\%$, more preferably ≥ 85 and $\leq 95\%$ based on sodium chloride free dry matter of the yeast autolysate, preferably $\leq 90\%$ comprising:

20

a. subjecting yeast – as defined hereinbefore - to autolysis or hydrolysis at pH 4-7 and at a temperature in the range of 30-70°C in the presence of a protease; and

25 b. concentrating the complete reaction mixture to yield the yeast autolysate,

with the proviso that the process does not comprise a solid liquid separation step in order to for instance separate insoluble cell walls from soluble cell components. The concentrated reaction mixture obtained after step b) is preferably dried by techniques known in the art.

30 In order to make the yeast autolysate of the invention comprising salt, preferably sodium chloride, the latter may be added during any step of the process but preferably before the drying step. For instance part of the salt may be added during step a) and the remainder before or after step b), or all may be added in step a) or before or after step b). The salt may be added as a solid, or in the form of a salt solution. The amount of salt to be

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

6

added will depend on the required salt content of the yeast autolysate and may easily be determined by the skilled person.

In the process of the invention, the yeast which is subjected to autolysis or hydrolysis is preferably cream yeast as defined hereinbefore. In another embodiment of the invention, the yeast which is subjected to autolysis or hydrolysis is a yeast fermentation broth. The advantage of using the yeast fermentation broth as a starting material for the autolysis or hydrolysis instead of using cream yeast is an increased yield and a reduced cost price of the yeast autolysate since the intermediate concentrating and washing steps to obtain cream yeast can be omitted. Different starting materials will lead to yeast autolysates with a different taste profile.

The yeast may be any type of food-grade yeast, for example baker's yeast, beer yeast or wine yeast. Preferably, a yeast strain belonging to the genera *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* or *Torula* is used. In a preferred embodiment a yeast strain belonging to the genus *Saccharomyces*, i.e. *Saccharomyces cerevisiae*, is used.

In one preferred embodiment, the yeast autolysate of the present invention is obtained by autolysis of yeast. In the context of the present invention, autolysis of yeast refers to a process well-known and described in the art, see e.g. Savory flavors, Tilak W. Nagodawithana, Esteekey Associates inc. 1995. Autolysis is the degradation of the yeast by its own endogenous enzymes after the yeast's cell wall has been damaged or disrupted. Damage or disruption of the cell wall may be effected by any suitable means, for example mechanically, chemically or enzymatically. A typical autolysate is rich in peptides and amino acids as compared to the total protein pool.

The process may be accelerated by the addition of exogenous enzymes. In one embodiment of the invention, autolysis is accelerated by the addition of one or more proteases, peptidases and/or glucanases.

In another preferred embodiment, the yeast autolysate of the present invention is obtained by hydrolysis of yeast. In the context of the present invention, hydrolysis of yeast refers to the process which is generally described as controlled lysis of the yeast cell. After inactivation of the yeast's endogenous enzymes, yeast degradation is performed by exogenously added enzymes. In one embodiment, one or more proteases, peptidases and/or glucanases are added to hydrolyse the yeast.

The protease or peptidase used for preparing the yeast autolysate may be of vegetable, bacterial or fungal origin and may be of distinct specificity, for example proline, cysteine, serine, glutamine or leucine specific. Suitable examples are included in EC 3.4.X and subclasses. Preferably, the protease is an endoprotease. More preferably the protease

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

7

is a bacterial or a fungal endoprotease. The glucanase which may be used for preparing the yeast autolysate may also be of vegetable, bacterial or fungal origin, in particular those belonging to the class EC 3.2.1.6 enzymes.

5 In one embodiment, the yeast autolysate of the present invention is obtained using a combination of one or more proteases and/or peptidases and/or glucanases. In a preferred embodiment, an endoprotease and a glucanase are present to produce a yeast autolysate by autolysis or hydrolysis. The enzymes of the combination may be added simultaneously or consecutively. They may be added in one portion or in several portions. In another embodiment, the enzymatic treatment is combined with mechanical treatment.

10 The amount of enzyme to be added will depend on several factors, such as on the enzyme(s) which is (are) used and whether or not a combination with other treatments, such as mechanical treatment is applied. Typically, the one or more proteases, peptidases or glucanases are used in concentrations where the enzymes are in excess, which can easily be determined by the person skilled in the art. For economical reasons, the lowest amount of
15 excess may be used.

The prior art processes producing the prior art yeast autolysates with low dry solids ratios (i.e. below 50%) are, for cost reasons, carried out in the shortest time course as possible, using the smallest amount of enzyme possible. A high dry solids ratio is not appreciated as a valuable property of the yeast autolysate. The yeast autolysates of
20 the present invention may be obtained by the process of the invention. The difference between the process of the invention and the prior art processes resides in a higher degree of autolysis or hydrolysis of the yeast cell material. These higher degrees of autolysis or hydrolysis may be obtained by using more protease and/or by incubating for a longer time and/or at a higher temperature. Of course, the temperature should not be so high that it will
25 damage the enzyme(s) used. The protease amounts required and optimal conditions in order to obtain the yeast autolysates of the present invention will be dependent on the combination of the type and the amount of enzyme used, the digestion time and the temperature. With routine optimisation, the skilled person can without undue burden determine the optimal conditions to obtain a dry solids ratio of at least 50% using a given enzyme and a given
30 enzyme concentration. Alternatively, at a given temperature and/or maximum time of digestion, the skilled person can readily determine the amount of enzyme to be added in order to obtain the yeast autolysate of the invention. Suitable incubation times for step a) of the process of the invention may be from 1-50 hrs, preferably 2-40 hrs, more preferably 3-30 hrs, most preferably 5-20 hrs. A suitable pH for step a) of the process of the invention is a pH
35 between 4 and 7, more preferably between 5 and 6, most preferably between 5.5 and 6.0. A

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

8

suitable temperature for step a) of the process of the invention is between 30 and 70°C, more preferably between 40 and 60°C, most preferably between 45 and 55°C, e.g. 50°C.

In one embodiment of the process of the invention, prior to step b), the reaction mixture obtained in step a) is subjected to further enzymatic treatment to produce 5'-ribonucleotides and optionally an enzymatic treatment to convert 5'-AMP into 5'-IMP. In one embodiment, a 5'-ribonucleotide containing yeast autolysate is prepared by a process which comprises incubation with phosphodiesterase according to methods known in the art, preferably at a pH in the range of 4.8-5.5 and preferably at a temperature in the range of 55-68°C. Controlled hydrolysis allows for the production of yeast autolysates which contain 5'-ribonucleotides.

The yeast autolysate may be concentrated by methods known in the art, such as by reverse osmosis, ultrafiltration or evaporation. In a preferred embodiment, the yeast autolysate is concentrated by evaporation. After concentration, the yeast autolysate may be dried and formulated. In a preferred embodiment, the yeast autolysate is concentrated by evaporation and spray dried.

Using the process of the invention, yeast autolysates may be obtained with improved performance with regard to injectability, taste enhancement and flavour profile. Novel flavour profiles may be obtained depending on the yeast fraction which is used and depending on whether the yeast fraction has been subjected to autolysis or hydrolysis. Depending on the lysis method used, the yeast autolysate may comprise 5'-ribonucleotides in addition to the cell wall or cell wall components, proteins, peptides, amino acids, minerals, carbohydrates, B-vitamins.

In a third aspect, the present invention relates to the use of a yeast autolysate according to the invention in the feed, in particular the pet-food industry, or food industry, in particular the meat and meat processing industry. The products of the invention may be used as or in a flavour provider, e.g. in process flavour reactions, as or in a flavour enhancer, as or in a flavour improver, as or in a top note carrier. In one embodiment, the yeast autolysate is used in or as a tabletop application. A flavour enhancer, a flavour improver, a top-note carrier or a table-top application which comprises a yeast autolysate according to the invention is also encompassed in the present invention. The flavour enhancer, flavour improver, top-note carrier or table-top application may comprise 0.1-30% w/w of the autolysate of the present invention.

EXAMPLES

35

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

9

Example 1**Generation of a yeast autolysate from cream yeast by autolysis**

5 One liter of cream yeast of *Saccharomyces cerevisiae* was heated to 50°C. Subsequently, 2 ml Alcalase® (Sigma Aldrich, containing protease from *Bacillus licheniformis*) was added and the mixture was incubated for 20 hours without pH adjustment. Solid sodium chloride was added so as to give a yeast autolysate with 40 wt% salt. Finally, the salt containing reaction mixture was concentrated by evaporation and spray-dried.

10 The resulting powder was analyzed for its composition and the results are presented in Table 1. The results demonstrate the very high amount of solubilised solids in the yeast autolysate. Sedimentation tests have demonstrated that it takes about 24 hours before sedimentation starts, while this only takes seconds to minutes in prior art yeast autolysates

15 Table 1 - Composition of the yeast autolysate of Example 1

Component	%
dry solids ratio *	86
dry solids ratio * ¹	76
Nitrogen (Kjeldahl) ¹	10.4
Protein (N * 6.25) ¹	65.0
Amino nitrogen ¹	3.6
Amino nitrogen/total nitrogen (AN/TN)	34.8
Ash ¹	6.0
Solids (cell walls) ¹	30.0
Free amino acids /total amino acids	37.1
Glutamic acid ¹	4.0

* Based on filterability of a 5% suspension over a 0.45 µm filter. ¹ on NaCl free dry matter

Example 2

20 **Generation of a yeast autolysate from cream yeast by hydrolysis**

One liter of cream yeast of *Saccharomyces cerevisiae* was heated at 95°C for 5 minutes and subsequently cooled down to 50°C. Next, 2 ml Alcalase® (Sigma Aldrich, containing protease from *Bacillus licheniformis*) was added and the mixture was incubated
25 for 6 hours without pH adjustment. After this incubation, the mixture was treated with 5' phosphodiesterase for 15 hours at pH 5.3 and 65 °C to hydrolyse the RNA. After this, the mixture was treated with deaminase (Amano) for 5 hours at pH 5.1 and 55°C to convert the 5'-AMP into 5'-IMP. Solid sodium chloride was added so as to give a yeast autolysate with 40

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

10

wt% salt. Finally, the salt containing reaction mixture was concentrated by evaporation and spray-dried.

The resulting powder was analyzed for its composition and the results are presented in Table 2 which shows the very high amount of solubilised solids present in the yeast autolysate. The results in Table 2 also demonstrate the presence of more than 1.5% w/w 5' GMP and 5'IMP on the basis of NaCl free dry matter, which have never been reported before for yeast autolysates made by hydrolysis.

Table 2 - Composition of the yeast autolysate of Example 2

Component	%
Dry solids ratio*	80
Dry solids ratio [†]	67
Nitrogen (Kjeldahl) [†]	10.2
Protein (N * 6.25) [†]	63.8
Amino nitrogen [†]	3.5
Amino nitrogen/total nitrogen (AN/TN)	34.3
Ash [†]	5.9
Solids (cell walls) [†]	32.1
Free amino acids/total amino acids	17.3
5'-GMP [†]	2.6
5'-IMP [†]	3.0
Glutamic acid [†]	2.1

* Based on filterability of a 5% suspension over a 0.45 µm filter. [†] on NaCl free dry matter

Example 3

15 Generation of a yeast autolysate by autolysis of a fermentation broth

One liter of fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* was heated to 50°C. Subsequently, 1 ml Alcalase® (Sigma Aldrich, containing protease from *Bacillus licheniformis*) was added and the mixture was incubated for 20 hours without pH adjustment. Solid sodium chloride was added so as to give a yeast autolysate with 40 wt% salt. Finally, the salt containing reaction mixture was concentrated by evaporation and spray-dried.

The resulting powder was analysed for its composition and the results are presented in Table 3 and demonstrate the very high amount of solubilised solids in the yeast autolysate according to the invention (dry solids ratio 85%).

25

Table 3 Composition of the yeast autolysate of Example 3

Component	%
Dry solids ratio*	85
Dry solids ratio [†]	75

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

11

Nitrogen (Kjeldahl) ¹	7.2
Protein (N * 6.25) ¹	45.0
Amino nitrogen ¹	2.4
Amino nitrogen/total nitrogen (AN/TN)	34.1
Ash ¹	21.5
Solids (cell walls) ¹	29.7
Free amino acids/total amino acids	37.4
Glutamic acid ¹	2.2
Betaine ¹	6.9

* Based on filterability of a 5% suspension over a 0.45 µm filter. ¹ on NaCl free dry matter

Example 4

5

Comparison of dry solids ratios

The dry solids ratios of autolysates according to the invention were compared with the dry solids ratio of a commercial sample. Therefore 5 grams of each autolysate powder was suspended in boiling water and the total weight was made up to 100 g with water. Next, the different suspensions were filtered over a 0.45 µm filter. The dry solids ratio is a measure for the amounts of dissolved solids in the autolysate. The results are presented in Table 4.

10

Table 4 - Comparison of the solubility of different autolysates

Yeast autolysate	Dry solids level in		Dry solids ratio	
	suspension (%)	permeate (%)	autolysate as such (%)	Based on NaCl-free dry matter (%)
BioSpringer 2000	5.04	2.03	40	40
Autolysate from Example 1	4.66	4.00	86	76
Autolysate from Example 2	4.82	3.86	80	67
Autolysate from Example 3	4.79	4.07	85	75

15

The results presented in Table 4 clearly demonstrate that the commercial yeast autolysate has lower levels of solubilised solids than the yeast autolysates according to the invention.

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

12

Example 5

Flavour profile of the new yeast autolysates

5

The autolysates from Examples 1, 2 and 3 were tested by a test panel. The results are presented in Table 5 and show that the flavour and taste of the autolysates prepared by the method of the invention varies depending on the starting material and the lysis method which is used. Flavour profiles ranges from yeasty to meaty and liquorice.

10

	Taste	Smell
Autolysate example 1	Yeasty, bouillon, slightly sulphuric	Sulphuric, yeasty
Autolysate example 2	Sweet, full, slightly bouillon	Slightly yeasty
Autolysate example 3	Meaty, yeasty, liquorice, sweet	Sweet, bouillon

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

13

CLAIMS

- 5 1. Yeast autolysate having a dry solids ratio of $\geq 50\%$ and $\leq 95\%$ based on sodium chloride free dry matter of the yeast autolysate.
2. Yeast autolysate according to claim 1 comprising at least 0.75% w/w 5'-GMP on sodium chloride free dry matter of the yeast autolysate.
- 10 3. Yeast autolysate according to claim 1 or 2 which comprises at least 0.75% w/w 5'-IMP on sodium chloride free dry matter of the yeast autolysate.
4. Yeast autolysate according to any of the preceding claims further comprising salt, preferably sodium chloride.
- 15 5. A process for preparing the yeast autolysate as defined in any of claims 1-4 having a dry solids ratio of $\geq 50\%$ and $\leq 95\%$ comprising:
 - a. subjecting yeast to autolysis or hydrolysis at pH 4-7 and at a temperature in the range of $30-70^{\circ}\text{C}$ in the presence of a protease; and
 - 20 b. concentrating the complete reaction mixture to yield the yeast autolysate with the proviso that the process does not comprise a solid liquid separation step.
6. The process according to claim 5 further comprising the step of drying the concentrated reaction mixture obtained in step b).
- 25 7. The process according to any of claims 5-6 further comprising adding salt, preferably sodium chloride.
8. Process according to any of claims 5-7, wherein the yeast is cream yeast or a
- 30 fermentation broth.
9. Process according to anyone of claims 5-8, wherein the yeast is a species from the genera *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* or *Torula*, preferably the genus *Saccharomyces*, more preferably *Saccharomyces cerevisiae*

35

WO 2009/007424

PCT/EP2008/059013

14

10. Process according to any of claims 5-9 where the yeast is subjected to autolysis and the protease is an endogenous protease of the yeast
- 5 11. Process according to claim 10 comprising the addition of one or more proteases, peptidases and/or glucanases.
12. Process according to any of claims 5-9 where the yeast is subjected to hydrolysis and the protease is added after inactivation of the yeast endogenous enzymes.
- 10 13. Process according to claim 12 further comprising the addition of one or more proteases, peptidases and/or glucanases.
- 15 14. Process according to claim 10, wherein the further treatment comprises further enzymatic treatment to produce 5'-ribonucleotides and optionally a further enzymatic treatment to convert 5'-AMP into 5'-IMP.
- 20 15. Use of a product obtained by a process according to anyone of claims 4-15 or a yeast autolysate according to anyone of claims 1-3 in a process flavour reaction, in meat applications, as or in a flavour enhancer, as or in a flavour improver, as or in a top note carrier or as or in a table-top application.
16. A flavour enhancer, a meat product, a flavour improver, a top-note carrier or a table-top application which comprises a yeast autolysate according to anyone of claims 1-4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/059013A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23L1/229 A23L1/30 C12N1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, FSTA, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 497 635 A (BIOPROX PRODUITS BIOCHIMIQUES [FR]) 16 July 1982 (1982-07-16) claims 1,2; examples 2,4	1-16
X	EP 0 299 078 A (KOHJIN CO [JP]) 18 January 1989 (1989-01-18) page 2, line 10 - line 11; example 3	1-16
A	GB 1 561 202 A (STAUFFER CHEMICAL CO) 13 February 1980 (1980-02-13) page 1, line 20 page 4, line 40 - line 54 -/-	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2008

Date of mailing of the international search report

31/10/2008

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Merk1, Bernhard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/059013

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JIAN ZHAO ET AL: "Degradation of RNA during the autolysis of Saccharomyces cerevisiae produces predominantly ribonucleotides" JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY ; OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, SPRINGER-VERLAG, BE, vol. 32, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 415-423, XP019357760 ISSN: 1476-5535 the whole document	1-16.

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/059013

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2497635	A	16-07-1982	WO 8202323 A1	22-07-1982
EP 0299078	A	18-01-1989	AU 611128 B2	06-06-1991
			AU 1184988 A	10-08-1988
			CA 1320462 C	20-07-1993
			WO 8805267 A1	28-07-1988
GB 1561202	A	13-02-1980	AU 513914 B2	15-01-1981
			AU 2534277 A	23-11-1978
			BE 855442 A2	07-12-1977
			CA 1099583 A1	21-04-1981
			DE 2725094 A1	22-12-1977
			FR 2354057 A1	06-01-1978
			NL 7706214 A	12-12-1977
			NO 771991 A	09-12-1977
			SE 7706605 A	09-12-1977

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 June 2012 (07.06.2012)



(10) International Publication Number
WO 2012/075088 A1

(51) International Patent Classification:
A23L 1/31 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/062549

(22) International Filing Date:
30 November 2011 (30.11.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/418,686 1 December 2010 (01.12.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **CARGILL, INCORPORATED** [US/US]; 15407 McGinty Road West, Mail Stop 24, Wayzata, Minnesota 55391 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BRACKENRIDGE, Ann Wayton** [US/US]; 590 NWTawakoni Road, Benton, Kansas 67017 (US). **KATEN, Thomas Richard** [US/US]; 3875 Willshire Eastern Road, Willshire, Ohio 45898 (US). **KLEMASZEWSKI, Joseph L.** [US/US]; 14305 21st Avenue North, #107, Plymouth, Minnesota 55447 (US). **MOSS, Donald Andrew** [US/US]; 1425 E Cedar Tree, Park City, Kansas 67219 (US).

(74) Agents: **PIERING, Scott et al.**; 15407 McGinty Road West, Mail Stop 24, Wayzata, Minnesota 55391 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))



WO 2012/075088 A1

(54) Title: MEAT SUBSTITUTE PRODUCT

(57) Abstract: A meat substitute product is disclosed. A meat substitute, such as vegetable protein, is blended with a starch, hydrocolloid, and an oil from a vegetable source.

WO 2012/075088

PCT/US2011/062549

N00114USP1

MEAT SUBSTITUTE PRODUCT

FIELD

[0001] The present disclosure relates generally to a meat substitute product. Aspects of the disclosure are particularly directed to a meat substitute product consisting of a meat substitute, starch(es), hydrocolloid(s), and oil(s) from a vegetable source(s).

BACKGROUND

[0002] Many people are choosing to limit the amount of meat in their diet. Specifically, people are looking to reduce the amount of animal fat in their diets. Animal fat is a primary source of saturated fat, which raises blood cholesterol.

[0003] Despite the desire to limit meat in the diet, people nonetheless want to eat products that were traditionally meat-based products, such as burgers. Non-meat burgers can be made, for example, from vegetables, legumes, nut, dairy products, mushrooms, grain or textured vegetable protein.

[0004] Fat in a non-meat burger, and other meat substitutes, plays a vital role in a variety of sensory attributes, including juiciness, mouth feel and flavor. When a meat substitute product has lower amounts of fat, there is a tendency for the cooked product to be less desirable in regards to juiciness, mouth feel and flavor. On the contrary, when a meat substitute product has an optimal amount of fat, it is more desirable in terms of juiciness, mouth feel and flavor.

[0005] Meat substitute products also are an appropriate system for the application of functional fats. A functional food ingredient is defined as an ingredient or food that provides potential health benefits beyond basic nutrition. These functional components can be naturally occurring or may be added to certain foods. Such ingredients include but are not limited to Omega-3 fatty acids, antioxidants, phytosterols and dietary fibers. The functional fat system would serve as a delivery medium to deliver functional ingredients into processed meat products.

SUMMARY

[0006] This invention allows for the production of a meat substitute product without sacrificing sensory attributes. There is a nutritional/sensory interaction which allows for the

WO 2012/075088

PCT/US2011/062549

N00114USP1

addition of a modifying agent to textured soy protein meat substitute which increases the sensory attributes of the product.

[0007] One embodiment of this invention is directed toward a meat substitute composition comprising a meat substitute, a starch, a gum and an oil from a non-animal source.

DETAILED DESCRIPTION

[0008] The present invention will now be described in more detail.

[0009] The meat composition of the present invention comprises (A) meat substitute, (B) starch(es), (C) hydrocolloid(s), and (D) oil(s) from a vegetable source(s).

[0010] Component A: Meat Substitute. The meat substitute composition can be vegetables, legumes, nuts, dairy products, eggs, mushrooms, grains or vegetable protein.

[0011] Component B: Starch. Starch is a carbohydrate polymer. Starches are comprised of amylose and amylopectin and are typically in the form of granules. Amylopectin is the major component (about 70-80%) of most starches. It is found in the outer portion of starch granules and is a branched polymer of several thousand to several hundred thousand glucose units. Amylose is the minor component (about 20-30%) of most starches (there are high amylose starches with 50 to 70% amylose). It is found in the inner portion of starch granules and is a linear glucose polymer of several hundred to several thousand glucose units.

[0012] Sources of starch include but are not limited to fruits, seeds, and rhizomes or tubers of plants. Common sources of starch include but are not limited to rice, wheat, corn, potatoes, tapioca, arrowroot, buckwheat, banana, barley, cassava, kudzu, oca, sago, sorghum, sweet potatoes, taro and yams. Edible beans, such as favas, lentils and peas, are also rich in starch.

[0013] Some starches are classified as waxy starches. A waxy starch contains high amounts of amylopectin with very little amylose. Common waxy starches include waxy maize starch, waxy rice starch, and waxy wheat starch.

[0014] A modified starch is one that has been altered from its native state, resulting in modification of one or more of its chemical or physical properties. Starches may be modified, for example, by enzymes, oxidation or, substitution with various compounds. Starches can be modified to increase stability against heat, acids, or freezing, improved texture, increase or decrease viscosity, increase or decrease gelatinization times, and increase or decrease solubility,

WO 2012/075088

PCT/US2011/062549

N00114USP1

among others. Modified starches may be partially or completely degraded into shorter chains or glucose molecules. Amylopectin may be debranched. Starches that are modified by substitution have a different chemical composition. A nOSA starch is a modified starch that has been partially substituted with n-octenyl succinic anhydride.

[0015] Component C: Hydrocolloid. Hydrocolloids are a family of long chain water soluble polysaccharides and are generally carbohydrate based which affect the viscosity/gelling of aqueous solutions. Common examples are locust bean gum, carrageenan (seaweed extract), guar gum, xanthan gum, gellan gum, scleroglucan, agar, pectin, alginate, cellulose derivatives, and gum acacia. These are broadly classified as gums. Starches and gelatin are sometimes characterized as hydrocolloids. One skilled in the art can use combinations of starches, gelatin, and gums to achieve desired texture and melt properties.

[0016] Component D: Oil from vegetable source(s): A lipid material composed of a mixture of generally triacylglycerides from non-animal sources such as soya, olive, rapeseed, avocado, palm, palm kernel, coconut, cocoa, peanut, corn, flax, sunflower, safflower, and cottonseed. These lipids may be solid or liquid at room temperature depending on the chain lengths of the fatty acids, degree of saturation, and method of hydrogenation. Oils from multiple sources may be combined or certain fractions removed by processing such as winterization.

[0017] One significant benefit of this invention is to replace the animal oils with oils that have a dietary functional use.

EXAMPLES

[0018] Various products have been manufactured. Each comprises a fat mimetic and a meat substitute. The examples below are merely illustrative and not limiting.

Vegan Fat Mimetic

Ingredient	Percentage
Water	40-60%
Vegetable Shortening	15-35%
Acid Thinned Starch	7-15%
Acid thinned nOSA starch, (EmCap™ 06375)	5-12%
Viscosifying nOSA starch, (DeliTex™ 75320)	3-8%

WO 2012/075088

PCT/US2011/062549

N00114USP1

Kappa Carrageenan, (Satiagel™ ME4)	1-3%
Salt	0-4%
Guar gum/xanthan gum	0-3%

[0019] All ingredients are compiled and then heated with agitation to 165 to 170°F using a Blentech model CC-10 at low speed. Direct steam injection is quickest method, but other methods are possible. Product is hot filled and cooled. After refrigeration for a minimum of 24 hours the product can be ground, diced, grated, or shredded to desired size.

Veggy Burger

Ingredient	Percentage
Water	45.6%
Textured soy flour	20.0%
Vegan fat mimetic	20.0%
Flavors, seasonings, salt, and colors	5.4%
Soy Flour	3.0%
Methylcellulose	2.0%
Autolyzed yeast extract	2.0%
Modified wheat gluten	2.0%

[0020] Add dry textured soy flour to mixer with 2/3 water and mix for five minutes. Add wheat gluten, fat mimetic, soy flour and methylcellulose to mixer and start mixing. Add remaining 1/3 water and mix for ten minutes until tacky. Add remaining dry ingredients and mix for five to ten minutes. Form patties and cook to internal of 165°F.

WO 2012/075088

PCT/US2011/062549

N00114USP1

CLAIMS

We claim:

1. A meat substitute composition comprising:
Meat substitute,
0.5-10% by weight of starch,
0.02-2% by weight of hydrocolloid, and
0.5-10% by weight of vegetable oil.
2. The meat substitute composition of claim 1 where the meat substitute is selected from the group consisting of one or more of vegetables, legumes, nuts, dairy products, eggs, mushrooms, grains and vegetable proteins.
3. The meat substitute composition of claim 2 where the vegetable protein is textured soy flour.
4. The meat substitute composition of claim 1 where the starch is selected from the group consisting of modified corn starches, modified tapioca starches, modified potato starches, modified rice starches, modified wheat starches, and modified sago starches.
5. The meat substitute composition of claim 1 where the hydrocolloid is selected from the group consisting of one or more of locust bean gum, carrageenan (seaweed extract), guar gum, xanthan gum, gellan gum, scleroglucan, agar, pectin, alginate, cellulose derivatives, gum acacia, and gelatin.
6. The meat substitute composition of claim 1 where the vegetable oil is selected from the group consisting of one or more of soya, olive, canola, avocado, palm, palm kernel, coconut, cocoa, peanut, corn, flax, sunflower, safflower, and cottonseed.
7. The meat substitute composition of claim 1 where the amount of meat substitute is not less than 5% by weight.

WO 2012/075088

PCT/US2011/062549

N00114USP1

8. The meat substitute composition of claim 1 where the amount of meat substitute is not less than 10% by weight.
9. The meat substitute composition of claim 1 where the concentration of starch is between 0.5% and 7.0% by weight.
10. The meat substitute composition of claim 1 where the concentration of starch is between 0.5% and 5.0% by weight.
11. The meat substitute composition of claim 1 where the concentration of hydrocolloid is between 0.05% and 1.0% by weight.
12. The meat substitute composition of claim 1 where the concentration of gum is between 0.1% and 0.5% by weight.
13. The meat substitute composition of claim 1 where the concentration of vegetable oil is between 1% and 7% by weight.
14. The meat substitute composition of claim 1 where the concentration of vegetable oil is between 1% and 5% by weight.
15. The meat substitute composition of claim 1 where the product is a form of loafs, chubs, patties, crumbles, or links.
16. The meat substitute composition of claim 1 where the product has been extruded.
17. The meat substitute composition of claim 1 where the product is in the form of a patty.
18. The meat substitute product of claim 1 where the product has been cooked and is in the form of crumbles, links, patties, or roasts.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/62549A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A23L 1/31 (2012.01)
USPC - 426/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC - 426/574, 426/641, 426/513, 426/246

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST -- PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB; Dialog Classic Files -- 654, 652, 349, 348, 35, 65, 155; USPTO Web Page; Google Scholar; Search terms -- meat substitute, patty, textured soy flour, hydrocolloid, vegetable oil, modified starch, cornstarch, carrageenan, locust bean gum, soybean oil, extrusion, cooking

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0204644 A1 (CAVALLINI et al.) 14 September 2006 (14.09.2006) para [0002], [0012], [0019], [0021], [0022], [0025], [0026], [0034], [0035], [0039], [0046], [0049], abstract	1-18
A	US 2006/0051492 A1 (MUELLER et al.) 09 March 2006 (09.03.2006) para [0024], [0032], [0052], [0062], [0092], abstract	1-18
A	US 2008/0268112 A1 (ROLAN et al.) 30 October 2008 (30.10.2008) para [0002], [0027], [0028], [0031], [0098], [0114], abstract	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 2012 (20.03.2012)

Date of mailing of the international search report

13 APR 2012

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Sheet 1 of 2

Substitute Disclosure Form Information Disclosure Statement by Applicant (Use several sheets if necessary) (37 CFR §1.98(b))	U.S. Department of Commerce Patent and Trademark Office	Attorney Docket No. 38767-0015008	Application No. 15/913,090
	Applicant Impossible Foods Inc.		
	Filing Date March 6, 2018	Group Art Unit 1796	

U.S. Patent Documents							
Examiner Initial	Desig. ID	Document Number	Publication Date	Patentee	Filing Date If Appropriate	Class	Subclass
	1.	2021/0037851	2/11/2021	Fraser et al			
	2.	2021/0051976	2/25/2021	Fraser et al.			
	3.	2021/0051977	2/25/2021	Vrljic et al.			

Foreign Patent Documents or Published Foreign Patent Applications							
Examiner Initial	Desig. ID	Document Number	Publication Date	Country or Patent Office	Translation	Class	Subclass
	4.	WO 2005/019165	3/3/2005	WO			
	5.	WO 2009/007424	1/15/2009	WO			
	6.	WO 2012/075088	6/7/2012	WO			

Other Documents (include Author, Title, Date, and Place of Publication)		
Examiner Initial	Desig. ID	Document
	7.	Becana et al., "Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules," New Phytologist, 2010, 188:960-976
	8.	Butler et al., "A haemoprotein from the lipid of peanuts," Nature, March 1965, pages 1319-1321
	9.	De La Parra "Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips," Journal of Agricultural and Food Chemistry, May 16, 2007, 55(10):4177-4183
	10.	Dharmadhikari, "Yeast Autolysis," Vineyard and Vintage View, retrieved on November 27, 2020, retrieved from URL < https://www.extension.iastate.edu/wine/yeast-autolysis >, 6 pages
	11.	EP Opposition "Response to Summons," in Appln. No. 14737766.7, dated, November 19, 2020, 9 pages
	12.	EP Opposition "Third-Party Observation," in Appln. No. 14737766.7, dated, January 18, 2021, 5 pages
	13.	EP Opposition, "Supplemental responsive declaration of Dr. Jorge Ruiz-Carrascal," Exhibit D103 in European Appln. No. 1737766.7, dated November 11, 2020, 7 pages
	14.	Fridman et al., "Isolation and Characterization of Soybean Cytochrome c," Archives of biochemistry and biophysics, February 1968, 126:299-304
	15.	Haandel et al., "Characterization of Different Commercial Soybean Peroxidase Preparations and Use of the Enzyme for N-Demethylation of Methyl N-Methylantranilate To Produce the Food Flavor Methylantranilate," J. Agric. Food Chem, 2000, 48: 1949-1954
	16.	Kerler et al., "Basic chemistry and process conditions for reaction flavours with particular focus on Maillard-type reactions," Food Flavor Tech., 2010, 3:3.2-3.3
	17.	Martins et al., " Meat flavor generation in complex maillard model systems," American Chem. Soc., 2010, 71-83

Examiner Signature	Date Considered
EXAMINER: Initials citation considered. Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.	

Substitute Disclosure Form

Sheet 2 of 2

Substitute Disclosure Form Information Disclosure Statement by Applicant (Use several sheets if necessary) (37 CFR §1.98(b))	U.S. Department of Commerce Patent and Trademark Office	Attorney Docket No. 38767-0015008	Application No. 15/913,090
	Applicant Impossible Foods Inc.		
	Filing Date March 6, 2018	Group Art Unit 1796	

Other Documents (include Author, Title, Date, and Place of Publication)		
Examiner Initial	Desig. ID	Document
	18.	Swiderski et al., "Spent Brewer's Yeast Autolysates as a New and Valuable Component of Functional Food and Dietary Supplements," J. Food Process Technol, 2015, 6:12
	19.	Zhao et al., "Degradation of RNA during the autolysis of Saccharomyces cerevisiae produces predominantly ribonucleotides," J. Ind. Microbiol Biotechnol, August 10, 2005, 32:415-423

Examiner Signature	Date Considered
EXAMINER: Initials citation considered. Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.	

Substitute Disclosure Form

Attorney Docket No.: 38767-0015008

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Named Inventor :	Rachel Fraser	Art Unit :	1796
Application No. :	15/913,090	Examiner :	Elizabeth A. Gwartney
Filed :	March 6, 2018	Conf. No. :	9878
Title :	METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES		

MAIL STOP RCE

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT

Please consider the documents listed on the disclosure form submitted with this statement. Copies of the documents are being submitted with this statement to the extent required under 37 C.F.R. § 1.98(a)(2).

This statement is being filed with a Request for Continued Examination. No fee is required.

Apply any necessary charges or credits applicable under 37 C.F.R. § 1.17(p) to deposit account 06-1050, referencing the above attorney docket number.

Please contact the undersigned if there are any questions regarding this statement.

Respectfully submitted,

Date: May 5, 2021

/Molly R. Kelley, Reg. No. 76,691/
Molly R. Kelley
Reg. No. 76,691

Customer Number 26191
Fish & Richardson P.C.
Telephone: +1 (612) 337-2519
Facsimile: (612) 288-9696

62549534.doc

Electronic Patent Application Fee Transmittal				
Application Number:		15913090		
Filing Date:		06-Mar-2018		
Title of Invention:		METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES		
First Named Inventor/Applicant Name:		Rachel Fraser		
Filer:		Molly Ruth Kelley/Karissa Robinson		
Attorney Docket Number:		38767-0015008		
Filed as Large Entity				
Filing Fees for Utility under 35 USC 111(a)				
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
Extension-of-Time:				

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Miscellaneous:				
RCE- 1ST REQUEST	1801	1	1360	1360
Total in USD (\$)				1360

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	42646185
Application Number:	15913090
International Application Number:	
Confirmation Number:	9878
Title of Invention:	METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES
First Named Inventor/Applicant Name:	Rachel Fraser
Customer Number:	26191
Filer:	Molly Ruth Kelley/Karissa Robinson
Filer Authorized By:	Molly Ruth Kelley
Attorney Docket Number:	38767-0015008
Receipt Date:	05-MAY-2021
Filing Date:	06-MAR-2018
Time Stamp:	16:28:54
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	DA
Payment was successfully received in RAM	\$ 1360
RAM confirmation Number	E202155G29363304
Deposit Account	
Authorized User	
The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:	

File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Request for Continued Examination (RCE)	RCE.pdf	115850	no	1
			8bc636efe51067ac0e731b6402947195cbea58d0		
Warnings:					
This is not a USPTO supplied RCE SB30 form.					
Information:					
2	Foreign Reference	WO2005019165A1.pdf	1144688	no	17
			0665fa2263677f25f74fbd8617addd9551522d42		
Warnings:					
Information:					
3	Foreign Reference	WO2009007424A1.pdf	1266479	no	18
			dc231dbea39c195180d3efc11d1136cc5662ad08		
Warnings:					
Information:					
4	Foreign Reference	WO2012075088A1.pdf	511073	no	8
			c2db00f9d0b67749a030ff20405d1ebf9193853d		
Warnings:					
Information:					
5	Non Patent Literature	Becana_recentinsightsinto.pdf	6001230	no	17
			f4370306eed1a9a9267b6e85423757d2d63bbc3d		
Warnings:					
Information:					
6	Non Patent Literature	Butler_ahemoprotein.pdf	1807049	no	4
			d1ec5fc96cf80c6ff7ba30a49a817ceebd7df349		
Warnings:					

Information:					
7	Non Patent Literature	DELAPARRA_EffectOfProcessing.pdf	376076	no	8
			bd8c6d168f0777b1aca3d8e17db5ea567cd eabc6		
Warnings:					
Information:					
8	Non Patent Literature	Dharmadhikari_yeastautolysis.pdf	1951344	no	6
			c28ba1baf791110960bc5e3dd5119277daa 7fa0		
Warnings:					
Information:					
9	Non Patent Literature	EPOPP_Response to Summons.pdf	1172176	no	9
			0442ae43845da1ac1198254ba560dcd2969 5de7d		
Warnings:					
Information:					
10	Non Patent Literature	EPOPP_third party opposition.pdf	736339	no	5
			0c0cdec77b8dde5185a81b0d6a3877aa29c 237f8		
Warnings:					
Information:					
11	Non Patent Literature	EPOPP_Supplemental DeclarationJorgRuiz.pdf	623792	no	7
			de002057e7a2478f78ea60691e3ad56d436 11d56		
Warnings:					
Information:					
12	Non Patent Literature	Fridman_isolation and.pdf	938865	no	6
			126ef633a87e921c224b4d4870a100f60630 6aaf		
Warnings:					
Information:					
13	Non Patent Literature	Haandel_chrcacterization of different.pdf	1861245	no	6
			3a5d966e79a4744b6aead43d92284b781 b99775		
Warnings:					
Information:					

14	Non Patent Literature	Kerler_BasicChemistryand.pdf	632568	no	38
			51fb1e5d85255898e733f8b92fcd8e021fe4892		
Warnings:					
Information:					
15	Non Patent Literature	Martins_Meatflavorgeneration.pdf	364992	no	13
			00aef352ec664b042acd93c0f0b5312feb817a71		
Warnings:					
Information:					
16	Non Patent Literature	SWIDERSKI_spentbrewersyeast.pdf	1746462	no	5
			ec3bd48e3c50fcdce548da30f9772ae1d68affa3ab		
Warnings:					
Information:					
17	Non Patent Literature	Zhao_degradationofrna.pdf	1602517	no	9
			b9ada94bccb1975604fbb4472b901ede0eae4325b		
Warnings:					
Information:					
18	Information Disclosure Statement (IDS) Form (SB08)	IDS.pdf	144079	no	3
			9f2315840fa7f02a32f1e9ee5a1233b1a8f2aa225		
Warnings:					
Information:					
This is not an USPTO supplied IDS fillable form					
19	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	30562	no	2
			18f6564ae640a00a9908d8b9e24219849a8cd713		
Warnings:					
Information:					
Total Files Size (in bytes):			23027386		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111

If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371

If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office

If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
15/913,090	03/06/2018	Rachel Fraser	38767-0015008	9878
26191 7590 05/10/2021 FISH & RICHARDSON P.C. (TC) PO BOX 1022 MINNEAPOLIS, MN 55440-1022			EXAMINER GWARTNEY, ELIZABETH A	
			ART UNIT 1796	PAPER NUMBER
			NOTIFICATION DATE 05/10/2021	DELIVERY MODE ELECTRONIC

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

The time period for reply, if any, is set in the attached communication.

Notice of the Office communication was sent electronically on above-indicated "Notification Date" to the following e-mail address(es):

PATDOCTC@fr.com

Supplemental Notice of Allowability	Application No. 15/913,090 Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Applicant(s) Fraser et al. <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Art Unit 1796</td> <td style="width: 50%;">AIA (FITF) Status No</td> </tr> </table>	Art Unit 1796	AIA (FITF) Status No
Art Unit 1796	AIA (FITF) Status No			

-- The MAILING DATE of this communication appears on the cover sheet with the correspondence address--

All claims being allowable, PROSECUTION ON THE MERITS IS (OR REMAINS) CLOSED in this application. If not included herewith (or previously mailed), a Notice of Allowance (PTOL-85) or other appropriate communication will be mailed in due course. **THIS NOTICE OF ALLOWABILITY IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS.** This application is subject to withdrawal from issue at the initiative of the Office or upon petition by the applicant. See 37 CFR 1.313 and MPEP 1308.

1. ☒ This communication is responsive to After Final Amendment filed 8 April 2021 and Printer Rush issued 29 April 2021.
☐ A declaration(s)/affidavit(s) under **37 CFR 1.130(b)** was/were filed on ____.

2. ☐ An election was made by the applicant in response to a restriction requirement set forth during the interview on ____; the restriction requirement and election have been incorporated into this action.

3. ☒ The allowed claim(s) is/are 31-37 and 40-54. As a result of the allowed claim(s), you may be eligible to benefit from the **Patent Prosecution Highway** program at a participating intellectual property office for the corresponding application. For more information, please see http://www.uspto.gov/patents/init_events/pph/index.jsp or send an inquiry to PPHfeedback@uspto.gov.

4. ☐ Acknowledgment is made of a claim for foreign priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or (f).

Certified copies:

a) ☐ All b) ☐ Some *c) ☐ None of the:

1. ☐ Certified copies of the priority documents have been received.

2. ☐ Certified copies of the priority documents have been received in Application No. ____.

3. ☐ Copies of the certified copies of the priority documents have been received in this national stage application from the International Bureau (PCT Rule 17.2(a)).

* Certified copies not received: ____.

Applicant has THREE MONTHS FROM THE "MAILING DATE" of this communication to file a reply complying with the requirements noted below. Failure to timely comply will result in ABANDONMENT of this application.
THIS THREE-MONTH PERIOD IS NOT EXTENDABLE.

5. ☐ CORRECTED DRAWINGS (as "replacement sheets") must be submitted.
☐ including changes required by the attached Examiner's Amendment / Comment or in the Office action of Paper No./Mail Date ____.

Identifying indicia such as the application number (see 37 CFR 1.84(c)) should be written on the drawings in the front (not the back) of each sheet. Replacement sheet(s) should be labeled as such in the header according to 37 CFR 1.121(d).

6. ☐ DEPOSIT OF and/or INFORMATION about the deposit of BIOLOGICAL MATERIAL must be submitted. Note the attached Examiner's comment regarding REQUIREMENT FOR THE DEPOSIT OF BIOLOGICAL MATERIAL.

Attachment(s)

1. ☐ Notice of References Cited (PTO-892) 2. ☒ Information Disclosure Statements (PTO/SB/08), Paper No./Mail Date <u>20200319</u> . 3. ☐ Examiner's Comment Regarding Requirement for Deposit of Biological Material _____. 4. ☐ Interview Summary (PTO-413), Paper No./Mail Date _____.	5. ☐ Examiner's Amendment/Comment 6. ☐ Examiner's Statement of Reasons for Allowance 7. ☐ Other _____.
---	---

	/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1796
--	---

Receipt date: 03/19/2020

Sheet 1 of 1

Substitute Disclosure Form Information Disclosure Statement by Applicant (Use several sheets if necessary) (37 CFR §1.98(b))	U.S. Department of Commerce Patent and Trademark Office	Attorney Docket No. 38767-0015008	Application No. 15/913,090
	Applicant Impossible Foods Inc.		
	Filing Date March 6, 2018	Group Art Unit 1791	

U.S. Patent Documents							
Examiner Initial	Desig. ID	Document Number	Publication Date	Patentee	Filing Date If Appropriate	Class	Subclass

Foreign Patent Documents or Published Foreign Patent Applications							
Examiner Initial	Desig. ID	Document Number	Publication Date	Country or Patent Office	Translation	Class	Subclass
	1.	JP H08-289761	11/5/1996	JP	Abstract		

Other Documents (include Author, Title, Date, and Place of Publication)		
Examiner Initial	Desig. ID	Document
	2.	"Peas, green raw," FoodData Central, US Department of Agriculture, retrieved from URL < https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170419/nutrients >, April 1, 2019, 8 pages
	3.	Berrios, et al., "Carbohydrate composition of raw and extruded pulse flours," Food Research International, 2010, 43:531-536
	4.	EP Opposition, in Application No. 14737766.7, dated July 4, 2019, 8 pages
	5.	Jahreis, et al., "Legume flours: nutritionally important sources of protein and dietary fiber," Ernahrungs Umschau, 2016, 63(2):36-42
	6.	Liu, "Comparison of lipid content and fatty acid composition and their distribution within seeds of 5 small grain species," J. Food Sci., 2011, 76(2):C334-C342
	7.	Macnicol, "Developmental changes in the free amino acid pool and total protein amino acids of pea cotyledons (Pisum sativum L.)," Plant Physiol., 1983, 72:492-497
	8.	Oldach, "Biochemistry of a Burger: Impossible Foods does science, makes food and tries to change the world," ASBMB Today, retrieved from URL < https://www.asbmb.org/asbmb-today/industry/100119/biochemistry-of-a-burger >, October 1, 2019, 12 pages
	9.	Opponent's Reply Letter in opposition to EP Patent. No. 2943072, dated 1/20/2020, 18 pages
	10.	Rebuttal Declaration of Dr. Jorge Ruiz-Carrascal and Supporting Exhibits, dated January 20, 2020, 12 pages
	11.	Warendorf, et al., "The flavour of bouillon: 2. Sensory analysis of non-volatiles and imitation of a bouillon," Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1992, 195(3):215-223, English Abstract
	12.	Wood, et al., "Fatty deposition, fatty acid composition and meat quality: a review," Meat Science, 2008, 78:343-358

Examiner Signature /ELIZABETH GWARTNEY/	Date Considered 05/07/2020
EXAMINER: Initials citation considered. Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.	

Substitute Disclosure Form

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /E.G./

Receipt date: 03/19/2020

Attorney Docket No.: 38767-0015008

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Named Inventor : Rachel Fraser Art Unit : 1791
Application No. : 15/913,090 Examiner : Unknown
Filed : March 6, 2018 Conf. No. : 9878
Title : METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE
FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES

MAIL STOP AMENDMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT

Please consider the documents listed on the disclosure form submitted with this statement. Copies of the documents are being submitted with this statement to the extent required under 37 C.F.R. § 1.98(a)(2).

The applicant wishes to make the Examiner aware of the following related applications. The prosecution histories for these applications and patents are available on PAIR, and are not provided with this statement.

Application No.	Filing Date	First Named Inventor	Attorney Docket No.
14/796,970	7/10/2015	Marija Vrljic	38767-0010001
15/786,776	10/18/2017	Marija Vrljic	38767-0010002
16/238,802	1/3/2019	Marija Vrljic	38767-0010003
16/238,769	1/3/2019	Marija Vrljic	38767-0010004
14/152,499	1/10/2014	Patrick O'Reilly Brown M.D., Ph.D.	38767-0012001
14/752,540	6/26/2015	Patrick O'Reilly Brown M.D., Ph.D.	38767-0012002
15/985,694	5/21/2018	Patrick O'Reilly Brown M.D., Ph.D.	38767-0012003
14/797,006	7/10/2015	Rachel Fraser	38767-0015001
15/398,479	1/4/2017	Rachel Fraser	38767-0015002
15/624,505	6/15/2017	Rachel Fraser	38767-0015003
15/624,513	6/15/2017	Rachel Fraser	38767-0015004
15/839,994	12/13/2017	Rachel Fraser	38767-0015005
15/913,018	3/6/2018	Rachel Fraser	38767-0015006
15/912,763	3/6/2018	Rachel Fraser	38767-0015007
13/941,211	7/12/2013	Patrick O'Reilly Brown M.D., Ph.D.	38767-0019001
15/985,697	5/21/2018	Patrick O'Reilly Brown M.D., Ph.D.	38767-0019002
15/300,339	9/29/2016	Ranjani Varadan	38767-0026US1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /E.G./

Receipt date: 03/19/2020

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 2 of 2

Attorney Docket: 38767-0015008

16/238,698	1/3/2019	Ranjani Varadan	38767-0026002
16/238,749	1/3/2019	Ranjani Varadan	38767-0026003

This statement is being filed before the receipt of a first action on the merits. Therefore, no fee is believed due.

Please apply any necessary charges or credits applicable under 37 C.F.R. § 1.17(p) to deposit account 06-1050, referencing the above attorney docket number.

Please contact the undersigned if there are any questions regarding this statement.

Respectfully submitted,

Date: March 19, 2020

/Kimberly M. Maize, Reg. No. 76,370/

Kimberly M. Maize
Reg. No. 76,370

Customer Number 26191
Fish & Richardson P.C.
Telephone: +1 (612) 638-5707
Facsimile: (877) 769-7945

62274507.doc

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /E.G./

Doc code: IDS

Doc description: Information Disclosure Statement (IDS) Filed

PTO/SB/08a (02-18)

Approved for use through 11/30/2020. OMB 0651-0031

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number	15913090
	Filing Date	2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser
	Art Unit	1796
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney
	Attorney Docket Number	338767-0015008

U.S.PATENTS								
Examiner Initial*	Cite No	Patent Number	Kind Code ¹	Issue Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear		
	1							
If you wish to add additional U.S. Patent citation information please click the Add button.								
U.S.PATENT APPLICATION PUBLICATIONS								
Examiner Initial*	Cite No	Publication Number	Kind Code ¹	Publication Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear		
	1	20210289824		2021-09-23	Brown et al.			
If you wish to add additional U.S. Published Application citation information please click the Add button.								
FOREIGN PATENT DOCUMENTS								
Examiner Initial*	Cite No	Foreign Document Number ³	Country Code ²	Kind Code ⁴	Publication Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁵
	1	JP 2010200627	JP		2010-09-16	HOUSE FOODS CORP		☐
	2	JP 2017509349	JP		2017-04-06	IMPOSSIBLE FOODS INC.	English Abstract	☒
If you wish to add additional Foreign Patent Document citation information please click the Add button								
NON-PATENT LITERATURE DOCUMENTS								

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number		15913090
	Filing Date		2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser	
	Art Unit	1796	
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney	
	Attorney Docket Number	338767-0015008	

Examiner Initials*	Cite No	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc), date, pages(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁵
	1	Extended European Search Report for International Application No. EP 21161324.5, dated September 22, 2021, 12 pages	☐
	2	KOLODYAZNAYA, "Pishchevaya khimiya [Food chemistry]," St. Petersburg, SPBGAKHPT Publ. 1999, Translation, 4 pages, St. Petersburg, Russia	☒
	3	LISITSIN et al., "Analogues of meat products with functional properties", All about meat, 2007, Translation, 6 pages, Russia	☒

If you wish to add additional non-patent literature document citation information please click the Add button

EXAMINER SIGNATURE

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

*EXAMINER: Initial if reference considered, whether or not citation is in conformance with MPEP 609. Draw line through a citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.

¹ See Kind Codes of USPTO Patent Documents at www.USPTO.GOV or MPEP 901.04. ² Enter office that issued the document, by the two-letter code (WIPO Standard ST.3). ³ For Japanese patent documents, the indication of the year of the reign of the Emperor must precede the serial number of the patent document. ⁴ Kind of document by the appropriate symbols as indicated on the document under WIPO Standard ST.16 if possible. ⁵ Applicant is to place a check mark here if English language translation is attached.

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number		15913090
	Filing Date		2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser	
	Art Unit	1796	
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney	
	Attorney Docket Number	338767-0015008	

CERTIFICATION STATEMENT

Please see 37 CFR 1.97 and 1.98 to make the appropriate selection(s):

☐ That each item of information contained in the information disclosure statement was first cited in any communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application not more than three months prior to the filing of the information disclosure statement. See 37 CFR 1.97(e)(1).

OR

☐ That no item of information contained in the information disclosure statement was cited in a communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application, and, to the knowledge of the person signing the certification after making reasonable inquiry, no item of information contained in the information disclosure statement was known to any individual designated in 37 CFR 1.56(c) more than three months prior to the filing of the information disclosure statement. See 37 CFR 1.97(e)(2).

☐ See attached certification statement.

☐ The fee set forth in 37 CFR 1.17 (p) has been submitted herewith.

☒ A certification statement is not submitted herewith.

SIGNATURE

A signature of the applicant or representative is required in accordance with CFR 1.33, 10.18. Please see CFR 1.4(d) for the form of the signature.

Signature	/Heather L. Flanagan/	Date (YYYY-MM-DD)	2021-09-27
Name/Print	Heather L. Flanagan	Registration Number	54,101

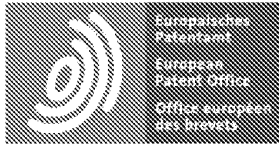
This collection of information is required by 37 CFR 1.97 and 1.98. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 1 hour to complete, including gathering, preparing and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. **DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether the Freedom of Information Act requires disclosure of these records.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspections or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.



Espacenet

JP2010200627A PSEUDO MEAT FOOD AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

Applicants: HOUSE FOODS CORP

Inventors: NISHIMURA SHINPEI, TAKADA SHOJI, UMEZU NAOKO

Classifications:

IPC *A23J3/00; A23J3/16; A23J3/26;*

Priorities: JP2009046949A 2009-02-27

Application: JP2010200627A-2009-02-27

Publication: JP2010200627A-2010-09-16

Published as: JP2010200627A

PSEUDO MEAT FOOD AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a pseudo meat food for obtaining palate feeling close to that of natural meat when chewing, and close to natural meat also in appearance. SOLUTION: The pseudo meat food is obtained by making a formed product by forming a raw material mixture which contains hydrated and fiber loosened structured vegetable protein obtained by hydrating and fiber loosening granular vegetable protein structured and dried by processing with an extruder, hydrated fibrous vegetable protein, and a binding agent, and heat coagulating the formed product. COPYRIGHT: (C)2010,JPO&INPIT

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-200627

(P2010-200627A)

(43) 公開日 平成22年9月16日(2010.9.16)

(51) Int. Cl.			F 1			テーマコード (参考)		
A 2 3 J	3/00	(2006.01)	A 2 3 J	3/00	5 0 2			
A 2 3 J	3/26	(2006.01)	A 2 3 J	3/26	5 0 1			
A 2 3 J	3/16	(2006.01)	A 2 3 J	3/16	5 0 1			
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 13 頁)								

(21) 出願番号	特願2009-46949 (P2009-46949)	(71) 出願人	000111487
(22) 出願日	平成21年2月27日 (2009.2.27)		ハウス食品株式会社
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100130443
			弁理士 遠藤 真治
		(72) 発明者	西村 慎平
			大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号
			ハウス食品株式会社内

最終頁に続く

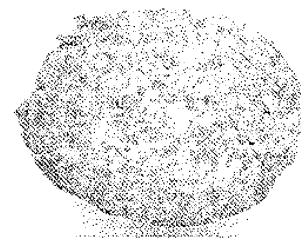
(54) 【発明の名称】 擬似肉食品およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、噛んだ時に天然肉の食感を得ることができる、見た目にも天然肉に近い擬似肉食品を提供することを目的とする。

【解決手段】エクストルーダーによる処理により組織化され、乾燥された粒状植物性たん白を水和させ解繊させて得られた、水和・解繊された組織化植物性たん白と、水和された繊維状植物性たん白と、結着剤とを含む原料混合物を成形して成形物とし、この成形物を加熱凝固することにより、上記目的を達成する擬似肉食品を得ることができる。

【選択図】図1



(2)

特開2010-200627(P2010-200627A)

【特許請求の範囲】

【請求項1】

エクストルーダーによる処理により組織化され、乾燥された粒状植物性たん白を水和させ解繊させて得られた、水和・解繊された組織化植物性たん白と、

水和された繊維状植物性たん白と、

結着剤と

を含む原料混合物を加熱凝固することを特徴とする、擬似肉食品の製造方法。

【請求項2】

水和・解繊された組織化植物性たん白と水和された繊維状植物性たん白との乾燥物換算合計量に対して、水和・解繊された組織化植物性たん白が乾燥物換算で45～95質量%である、請求項1の方法。

【請求項3】

水和・解繊された組織化植物性たん白が太さ0.1～6mmのものを含み、且つ水和された繊維状植物性たん白が太さ0.1～2mmのものを含み、請求項1または2の方法。

【請求項4】

水和・解繊された組織化植物性たん白が長さ5mm以上のものを含み、且つ、水和された繊維状植物性たん白が長さ5mm以上のものを含み、請求項1～3のいずれか1項の方法。

【請求項5】

粒状植物性たん白及び繊維状植物性たん白が大豆たん白を主成分とする、請求項1～4のいずれか1項の方法。

【請求項6】

結着剤が植物性たん白、動物性たん白、及び多糖類からなる群から選ばれる1種以上である、請求項1～5のいずれか1項の方法。

【請求項7】

結着剤の少なくとも一部が、水和した場合に熱可逆性ゲルを形成する結着剤であり、原料混合物が当該結着剤を、水和した熱可逆性ゲルの形態で含む、請求項1～6のいずれか1項の方法。

【請求項8】

原料混合物が、たん白質接着酵素を更に含む、請求項1～7のいずれか1項の方法。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項の方法により製造された擬似肉食品。

【請求項10】

組織化された粒状植物性たん白を水和させ解繊させた、水和・解繊された組織化植物性たん白と、

水和された繊維状植物性たん白と、

結着剤と

を混合された状態で含み、かつ凝固により一体化されていることを特徴とする、擬似肉食品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は肉代替物として使用できる擬似肉食品およびその製造方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

擬似肉食品素材は、かつては動物性たん白の安価な代替物として開発されたものであるが、今日においては低カロリー食材として、或いは動物性たん白の摂取が制限されている疾患の患者のための畜肉代替素材として改めて注目されている。擬似肉食品に関する従来技術としては例えば次のようなものがある。

【0003】

(3)

特開2010-200627(P2010-200627A)

特許文献1には、粒径が10～30mmである塊状の組織状植物性蛋白質と、最大粒径が10mm未満でしかも粒径1～5mmのものが70重量%以上を占める組織状植物性蛋白質10～40重量%と、繊維長が5～30mmの繊維状植物性蛋白質5～40重量%と、結合剤とを混合し、成形後加熱固化することを特徴とする植物性蛋白質食品の製造方法が記載されている。特許文献1には、粒径が10～30mmである塊状の組織状植物性蛋白質を配合することにより、咀嚼した際に天然肉類似のテクスチャーを付与することができる旨記載されており、塊状の組織状植物性蛋白質が粒径10mm未満の場合には天然肉類似のテクスチャーを得ることが難しいことも記載されている。

【0004】

特許文献2にもまた、ステーキ肉等の一枚肉の組織および食感に類似した肉様食品を提供することを目的とする技術として、冷却すれば繊維状となる繊維状蛋白質の前駆体若しくは繊維状蛋白質素材の熱可塑性物のいずれかを塊状に成形して得た肉塊様蛋白質素材を、繊維状蛋白質素材及び結着料と混合成形することを特徴とする肉様食品の製造方法が開示されている。上記の肉塊様素材は、熱交換器等で加圧加熱して出口から導出された約1cm平方以上の断面を有する大きさの塊状のものである。肉様食品は、上記の肉塊様素材の部分と結着料の中に繊維状蛋白質が分散した部分とにより形成される。特許文献2には「塊」の大きさが小さすぎると、一枚肉としての噛み応えが全体として弱くなることも記載されており、下記の特許文献3のように、肉塊様素材を解凍して用いることは記載されていない。

【0005】

特許文献3には、O/W型エマルジョンと、植物たん白質含有物質を水と混練し、加熱状態にてせん断応力を加えて配向せしめ、次いで解凍して得た繊維状たん白質と、結着剤とを、前記O/W型エマルジョンが肉様食品全体の5～50重量%となるように混合した後、該混合物を成型加熱することを特徴とする肉様食品の製造法が開示されている。特許文献3によれば、O/W型エマルジョンと繊維状たん白質とを組み合わせることにより、肉様食品を噛んだときに油が口中に広がって天然肉と同等のジューシー感が得られ、なお且つ、天然肉に酷似した繊維性の食感が得られる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は実施例1の擬似肉食品の外観を示す写真である。

【図2】図2は実施例2の擬似肉食品の外観を示す写真である。

【図3】図3は実施例3の擬似肉食品の外観を示す写真である。

【図4】図4は比較例1の擬似肉食品の外観を示す写真である。

【図5】図5は比較例2の擬似肉食品の外観を示す写真である。

【図6】図6は比較例3の擬似肉食品の外観を示す写真である。

(4)

特開2010-200627 (P2010-200627A)

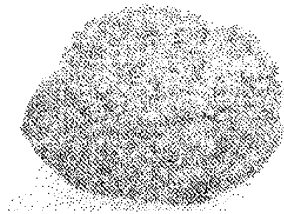
【図1】



(5)

特開2010-200627 (P2010-200627A)

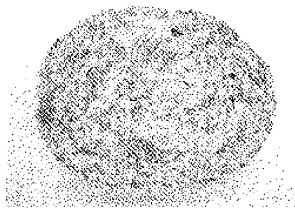
【図2】



(6)

特開2010-200627 (P2010-200627A)

【図3】



(7)

特開2010-200627 (P2010-200627A)

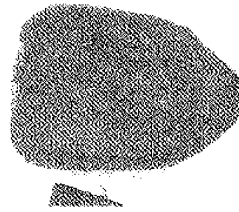
【図4】



(8)

特開2010-200627 (P2010-200627A)

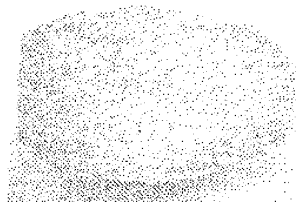
【図5】



(9)

特開2010-200627 (P2010-200627A)

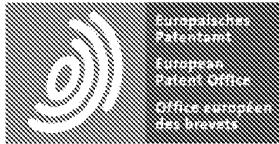
【図6】



(1 0)

特開2010-200627 (P2010-200627A)

(72)発明者 梅津 尚子
大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号 ハウス食品株式会社内
(72)発明者 高田 昭二
大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号 ハウス食品株式会社内



Espacenet

US10172380B2 Ground meat replicas

Applicants: IMPOSSIBLE FOODS INC [US]

Inventors: COHN ELYSIA [US], FRASER RACHEL [US], HOLZ-SCHIETINGER CELESTE [US], KALE ANIKET [US], KARR JESSICA [US], KLAPHOLZ-BROWN ARIEL [US], SHIU JENNIFER WOAN-YI [US], SOLOMATIN SERGEY [US], VARADAN RANJANI [US]

Classifications:

IPC **A23L13/40;**

CPC **A23J1/02 (RU); A23J3/04 (RU); A23J3/14 (RU); A23L13/422 (EP,KR,US); A23L13/426 (EP,KR,US); A23L13/428 (KR); A23L13/43 (EP,KR,US); A23V2002/00 (US);**

Priorities: US201461973181P 2014-03-31; US201462058230P 2014-10-01; US2015023679W 2015-03-31; US201515300339A 2015-03-31

Application: US10172380B2-2015-03-31

Publication: US10172380B2-2019-01-08

Published as: AU2015240911A1; AU2015240911B2; AU2019200777A1; AU2020205210A1; BR112016022673A2; CA2944459A1; CN106455626A; EP3125699A1; EP3125699A4; EP3125699B1; EP3628173A1; JP2017509349A; JP2020202861A; JP6759103B2; KR20160140790A; MX2016012817A; RU2016142354A; RU2016142354A3; RU2020113203A; RU2728653C2; US10172380B2; US10798958B2; US2017188612A1; US2019133162A1; US2019133163A1; WO2015153666A1; WO2015153666A8

Ground meat replicas

Abstract

This document relates to ground meat replicas, and more particularly to plant-based products that mimic ground meat, including the fibrousness, heterogeneity in texture, beefy flavor, and red-to-brown color transition during cooking of ground meat. For example, this document provides meat replicas that include proteins that are selected based upon the temperature at which they gel and/or denature to mimic the behavior and qualities of meat during cooking.

JP 2017-509349 A 2017.4.6

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-509349

(P2017-509349A)

(43) 公表日 平成29年4月6日 (2017.4.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A23J 3/00 (2006.01)	A23J 3/00 505	4B001
A23J 3/12 (2006.01)	A23J 3/12	4B035
A23L 29/00 (2016.01)	A23L 29/00	
A23C 20/00 (2006.01)	A23C 20/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁)

(21) 出願番号	特願2016-559955 (P2016-559955)	(71) 出願人	514009867
(86) (22) 出願日	平成27年3月31日 (2015.3.31)		インボッシブル フーズ インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成28年11月22日 (2016.11.22)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/023679		アメリカ合衆国 94063 カリフォル
(87) 国際公開番号	W02015/153666		ニア州, レッドウッド シティ, チサビー
(87) 国際公開日	平成27年10月8日 (2015.10.8)		ク ドライブ 525
(31) 優先権主張番号	61/973, 181	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成26年3月31日 (2014.3.31)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100120134
(31) 優先権主張番号	62/058, 230		弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成26年10月1日 (2014.10.1)	(74) 代理人	100104282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ひき肉レプリカ

(57) 【要約】

本文書は、ひき肉レプリカ、より具体的には、繊維性、質感の不均一性、牛肉のような風味、およびひき肉の調理中の赤色から褐色への色の変化を含めた、ひき肉を模倣する植物ベースの製品に関する。例えば、本文書は、これらが、調理中の食肉の挙動および品質、すなわち、引き締まり、シネシス（水の放出）、噛みごたえ、または食感を再現するためにゲル化するおよび／または変性する、温度に基づいて選択されるタンパク質を含む食肉レプリカを提供する。

(2)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 肉の生地約5重量%から約88重量%；
(b) 炭水化物系ゲル約0重量%から約40重量%；
(c) 非動物脂肪約5重量%から約35重量%；
(d) 矯味剤約0.00001重量%から約10重量%；
(e) 結合剤約0重量%から約15重量%；ならびに
(f) ヘム含有タンパク質および／または鉄塩約0.01重量%から約4重量%
を含む、食肉レプリカ組成物。

【請求項2】

前記肉の生地が、矯味剤を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記非動物脂肪が、矯味剤を含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記肉の生地が、前記組成物の約45重量%から約60重量%である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項5】

前記炭水化物系ゲルが、前記組成物の約10重量%から約25重量%である、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記非動物脂肪が、前記組成物の約10重量%から約15重量%である、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

前記矯味剤が、前記組成物の約3重量%から約7重量%である、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記矯味剤が、1種または複数のフレーバー前駆物質を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

前記矯味剤が、前記組成物の約0.001重量%から約2重量%である、請求項1～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

前記矯味剤が、調味料または風味付け化合物を含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

前記矯味剤が、調味料および1種または複数のフレーバー前駆物質の組合せである、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

前記結合剤が、前記組成物の約2重量%から約10重量%である、請求項1～11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記結合剤が、これらの組織構造上の特性および／もしくは風味特性を改善するために、または1種もしくは複数のタンパク質の変性およびゲル化温度を改変するために、化学的または酵素的に修飾されている1種または複数のタンパク質を含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

前記ヘム含有タンパク質が、前記組成物の約0.01重量%から約2重量%である、請求項1～13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項15】

前記ヘム含有タンパク質および前記鉄塩を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の組成物。

10

20

30

40

50

(3)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【請求項16】

前記肉の生地が、単離された植物タンパク質、食用の繊維状構成成分、任意選択の矯味剤、および任意選択の非動物脂肪を含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の組成物

【請求項17】

前記結合剤が、コングリシニンタンパク質である、請求項12に記載の組成物。

【請求項18】

- (a) 肉の生地約5重量%から約80重量%；
- (b) 非動物脂肪約5重量%から約35重量%；
- (c) 食用の繊維状構成成分約15重量%から約40重量%；
- (d) 炭水化物系ゲル約0.1重量%から約18重量%；
- (e) 矯味剤約0重量%から約10重量%；
- (f) 結合剤約0.5重量%から約15重量%；ならびに
- (g) ヘム含有タンパク質および／または鉄塩約0.1重量%から約8重量%を含む、食肉レプリカ組成物。

10

【請求項19】

- (a) 肉の生地約20重量%から約30重量%；
- (b) 非動物脂肪約15重量%から約25重量%；
- (c) 食用の繊維状構成成分約15重量%から約25重量%；
- (d) 炭水化物系ゲル約7重量%から約18重量%；
- (e) 矯味剤約0重量%から約10重量%；
- (f) 結合剤約5重量%から約15重量%；ならびに
- (g) ヘム含有タンパク質および／または鉄塩約2重量%から約8重量%を含む、請求項18に記載の食肉レプリカ組成物。

20

【請求項20】

ひき肉レプリカを製造する方法であって、

- (a) 150°Fから250°Fまでの温度まで生地を加熱するステップであり、前記生地が、単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、1種または複数の任意選択の矯味剤、および任意選択の非動物脂肪を含む、ステップと；
 - (b) 前記生地を、加熱後、非動物脂肪と合わせるステップであり、前記非動物脂肪が、矯味剤および／または単離された植物タンパク質を任意選択で含有する、ステップと；
 - (c) ステップ(b)からの生地を、炭水化物系ゲル、任意選択の食用の繊維状構成成分、任意選択の結合剤、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせて、前記ひき肉レプリカを製造するステップと
- を含む、方法。

30

【請求項21】

前記炭水化物系ゲル、前記任意選択の食用の繊維状構成成分、前記任意選択の結合剤、前記鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または前記鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ(b)からの生地を粉砕するステップをさらに含む、請求項20に記載の方法。

40

【請求項22】

肉の生地に風味付けする方法であって、

- (a) 第1の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または第1の鉄塩を、1種または複数のフレーバー前駆物質および任意選択の非動物脂肪と合わせるステップと；
 - (b) 混合物を加熱して、1種または複数のフレーバー化合物を形成するステップと；
 - (c) 単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、およびステップ(b)からの混合物を含む生地を作製するステップと
- を含む、方法。

50

(4)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【請求項23】

(d) 前記生地を、加熱後、非動物脂肪と合わせるステップであって、前記非動物脂肪が、矯味剤および／または単離された植物タンパク質を任意選択で含有する、ステップと；

(e) ステップ(d)の生地を、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、第2の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または第2の鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせて、ひき肉レプリカを製造するステップとをさらに含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記炭水化物系ゲル、前記任意選択の結合剤、前記第2の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または前記第2の鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ(d)からの生地を粉碎するステップをさらに含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

肉の生地に風味付けする方法であって、

(a) 単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、1種または複数の任意選択の矯味剤、および任意選択の非動物脂肪を含む生地を作製するステップと；

(b) 非動物脂肪を、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または第1の鉄塩、および1種もしくは複数のフレーバー前駆物質と合わせ、混合物を加熱することにより風味を付けた非動物脂肪を作製するステップと；

(c) 前記生地を、加熱後、前記風味を付けた非動物脂肪と合わせるステップとを含む、方法。

【請求項26】

ステップ(c)の生地を、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、第2の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または第2の鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせて、ひき肉レプリカを製造するステップをさらに含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記炭水化物系ゲル、前記任意選択の結合剤、前記第2の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または前記第2の鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ(c)の生地を砕くステップをさらに含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

ひき肉レプリカを製造する方法であって、

(a) 鉄塩を、1種または複数のフレーバー前駆物質および任意選択の非動物脂肪と合わせるステップと；

(b) 混合物を加熱して、1種または複数のフレーバー化合物を形成するステップと；

(c) 単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、およびステップ(b)からの混合物を含む生地を作製するステップと；

(d) 前記生地を、加熱後、非動物脂肪と合わせるステップであり、前記非動物脂肪が、矯味剤および／または単離された植物タンパク質を任意選択で含有する、ステップと；

(e) ステップ(d)の生地を、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、任意選択の鉄塩、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせて、前記ひき肉レプリカを製造するステップとを含む、方法。

【請求項29】

前記炭水化物系ゲル、前記任意選択の結合剤、前記鉄塩、前記任意選択の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環、および1種または複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ(d)からの生地を粉碎するステップをさらに含む、請求項28に記載の方法。

(5)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【請求項30】

ひき肉レプリカを製造する方法であって、
(a) 単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、1種または複数の任意選択の矯味剤、および任意選択の非動物脂肪を含む生地を作製するステップと；
(b) 非動物脂肪を、鉄塩および1種または複数のフレーバー前駆物質と合わせ、混合物を加熱することにより、風味を付けた非動物脂肪を作製するステップと；
(c) 前記生地を、加熱後、前記風味を付けた非動物脂肪と合わせるステップと；
(d) ステップ(c)の生地を、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、鉄塩、任意選択の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせて、前記ひき肉レプリカを製造するステップとを含む、方法。

10

【請求項31】

前記炭水化物系ゲル、前記任意選択の結合剤、前記鉄塩、前記任意選択の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ(c)からの生地を砕くステップをさらに含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記鉄塩が、グルコン酸鉄、塩化鉄、シュウ酸鉄、硝酸鉄、クエン酸鉄、アスコルビン酸鉄(iron ascorbate)、硫酸第一鉄、ピロリン酸第二鉄、または任意の他の水溶性の塩である、請求項20～31のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項33】

前記混合物を加熱する前に、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環を、前記鉄塩、前記1種または複数のフレーバー前駆物質、および前記非動物脂肪と合わせる、請求項28に記載の方法。

【請求項34】

鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環を、前記混合物を加熱する前に、前記非動物脂肪、前記鉄塩、および前記1種または複数のフレーバー前駆物質と合わせる、請求項30に記載の方法。

【請求項35】

前記1種または複数のフレーバー前駆物質が、糖、糖アルコール、糖酸、糖誘導体、油、遊離脂肪酸、アミノ酸もしくはその誘導体、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ビタミン、酸、ペプチド、リン脂質、タンパク質加水分解物、酵母抽出物、またはそれらの混合物である、請求項22～31のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項36】

前記フレーバー前駆物質が、グルコース、フルクトース、リボース、アラビノース、グルコース-6-リン酸、フルクトース6-リン酸、フルクトース1,6-ニリン酸、イノシトール、マルトース、スクロース、マルトデキストリン、グリコーゲン、ヌクレオチドに結合された糖、糖蜜、リン脂質、レシチン、イノシン、イノシン-リン酸(IMP)、グアノシン-リン酸(GMP)、ピラジン、アデノシン-リン酸(AMP)、乳酸、コハク酸、グリコール酸、チアミン、クレアチン、ピロリン酸塩、植物油、藻類油、ヒマワリ油、トウモロコシ油、ダイズ油、ヤシの実の油、パーム核油、ペニバナ油、アマニ油、米糠油、綿実油、オリーブ油、ヒマワリ油、カノーラ油、アマニ油、ヤシ油、マンゴー油、遊離脂肪酸、システイン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、リシン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、グルタミン、グリシン、プロリン、セリン、チロシン、グルタチオン、アミノ酸誘導体、尿素、パントテン酸、オルニチン、ナイアシン、グリセロール、シトルリン、タウリン、ピオチン、ルリジサ油、真菌油、クロスグリ油、ベタイン、βカロテン、B-ビタミン、N-アセチル-L-システイン、グルタミン酸鉄およびペプトン、またはそれらの混合物からなる群から選択される、請求項35に記載の方法。

40

50

(6)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【請求項37】

前記生地中の前記単離された植物タンパク質が、コムギグルテンを含む、請求項20～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

前記生地中の前記単離された植物タンパク質が、コムギグルテン、デヒドリンタンパク質、アルブミン、グロブリン、もしくはゼイン、またはそれらの混合物を含む、請求項20～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

前記ひき肉レブリカが、前記任意選択の食用の繊維状構成成分を含む、請求項20～38のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項40】

前記任意選択の食用の繊維状構成成分が、ニンジン、タケ、エンドウマメ、ブロッコリー、ジャガイモ、サツマイモ、トウモロコシ、全粒粉、アルファルファ、ケール、セロリ、セロリの根、パセリ、キャベツ、ズッキーニ、グリーンビーンズ、インゲンマメ、クロマメ、アズキ、白インゲン、ビート、カリフラワー、ナッツ、リンゴの皮、カラスムギ、コムギ、もしくはオオバコ、またはそれらの混合物由来の植物繊維を含む、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記任意選択の食用の繊維状構成成分が、単離された植物タンパク質の押出成形された混合物を含む、請求項39に記載の方法。

20

【請求項42】

前記押出成形された混合物が、コムギグルテンおよびダイズタンパク質単離物を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記押出成形された混合物が、矯味剤をさらに含む、請求項41または請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記矯味剤が、調味料、フレーバー化合物、またはフレーバー前駆物質である、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記調味料が、酵母抽出物、タンパク質加水分解物、または油である、請求項44に記載の方法。

30

【請求項46】

前記食用の繊維状構成成分が、溶液紡糸タンパク質繊維である、請求項39に記載の方法。

【請求項47】

前記溶液紡糸タンパク質繊維が、プロラミンを含む、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記プロラミンが、トウモロコシゼイン、エンドウマメプロラミン、カフェリン (caffein)、セカリン、ホルデイン、アベニン、またはそれらの混合物である、請求項47に記載の方法。

40

【請求項49】

前記非動物脂肪が、藻類油、真菌油、トウモロコシ油、オリーブ油、ダイズ油、ラッカセイ油、クルミ油、扁桃油、ゴマ油、綿実油、ナタネ油、カノーラ油、ペニバナ油、ヒマワリ油、アマニ油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、パバス油、シアバター、マンゴーバター、カカオバター、コムギ胚芽油、ルリジサ油、クロスグリ油、シーバックソーン油、マカダミア油、ノコギリヤシ油、共役リノール酸油、アラキドン酸強化油、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 強化油、エイコサペンタエン酸 (EPA) 強化油、パームステアリン酸、シーバックソーンベリー油、マカダミア油、ノコギリヤシ油、もしくは米糠油；あるいはマーガリンまたは他の水素化された脂肪である、請求項20～48のいずれか一項に記

50

(7)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

載の方法。

【請求項50】

前記非動物脂肪が、藻類油である、請求項20～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

前記非動物脂肪が、前記任意選択の矯味剤を含む、請求項49または請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記非動物脂肪が、前記任意選択の単離された植物タンパク質を含む、請求項49～51のいずれか一項に記載の方法。

【請求項53】

前記任意選択の単離された植物タンパク質が、コングリシニンタンパク質である、請求項52に記載の方法。

10

【請求項54】

前記生地が、前記矯味剤を含む、請求項20、21、または23～53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項55】

前記生地中の前記非動物脂肪が、矯味剤を含む、請求項20～52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

前記矯味剤が、野菜抽出物、果実抽出物、酸、酸化防止剤、カロテノイド、ラクトン、およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項54または請求項55に記載の方法。

20

【請求項57】

前記酸化防止剤が、没食子酸エピガロカテキンである、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

前記カロテノイドが、ルテイン、 β -カロテン、ゼアキサンチン、trans- β -アポー8'-カロテナル、リコペン、またはカンタキサンチンである、請求項56に記載の方法。

【請求項59】

前記野菜抽出物が、キュウリまたはトマト由来である、請求項56に記載の方法。

30

【請求項60】

前記果実抽出物が、メロンまたはパイナップル由来である、請求項56に記載の方法。

【請求項61】

前記炭水化物系ゲルが、約45℃から約85℃の間の融解温度を有する、請求項20～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

前記炭水化物系ゲルが、寒天、ペクチン、カラギーナン、コンニャク、アルギン酸塩、化学的に修飾されたアガロース、またはそれらの混合物を含む、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

前記ひき肉レプリカが、前記任意選択の結合剤を含む、請求項20～62のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項64】

前記任意選択の結合剤が、単離された植物タンパク質である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記結合剤の変性温度が、約40℃から約80℃の間である、請求項64に記載の方法。

【請求項66】

前記単離された植物タンパク質が、RuBisCO、アルブミン、グルテン、コングリ

50

(8)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

シニン、またはそれらの混合物である、請求項64に記載の方法。

【請求項67】

前記結合剤が、調理後、140°Fから190°Fまでで固まる炭水化物系ゲルである、請求項63に記載の方法。

【請求項68】

前記炭水化物系ゲルが、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、グアーガム、イナゴマメガム、キサンタンガム、またはそれらの混合物を含む、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

前記結合剤が、卵アルブミンまたはコラーゲンである、請求項63に記載の方法。

10

【請求項70】

前記鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環が、ヘム部分、またはポルフィリン、ポルフィリノーゲン、コリン、コリノイド、クロリン、バクテリオクロロフィル(bacteriochlorophyll)、コルフィン(corphin)、クロロフィリン、バクテリオクロリン、または鉄イオンと錯化されたイソバクテリオクロリン部分である、請求項20~69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

前記ヘム部分が、ヘム含有タンパク質である、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記ヘム含有タンパク質が、非共生ヘモグロビン、ヘルズゲートグロビンI、フラボヘムタンパク質、レグヘモグロビン、ヘム依存性ペルオキシダーゼ、チトクロムcペルオキシダーゼ、または哺乳動物のミオグロビンである、請求項71に記載の方法。

20

【請求項73】

前記ヘム含有タンパク質が、レグヘモグロビンである、請求項71に記載の方法。

【請求項74】

前記レグヘモグロビンが、ダイズ、エンドウマメ、またはササゲ由来である、請求項73に記載の方法。

【請求項75】

食肉の風味を増すまたは食品中の植物材料からの異臭をマスキングする方法であって、前記食品の 10^{-3} から 10^{-1} までの濃度で、前記食品に1種または複数のラクトンを加えるステップであり、前記ラクトンが、テトラヒドロ-6-メチル-2H-ピラン-2-オン、 δ -オクタラクトン、5-エチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、ブチロラクトン、ジヒドロ-5-ペンチル-2(3H)-フラノン、ジヒドロ-3-メチレン-2,5-フランジオン、1-ペンチルラクトン、テトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、6-ヘプチルテトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、 γ -オクタラクトン、5-ヒドロキシメチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-2(5H)-フラノン、5-アセチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、trans-3-メチル-4-オクタノリド2(5H)-フラノン、3-(1,1-ジメチルエチル)-2,5-ウランジオン、3,4-ジヒドロキシ-5-メチル-ジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、 δ -テトラデカラクトン、およびジヒドロ-4-ヒドロキシ-2(3H)-フラノンからなる群から選択される、ステップを含む方法。

30

【請求項76】

前記ラクトンが、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、ブチロラクトン、 γ -オクタラクトン、および δ -テトラデカラクトンである、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

食肉の風味を増すまたは食品中の植物材料からの異臭をマスキングする方法であって、前記食品の0.00001%から0.1%の間の濃度で、前記食品に1種または複数のカロテノイドを加えるステップであり、前記カロテノイドが、 β -カロテン、ゼアキサントシン、ルテイン、trans- β -アポ-8'-カロテナル、リコペン、カンタキサンチン

40

50

(9)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

、およびそれらの組合せからなる群から選択される、ステップを含む方法。

【請求項78】

前記食品が、食肉レプリカである、請求項75～77のいずれか一項に記載の方法。

【請求項79】

前記食肉レプリカが、動物性生成物を含まない、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

食肉レプリカの食肉の風味を増す方法であって、前記食肉レプリカに、野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を、前記食肉レプリカの0.0001%から10%までの濃度で前記食肉レプリカに加えるステップを含む方法。

10

【請求項81】

前記野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物が、ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物である、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

前記ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物が、キュウリまたはメロン由来である、請求項81に記載の方法。

【請求項83】

前記野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、もしくは果実抽出物を調理し、または前記食肉レプリカに加える前に別の方法で処理して、タンパク質を変性させる、請求項80～82のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項84】

前記食肉レプリカが、動物性生成物を含まない、請求項80～83のいずれか一項に記載の方法。

【請求項85】

食品の 10^{-3} から 10^{-1} の濃度でヘム含有タンパク質および1種または複数のラクトンを含む食品または食品レプリカ生成物であって、前記1種または複数のラクトンが、テトラヒドロ-6-メチル-2H-ピラン-2-オン、 δ -オクタラクトン、5-エチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、プチロラクトン、ジヒドロ-5-ペンチル-2(3H)-フラノン、ジヒドロ-3-メチレン-2,5-フランジオン、1-ペントイルラクトン、テトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、6-ヘプチルテトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、 γ -オクタラクトン、5-ヒドロキシメチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-2(5H)-フラノン、5-アセチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、trans-3-メチル-4-オクタノリド2(5H)-フラノン、3-(1,1-ジメチルエチル)-2,5-ウランジオン、3,4-ジヒドロキシ-5-メチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、 δ -テトラデカラクトン、およびジヒドロ-4-ヒドロキシ-2(3H)-フラノンからなる群から選択される、食品または食品レプリカ生成物。

30

【請求項86】

前記1種または複数のラクトンが、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、プチロラクトン、 γ -オクタラクトン、および δ -テトラデカラクトンである、請求項85に記載の食品または食品レプリカ生成物。

40

【請求項87】

食品の0.00001%から0.1%の間の濃度でヘム含有タンパク質および1種または複数のカロテノイドを含む食品または食品レプリカ生成物であって、前記1種または複数のカロテノイドが、 β -カロテン、ゼアキサンチン、ルテイン、trans- β -アポ-8'-カロテナル、リコペン、カンタキサンチン、およびそれらの組合せからなる群から選択される、食品または食品レプリカ生成物。

【請求項88】

前記食品レプリカ生成物が、食肉レプリカである、請求項85～87のいずれか一項に

50

(10)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

記載の食品または食品レプリカ生成物。

【請求項89】

前記食肉レプリカが、動物性生成物を含まない、請求項88に記載の食品または食品レプリカ生成物。

【請求項90】

食品の0.0001%から10%までの濃度で(a)ヘム含有タンパク質、および(b)野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を含む、食品または食品レプリカ生成物。

【請求項91】

前記野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物が、ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物である、請求項90に記載の食品または食品レプリカ生成物。

10

【請求項92】

前記ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物が、キュウリまたはメロン由来である、請求項91に記載の食品または食品レプリカ生成物。

【請求項93】

前記野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を調理し、または前記食品レプリカ生成物に加える前に別の方法で処理してタンパク質を変性させる、請求項90～92のいずれか一項に記載の食品または食品レプリカ生成物。

20

【請求項94】

前記野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を、前記食品レプリカ生成物に加える前に約60℃から約100℃の温度に加熱した、請求項93に記載の食品または食品レプリカ生成物。

【請求項95】

前記食品が、動物性生成物を含まない、請求項90から94のいずれか一項に記載の食品または食品レプリカ生成物。

【請求項96】

肉の生地、炭水化物系ゲル、非動物脂肪、および結合剤のうちの1種または複数をさらに含む、請求項85から95のいずれか一項に記載の食品または食品レプリカ生成物。

30

【請求項97】

食品の 10^{-3} から 10^{-1} の濃度で1種または複数のラクトンを含む食品レプリカ生成物であって、前記1種または複数のラクトンが、テトラヒドロ-6-メチル-2-H-ピラン-2-オン、 δ -オクタラクトン、5-エチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、ブチロラクトン、ジヒドロ-5-ベンチル-2(3H)-フラノン、ジヒドロ-3-メチレン-2, 5-フランジオン、1-ペンチルラクトン、テトラヒドロ-2-H-ピラン-2-オン、6-ヘプチルテトラヒドロ-2-H-ピラン-2-オン、 γ -オクタラクトン、5-ヒドロキシメチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-2(5H)-フラノン、5-アセチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、trans-3-メチル-4-オクタノリド2(5H)-フラノン、3-(1, 1-ジメチルエチル)-2, 5-ウランジオン、3, 4-ジヒドロキシ-5-メチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、 δ -テトラデカラクトン、およびジヒドロ-4-ヒドロキシ-2(3H)-フラノンからなる群から選択される、食品レプリカ生成物。

40

【請求項98】

前記1種または複数のラクトンが、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、ブチロラクトン、 γ -オクタラクトン、および δ -テトラデカラクトンである、請求項97に記載の食品レプリカ生成物。

【請求項99】

食品の0.00001%から0.1%の間の濃度で1種または複数のカロテノイドを含

50

(11)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

む食品レプリカ生成物であって、前記1種または複数のカロテノイドが、 β -カロテン、ゼアキサンチン、ルテイン、trans- β -アポ-8'-カロテナル、リコペン、カンタキサンチン、およびそれらの組合せからなる群から選択される、食品レプリカ生成物。

【請求項100】

食品の0.0001%から10%までの濃度で野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を含む、食品レプリカ生成物。

【請求項101】

前記野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物が、ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物である、請求項100に記載の食品レプリカ生成物。

10

【請求項102】

前記ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物が、キュウリまたはメロン由来である、請求項101に記載の食品レプリカ生成物。

【請求項103】

前記野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を調理し、または前記食品レプリカ生成物に加える前に別の方法で処理してタンパク質を変性させる、請求項100から102のいずれか一項に記載の食品レプリカ生成物。

【請求項104】

前記野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を、前記食品レプリカ生成物に加える前に約60℃から約100℃の温度に加熱した、請求項103に記載の食品レプリカ生成物。

20

【請求項105】

前記食品が、動物性生成物を含まない、請求項97から104のいずれか一項に記載の食品レプリカ生成物。

【請求項106】

肉の生地、炭水化物系ゲル、非動物脂肪、および結合剤のうちの1種または複数をさらに含む、請求項97から105のいずれか一項に記載の食品レプリカ生成物。

【請求項107】

食肉レプリカである、請求項97から105のいずれか一項に記載の食品レプリカ生成物。

30

【請求項108】

チーズレプリカである、請求項97から105のいずれか一項に記載の食品レプリカ生成物。

【請求項109】

前記チーズレプリカが、ナッツミルク、架橋結合酵素、またはチーズ培養物を含む、請求項108に記載の食品レプリカ生成物。

【請求項110】

(a) 単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、1種または複数の任意選択の矯味剤、および任意選択の非動物脂肪を含む生地；

(b) 任意選択で矯味剤および／または単離された植物タンパク質を含有する非動物脂肪)；ならびに

40

(c) 炭水化物系ゲル、結合剤、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または鉄塩、任意選択の食用の繊維状構成成分、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤

を含む、ひき肉レプリカ。

【請求項111】

前記結合剤が、単離された植物タンパク質である、請求項110に記載のひき肉レプリカ。

【請求項112】

前記単離された植物タンパク質が、RuBisCO、アルブミン、グルテン、コングリ

50

(12)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

シニン、またはそれらの混合物である、請求項110に記載のひき肉レプリカ。

【請求項113】

前記結合剤の変性温度が、約40℃から約80℃の間である、請求項110に記載のひき肉レプリカ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2014年3月31日出願の米国特許出願第61/973,181号明細書、および2014年10月1日出願の米国特許出願第62/058,230号明細書の優先権を主張し、その開示はその全体を参照により組み込まれる。

10

【0002】

本開示は、ひき肉レプリカなどの食肉レプリカ、より具体的には、繊維性、質感の不均一性、牛肉のような風味、およびひき肉の調理中の赤色から褐色への色の変化などの、質感、外観、ならびにひき肉を調理するおよび食べるという感覚的側面を含めた、ひき肉の質感、外観、および感覚的側面を模倣する植物ベースの製品に関する。本開示はまた、チーズまたは食肉レプリカなどの食品または食品レプリカの風味を変更するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

食肉代用組成物は、典型的には押出成形されたダイズ／穀物混合物であるが、これは食肉を調理するおよび食べる体験を再現できない。植物ベースの食肉代用製品に共通する欠点としては、相当する食肉製品よりも質感と食感（mouth feel）が均質であることが挙げられる。さらに、これらの製品の大部分が、人工の風味および芳香が予め取り込まれた状態で事前に調理されて販売されるはずなので、これらの製品は、芳香、風味、ならびに調理中または調理済みの食肉に伴う質感および食感などの他の重要な特徴を再現することができず、さらにこれらに異臭が加わる恐れもある。その結果、これらの製品は、主としてすでに肉食主義に傾倒している限られた消費者層には訴えるものがあるが、肉食が習慣となっているより大型の消費者集団への訴えかけには失敗している。調理中および／または調理後食肉の繊維性、質感、芳香および風味をより良く再現する植物ベースの食肉代用品を改善することは有用であると予想される。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本文書は、繊維性、質感の不均一性、牛肉のようなまたは他の食肉の風味、および異臭のないひき肉の調理中赤色から褐色への色の変化を含めた、ひき肉を模倣することができる植物ベースの製品を製造するための方法および材料に基づいている。例えば、本文書は、これらが、調理中の食肉の挙動および品質、すなわち、引き締まり、シネレシス（水の放出）、噛みごたえ（chew texture）、または食感を再現するためにゲル化するおよび／または変性する、温度に基づいて選択されるタンパク質を含む食肉レプリカを提供する。例えば、食肉レプリカの形態になるよう選択されたタンパク質の変性するおよびゲル化する温度は、食肉中に通常見出されるタンパク質（例えば、アクチンおよびミオシン）の温度に類似し得る。さらに、本明細書で提供される植物ベースの製品は、植物ベースの食肉レプリカが、より自然の風味を持ち、異臭がないように肉のような風味を提供することができる、矯味剤（例えば、調味料、風味付け前駆物質、および／または風味付け化合物）を含むことができる。したがって、本文書はまた、矯味剤などを含有する植物ベースの製品を製造するための方法を提供する。

40

【0005】

一態様では、本文書は、肉の生地約5重量％から約88重量％（例えば、約40重量％から約88重量％、約45重量％から約60重量％、または約15重量％から約55重量％）；炭水化物系ゲル約0重量％から約40重量％（例えば、約1重量％から約30重量

50

(13)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

%、約5重量%から約25重量%、または約15重量%から約25重量%）；脂肪約5重量%から約35重量%（例えば、約10重量%から約15重量%、約12重量%から約18重量%、または約20重量%から約25重量%）；矯味剤約0.00001重量%から約10重量%（例えば、約3重量%から約7重量%、約0.001重量%から約2重量%、または約0.00001重量%から約2重量%）；結合剤約0重量%から約15重量%（例えば、約2重量%から約15重量%または約2重量%から約10重量%）；ならびにヘム含有タンパク質および／または鉄塩約0.01重量%から約4重量%（例えば、約0.05重量%から約1重量%、または約0.5重量%から約2重量%）を含む食肉レプリカ組成物を特徴とする。肉の生地は、矯味剤を含むことができる。脂肪は、矯味剤を含むことができる。肉の生地は、組成物の約45重量%から約60重量%であり得る。炭水化物系ゲルは、組成物の約10重量%から約25重量%であり得る。脂肪は、組成物の約10重量%から約15重量%であり得る。矯味剤は、組成物の約3重量%から約7重量%または約0.001重量%から約2重量%であり得る。矯味剤は、1種もしくは複数のフレーバー前駆物質、調味料、または風味付け化合物を含むことができる。矯味剤は、調味料および1種または複数のフレーバー前駆物質の組合せであり得る。結合剤は、組成物の約2重量%から約10重量%であり得る。結合剤は、それらの組織構造上の特性および／または風味特性を改善する、またはそれらの変性およびゲル化温度を修正するために化学的にまたは酵素的に修飾されている1種または複数のタンパク質を含むことができる。ヘム含有タンパク質は、組成物の約0.01重量%から約2重量%であり得る。組成物は、ヘム含有タンパク質および鉄塩を含むことができる。肉の生地は、単離された植物タンパク質、食用の繊維状構成成分、任意選択の矯味剤、および任意選択の脂肪を含むことができる。結合剤は、コングリニタンタンパク質であり得る。

【0006】

別の態様では、本文書は、肉の生地約5重量%から約80重量%（例えば、約20重量%から約30重量%）；脂肪約5重量%から約35重量%（例えば、約15重量%から約25重量%）；食用の繊維状構成成分約15重量%から約40重量%（例えば、約15重量%から約25重量%）；炭水化物系ゲル約0.1重量%から約18重量%（例えば、約7重量%から約18重量%）；矯味剤約0重量%から約10重量%（例えば、約0重量%から約10重量%）；結合剤約0.5重量%から約15重量%（例えば、約5重量%から約15重量%）；ならびにヘム含有タンパク質および／または鉄塩約0.1重量%から約8重量%（例えば、約2重量%から約8重量%）を含む食肉レプリカ組成物を特徴とする。

【0007】

別の態様では、本文書は、ひき肉レプリカを製造する方法を特徴とする。方法は、（a）生地を150°Fから250°Fまでの温度に加熱するステップであって、生地が、単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、1種または複数の任意選択の矯味剤、および任意選択の脂肪を含む、ステップと；（b）加熱後、生地を脂肪と合わせるステップであって、脂肪が、矯味剤および／または単離された植物タンパク質を任意選択で含有する、ステップと；（c）ステップ（b）からの生地を炭水化物系ゲル、任意選択の食用の繊維状構成成分、任意選択の結合剤、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤を合わせて、ひき肉レプリカを製造するステップとを含むことができる。方法は、炭水化物系ゲル、任意選択の食用の繊維状構成成分、任意選択の結合剤、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ（b）からの生地を粉砕するステップをさらに含むことができる。

【0008】

別の態様では、本文書は、肉の生地に風味付けする方法を特徴とする。方法は、（a）第1の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または第1の鉄塩を1種もしくは複数のフレーバー前駆物質および任意選択の脂肪と合わせるステップと；（b）混合物を加熱して、1種または複数のフレーバー化合物を形成するステップと；（c）単

(14)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、およびステップ (b) からの混合物を含む生地を作製するステップとを含むことができる。方法は、(d) 加熱後、生地を脂肪と合わせるステップであって、脂肪が、任意選択で、矯味剤および/または単離された植物タンパク質を含有する、ステップと; (e) ステップ (d) の生地を、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、第2の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および/または第2の鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせて、ひき肉レプリカを製造するステップとをさらに含むことができる。方法は、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、第2の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および/または第2の鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ (d) からの生地を粉砕するステップをさらに含むことができる。

10

[0009]

別の態様では、本文書は、肉の生地に風味付けする方法であって、(a) 単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、1種または複数の任意選択の矯味剤、および任意選択の脂肪を含む生地を作製するステップと; (b) 脂肪を鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および/または第1の鉄塩、および1種もしくは複数のフレーバー前駆物質と合わせ、混合物を加熱することにより風味を付けた脂肪を作製するステップと; (c) 加熱後、生地を、風味を付けた脂肪と合わせるステップとを含む方法の特徴とする。方法は、ステップ (c) の生地を炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、第2の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および/または第2の鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせて、ひき肉レプリカを製造するステップをさらに含むことができる。方法は、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、第2の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および/または第2の鉄塩、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ (c) の生地を砕くステップをさらに含むことができる。

20

[0010]

本文書はまた、ひき肉レプリカを製造する方法であって、(a) 鉄塩を1種または複数のフレーバー前駆物質および任意選択の脂肪と合わせるステップと; (b) 混合物を加熱して、1種または複数のフレーバー化合物を形成するステップと; (c) 単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、およびステップ (b) からの混合物を含む生地を作製するステップと; (d) 加熱後、生地を脂肪と合わせるステップであり、脂肪が、矯味剤および/または単離された植物タンパク質を任意選択で含有する、ステップと; (e) ステップ (d) の生地を炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、任意選択の鉄塩、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせて、ひき肉レプリカを製造するステップとを含む方法の特徴とする。方法は、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、鉄塩、任意選択の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤と合わせる前に、ステップ (d) からの生地を粉砕するステップをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環は、混合物を加熱する前に、鉄塩、1種または複数のフレーバー前駆物質、および脂肪と合わせることもできる。

30

[0011]

さらに別の態様では、本文書は、ひき肉レプリカを製造する方法を特徴とする。方法は、(a) 単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、1種または複数の任意選択の矯味剤、および任意選択の脂肪を含む生地を作製するステップと; (b) 脂肪を鉄塩および1種または複数のフレーバー前駆物質と合わせ、混合物を加熱することにより風味を付けた脂肪を作製するステップと; (c) 加熱後、生地を風味を付けた脂肪と合わせるステップと; (d) ステップ (c) の生地を炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、鉄塩、任意選択の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環、および1種または複数の任意選択の矯味剤と合わせて、ひき肉レプリカを製造するステップとを含むことができる。方法は、炭水化物系ゲル、任意選択の結合剤、鉄塩、任意選択の鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環、および1種または複数の任意選択の矯味剤と合わせる

40

50

(15)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

前に、ステップ(c)からの生地を砕くステップをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環は、混合物を加熱する前に、脂肪、鉄塩、および1種または複数のフレーバー前駆物質と合わせることができる。

【0012】

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、鉄塩は、グルコン酸鉄、塩化鉄、シュウ酸鉄、硝酸鉄、クエン酸鉄、アスコルビン酸鉄(iron ascorbate)、硫酸第一鉄、ピロリン酸第二鉄、または任意の他の水溶性の塩であり得る。

【0013】

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、ヘム含有タンパク質は、植物由来のヘム含有タンパク質(例えば、レグヘモグロビン)などの非動物ヘム含有タンパク質であり得る。さらに、いくつかの実施形態では、ヘム含有タンパク質は、単離するまたは単離および精製することができる。

10

【0014】

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、1種または複数のフレーバー前駆物質は、糖、糖アルコール、糖酸、糖誘導体、油、遊離脂肪酸、アミノ酸もしくはその誘導体、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ビタミン、酸、ペプチド、リン脂質、タンパク質加水分解物、酵母抽出物、またはそれらの混合物であり得る。例えば、フレーバー前駆物質は、グルコース、フルクトース、リボース、アラビノース、グルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、フルクトース1,6-二リン酸、イノシトール、マルトース、スクロース、マルトデキストリン、グリコーゲン、ヌクレオチドに結合された糖、糖蜜、リン脂質、レシチン、イノシン、イノシン-リン酸(IMP)、グアノシン-リン酸(GMP)、ピラジン、アデノシン-リン酸(AMP)、乳酸、コハク酸、グリコール酸、チアミン、クレアチン、ピロリン酸塩、植物油、藻類油、ヒマワリ油、トウモロコシ油、ダイズ油、ヤシの実の油、パーム核油、ペニバナ油、アマニ油、米糠油、綿実油、オリーブ油、ヒマワリ油、カノーラ油、アマニ油、ヤシ油、マンゴー油、遊離脂肪酸、システイン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、リシン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、バリン、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、グルタミン、グリシン、プロリン、セリン、チロシン、グルタチオン、アミノ酸誘導体、尿素、パントテン酸、オルニチン、ナイアシン、グリセロール、シトルリン、タウリン、ピオチン、ルリジサ油、真菌油(fungal oil)、クロスグリ油、ペタイン、 β カロテン、B-ビタミン、N-アセチルL-システイン、グルタミン酸鉄およびペプトン、またはそれらの混合物からなる群から選択することができる。

20

30

【0015】

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、生地中の単離された植物タンパク質は、コムギグルテン、デヒドリンタンパク質、アルブミン、グロブリン、もしくはゼイン、またはそれらの混合物を含むことができる。

【0016】

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、任意選択の食用の繊維状構成成分は、ニンジン、タケ、エンドウマメ、ブロッコリー、ジャガイモ、サツマイモ、トウモロコシ、全粒粉、アルファルファ、ケール、セロリ、セロリの根、パセリ、キャベツ、ズッキーニ、グリーンビーンズ、インゲンマメ、クロマメ、アズキ、白インゲン、ビート、カリフラワー、ナッツ、リンゴの皮、カラスミギ、コムギ、もしくはオオバコ、またはそれらの混合物由来の植物繊維を含むことができる。

40

【0017】

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、食用の繊維状構成成分は、単離された植物タンパク質の押出成形された混合物を含むことができる。押出成形された混合物は、コムギグルテンおよびダイズタンパク質単離物を含有することができ、場合によっては、矯味剤(例えば、酵母抽出物、タンパク質加水分解物、もしくは油などの調味料;フレーバー化合物;またはフレーバー前駆物質)をさらに含有することができる。いくつかの実施形態では、食用の繊維状構成成分は、溶液紡糸タンパク質繊維(例えば、

50

(16)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

トウモロコシゼイン、エンドウマメプロラミン、カフェリン (kafirin) 、セカリン、ホルディン、アベニン、またはそれらの混合物などのプロラミンを含有する溶液紡糸タンパク質繊維) であり得る。

[0018]

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、脂肪は、非動物脂肪、動物脂肪、または非動物および動物脂肪の混合物であり得る。脂肪は、藻類油、真菌油、トウモロコシ油、オリーブ油、ダイズ油、ラッカセイ油、クルミ油、扁桃油、ゴマ油、綿実油、ナタネ油、カノーラ油、ペニバナ油、ヒマワリ油、アマニ油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、パバス油、シアバター、マンゴーバター、カカオバター、コムギ胚芽油、ルリジサ油、クロスグリ油、シーバックソーン油、マカダミア油、ノコギリヤシ油、共役リノール酸油、アラキドン酸強化油、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 強化油、エイコサペンタエン酸 (EPA) 強化油、パームステアリン酸、シーバックソーンベリー油、マカダミア油、ノコギリヤシ油、もしくは米糠油; またはマーガリンもしくは他の水素化された脂肪であり得る。いくつかの実施形態では、例えば、脂肪は、藻類油である。脂肪は、矯味剤および/または単離された植物タンパク質 (例えば、コングリシニンタンパク質) を含有することができる。

10

[0019]

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、生地は、矯味剤を含むことができる。方法または組成物のいずれかにおいて、生地中の非動物脂肪は、矯味剤を含むことができる。矯味剤は、野菜抽出物、果実抽出物、酸、酸化防止剤、カロテノイド、ラクトン、およびそれらの組合せからなる群から選択することができる。酸化防止剤は、没食子酸エビガロカテキンであり得る。カロテノイドは、ルテイン、 β -カロテン、ゼアキササンチン、trans- β -アポ-8'-カロテナル、リコペン、またはカンタキサンチンであり得る。野菜抽出物は、キュウリまたはトマト由来であり得る。果実抽出物は、メロンまたはパイナップル由来であり得る。

20

[0020]

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、炭水化物系ゲルは、融解温度が約45℃から約85℃の間であり得る。炭水化物系ゲルは、寒天、ペクチン、カラギーナン、コンニャク、アルギン酸塩、化学的に修飾されたアガロース、またはそれらの混合物を含むことができる。

30

[0021]

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、ひき肉レプリカは、結合剤を含有することができる。結合剤は、単離された植物タンパク質 (例えば、RubisCO、アルブミン、グルテン、コングリシニン、またはそれらの混合物) であり得る。結合剤の変性温度は、約40℃から約80℃の間であり得る。結合剤は、調理後140°Fから190°Fまでで固くなる炭水化物系ゲルであり得る。炭水化物系ゲルは、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、グアーガム、イナゴマメガム、キサンタンガム、またはそれらの混合物を含有することができる。結合剤は、卵アルブミンまたはコラーゲンであり得る。

40

[0022]

本明細書に記載される方法または組成物のいずれかにおいて、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環は、ヘム部分、またはポルフィリン、ポルフィリノーゲン、コリン、コリノイド、クロリン、バクテリオクロロフィル、コルフィン (corphin) 、クロロフィリン、バクテリオクロリン、または鉄イオンと錯化されたイソバクテリオクロリン部分であり得る。ヘム部分は、ヘム含有タンパク質 (例えば、非共生ヘモグロビン、ヘルズゲート (Hell's gate) グロビンI、フラボヘムタンパク質 (flavohemoprotein) 、レグヘモグロビン、ヘム依存性ペルオキシダーゼ、チトクロムc ペルオキシダーゼ、または哺乳動物のミオグロビン) であり得る。いくつかの実施形態では、ヘム含有タンパク質は、レグヘモグロビンであり得る。レグヘモグロビンは、ダイズ、エンドウマメ、またはササゲ由来であり得る。

50

(17)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【0023】

別の態様では、本文書は、食肉の風味を増すまたは食品中の植物材料からの異臭をマスキングする方法を特徴とする。方法は、食品の 10^{-3} から 10^{-11} の濃度で1種または複数のラクトンに食品を加えるステップであって、ラクトンが、テトラヒドロ-6-メチル-2H-ピラン-2-オン、 δ -オクタラクトン、5-エチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、ブチロラクトン、ジヒドロ-5-ペンチル-2(3H)-フラノン、ジヒドロ-3-メチレン-2, 5-フランジオン、1-ペントイルラクトン、テトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、6-ヘプチルテトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、 γ -オクタラクトン、5-ヒドロキシメチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-2(5H)-フラノン、5-アセチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、trans-3-メチル-4-オクタノリド2(5H)-フラノン、3-(1, 1-ジメチルエチル)-2, 5-ウランジオン、3, 4-ジヒドロキシ-5-メチル-ジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、 δ -テトラデカラクトン、およびジヒドロ-4-ヒドロキシ-2(3H)-フラノンからなる群から選択される、ステップを含む。いくつかの実施形態では、ラクトンは、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、ブチロラクトン、 γ -オクタラクトン、および δ -テトラデカラクトンであり得る。食品は、食肉レプリカであり得る。食肉レプリカは、動物性生成物を含まないこともある。

10

【0024】

本文書はまた、食肉の風味を増すまたは食品中の植物材料からの異臭をマスキングする方法であって、食品の0.00001%から0.1%の間の濃度で1種または複数のカロテノイドを食品に加えるステップであり、カロテノイドが、 β -カロテン、ゼアキサンチン、ルテイン、trans- β -アポ-8'-カロテナル、リコペン、カンタキサンチン、およびそれらの組合せからなる群から選択される、ステップを含む方法の特徴とする。食品は、食肉レプリカであり得る。食肉レプリカは、動物性生成物を含まないこともある。

20

【0025】

別の実施形態では、本文書は、食肉レプリカの食肉の風味を増す方法の特徴とする。方法は、食肉レプリカに、食肉レプリカの0.00001%から10%までの濃度で野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を、食肉レプリカに加えるステップを含むことができる。野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物は、ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物(例えば、キュウリもしくはメロン由来の液汁、ピューレ、または抽出物)であり得る。方法の野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物は、調理することができ、食肉レプリカに加える前に別の方法で処理してタンパク質を変性させることもできる。食肉レプリカは、動物性生成物を含まないこともある。

30

【0026】

別の態様では、本文書は、食品の 10^{-3} から 10^{-11} の濃度でヘム含有タンパク質および1種もしくは複数のラクトンを含む食品または食品レプリカ生成物であって、1種または複数のラクトンが、テトラヒドロ-6-メチル-2H-ピラン-2-オン、 δ -オクタラクトン、5-エチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、ブチロラクトン、ジヒドロ-5-ペンチル-2(3H)-フラノン、ジヒドロ-3-メチレン-2, 5-フランジオン、1-ペントイルラクトン、テトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、6-ヘプチルテトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、 γ -オクタラクトン、5-ヒドロキシメチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-2(5H)-フラノン、5-アセチルジヒドロ-2(3H)-フラノン、trans-3-メチル-4-オクタノリド2(5H)-フラノン、3-(1, 1-ジメチルエチル)-2, 5-ウランジオン、3, 4-ジヒドロキシ-5-メチル-ジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラノン、 δ -テトラデカラクトン、およびジヒドロ-4-ヒドロキシ-2(3H)-フラノンからなる群から選択される、食品または食品レプリカ生成物を特徴とする。例えば、1種または複数のラクトンは、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル

40

50

(18)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

ー3(2H)ーフラノン、プチロラクトン、γーオクタラクトン、およびδーテトラデカラクトンであり得る。食品または食品レプリカ生成物は、食肉レプリカであり得る。食肉レプリカは、動物性生成物を含まないこともある。

[0027]

本文書はまた、食品の0.00001%から0.1%の間の濃度でヘム含有タンパク質および1種もしくは複数のカロテノイドを含有する食品または食品レプリカ生成物であって、1種または複数のカロテノイドが、βーカロテン、ゼアキサンチン、ルテイン、trans-β-アポ-8'ーカロテナル、リコペン、カンタキサンチン、およびそれらの組合せからなる群から選択される、食品または食品レプリカ生成物を特徴とする。食品または食品レプリカ生成物は、食肉レプリカであり得る。食肉レプリカは、動物性生成物を含

10

[0028]

別の態様では、本文書は、食品の0.0001%から10%の濃度で、(a)ヘム含有タンパク質、および(b)野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を含有する食品または食品レプリカ生成物を特徴とする。野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物は、ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物であり得る。ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物は、キュウリまたはメロン由来であり得る。野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、もしくは果実抽出物は、調理されていてもよく、または食品レプリカ生成物に加えられる前に別の方法で処理してタンパク質を変性させていてもよい。例えば、野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物は、食品レプリカ生成物に加えられる前に約60℃から約100℃の温度に加熱されていてもよい。食品は、動物性生成物を含まないこともある。

20

[0029]

別の態様では、本文書は、食品の 10^{-3} から 10^{-11} の濃度で1種または複数のラクトン含有する食品レプリカ生成物であって、1種または複数のラクトンが、テトラヒドロ-6-メチル-2H-ピラン-2-オン、δ-オクタラクトン、5-エチルジヒドロ-2(3H)ーフラノン、プチロラクトン、ジヒドロ-5-ペンチル-2(3H)ーフラノン、ジヒドロ-3-メチレン-2,5-フランジオン、1-ペンチルラクトン、テトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、6-ヘプチルテトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン、γ-オクタラクトン、5-ヒドロキシメチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-2(5H)ーフラノン、5-アセチルジヒドロ-2(3H)ーフラノン、trans-3-メチル-4-オクタノリド2(5H)ーフラノン、3-(1,1-ジメチルエチル)-2,5-ウランジオン、3,4-ジヒドロキシ-5-メチルジヒドロフラン-2-オン、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)ーフラノン、δ-テトラデカラクトン、およびジヒドロ-4-ヒドロキシ-2(3H)ーフラノンからなる群から選択される、食品レプリカ生成物を特徴とする。1種または複数のラクトンは、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)ーフラノン、プチロラクトン、γ-オクタラクトン、およびδ-テトラデカラクトンであり得る。

30

[0030]

さらに別の態様では、本文書は、食品の0.00001%から0.1%の間の濃度で1種または複数のカロテノイドを含有する食品レプリカ生成物であって、1種または複数のカロテノイドが、β-カロテン、ゼアキサンチン、ルテイン、trans-β-アポ-8'ーカロテナル、リコペン、カンタキサンチン、およびそれらの組合せからなる群から選択される、食品レプリカ生成物を特徴とする。

40

[0031]

本文書はまた、食品の0.0001%から10%の濃度で野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物を含有する食品レプリカ生成物を特徴とする。野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物は、ウリ属(Cucumis)液汁、ピューレ、または抽出物(例えば、ウリ属(Cucum

50

(19)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

is) 液汁、ピューレ、またはキュウリもしくはメロン由来の抽出物)であり得る。野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物は、調理されていてもよく、食品レプリカ生成物に加えられる前に別の方法で処理してタンパク質を変性させていてもよい。例えば、野菜ジュース、野菜ピューレ、野菜抽出物、果汁、果実ピューレ、または果実抽出物は、食品レプリカ生成物に加えられる前に約60℃から約100℃の温度に加熱されていてもよい。

[0032]

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される食品レプリカ生成物は、動物性生成物、コムグルテン、ダイズタンパク質、および／または豆腐を含まないこともある。

[0033]

本明細書で提供される食品レプリカ生成物のいずれかは、肉の生地、炭水化物系ゲル、非動物脂肪、および結合剤のうち1種または複数を含むことができる。

[0034]

本明細書で提供される食品レプリカ生成物のいずれかは、食肉レプリカであり得る。食肉レプリカを製造するためのさらなる材料および方法は、例えば、米国特許出願公開第2014/0193547号明細書、およびPCT特許公報国際公開第2014/110532号パンフレットおよび国際公開第2014/110539号パンフレットにおいて見出すことができ、そのそれぞれは、その全体を参照により本明細書に組み込まれる。

[0035]

本明細書で提供される食品レプリカ生成物のいずれかは、チーズレプリカであり得る。チーズレプリカは、ナッツミルク(nut milk)、架橋結合酵素、またはチーズ培養物を含むことができる。チーズレプリカを製造するためのさらなる材料および方法は、例えば、米国特許出願公開第2014/0127358号明細書、およびPCT特許公報国際公開第2014/110540号パンフレットにおいて見出すことができ、その両方は、その全体を参照により本明細書に組み込まれる。

[0036]

さらに別の態様では、本文書は、(a)単離された植物タンパク質、任意選択の食用の繊維状構成成分、1種または複数の任意選択の矯味剤、および任意選択の脂肪を含む生地；(b)脂肪、矯味剤を任意選択で含む脂肪および／または単離された植物タンパク質；ならびに(c)炭水化物系ゲル、結合剤、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または鉄塩、任意選択の食用の繊維状構成成分、および1種もしくは複数の任意選択の矯味剤を含むひき肉レプリカを特徴とする。結合剤は、単離された植物タンパク質(例えば、RuBisCO、アルブミン、グルテン、コングリニン、またはそれらの混合物)であり得る。結合剤の変性温度は、約40℃から約80℃の間であり得る。

[0037]

別段定義されない限り、本明細書に用いられるすべての技術用語および科学用語は、本発明に関係する当業者によって普通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載したものと類似のまたはそれに相当する方法および材料を、本発明を実行するために用いることができるが、適当な方法および材料は、後述される。本明細書で言及されたすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体を参照により組み込まれる。矛盾が生じる場合には、定義を含めて本明細書に従うものとする。さらに、材料、方法、および例は、例示的なものにすぎず、限定するものではない。

[0038]

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、以下の添付図面および説明に記載される。本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかである。特許請求の範囲における用語「含む(comprising)」は、特許法における標準的な慣行に従って「本質的にからなる」によってまたは「からなる」で置き換えることができる。

[発明を実施するための形態]

10

20

30

40

50

(20)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【0039】

一般に、本文書は、ひき肉レプリカ（例えば、牛のひき肉、鶏のひき肉、七面鳥のひき肉、子羊のひき肉、または豚のひき肉）、ならびに肉および魚の切り身のレプリカを含めた食肉レプリカを生成するための方法および材料を提供する。概して、本文書は、任意選択の食用の繊維状構成成分を含む食肉レプリカ生地（本明細書において「肉の生地」と称する）を調製するステップと、肉の生地を矯味剤および／または単離された植物タンパク質を任意選択で含むことができる脂肪（動物系脂肪が用いられ得ることに留意するべきであるが、通常、非動物系脂肪）と合わせるステップと、炭水化物系ゲル、任意選択の食用の繊維状構成成分、結合剤、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環および／または鉄塩、および1種もしくは複数の矯味剤を加えてレプリカを製造するステップとを含むひき肉レプリカを製造するための方法を提供する。肉の生地を脂肪と合わせた後、混合物は、さらなる成分を加える前により細かく砕くことができる。

10

【0040】

肉の生地は、食用の繊維状構成成分を取り込んで、ひき肉（例えば、牛のひき肉）の不均一性および質感に類似している食肉レプリカにおいて組織構造上の不均一性および繊維性を達成するのに役立てることができる。矯味剤を食肉レプリカの複数の構成成分（例えば、肉の生地、食用の繊維状構成成分、非動物系脂肪、または組み合わせて作られたレプリカ（assembled replica）のうちの2つ以上）に取り込むことにより、ひき肉の感覚的な特性を模倣するのに役立つ。いくつかの実施形態では、矯味剤は、食肉レプリカの3種の構成成分に取り込まれる。いくつかの実施形態では、矯味剤は、食肉レプリカの4種の構成成分に取り込まれる。

20

【0041】

本明細書に記載した通り、矯味剤は、フレーバー前駆物質、フレーバー前駆物質を鉄と反応させることにより生成されたフレーバー化合物、または抽出物（例えば、麦芽抽出物、酵母抽出物、キュウリ抽出物もしくはメロン抽出物などの野菜または果実抽出物、またはペプトン）などの調味料または植物性タンパク質加水分解物、ダイズタンパク質加水分解物、酵母タンパク質加水分解物、藻類タンパク質加水分解物、もしくは食肉タンパク質加水分解物などのタンパク質加水分解物または天然もしくは合成のフレーバー化合物であり得る。フレーバー前駆物質は、例えば、鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環または鉄塩中の鉄と、互いに反応させてもよく、加熱後、調味料と反応させてもよい。したがって、本明細書に記載した食肉レプリカにおいて、予め調理された、すなわち、反応させた、風味構成成分、レプリカの調理中（例えば、鉄塩および／もしくは鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環とまたは互いに）反応させることができる調理されていないフレーバー前駆物質、または調味料もしくは反応を必要とせずに風味を導入するフレーバー化合物の組合せは、食肉レプリカに取り込まれて、調理するおよび調理済みのひき肉を食べる感覚的な体験を再現することができる。ひき肉生成物の風味および／または芳香プロファイルは、他の因子の中でもとりわけ、フレーバー前駆物質のタイプおよび濃度、反応のpH、調理の長さ、鉄複合体のタイプおよび量（例えば、ヘム含有タンパク質、または非ペプチド性ポリマーもしくは巨大分子に結合したヘムなどのヘム補因子）、反応の温度、ならびに生成物中の水分活性の量によって調節することができる。

30

40

【0042】

鉄イオンと錯化された高度に共役した複素環式環は、鉄複合体と本明細書で称される。かかる鉄複合体には、ヘム部分または鉄イオンと錯化された他の高度に共役した複素環式環が含まれる。「ヘム」とは、ポルフィリン環の中心で鉄（ Fe^{2+} または Fe^{3+} ）に結合される補欠分子族を意味する。したがって、鉄複合体は、ヘム部分、またはポルフィリン、ポルフィリノーゲン、コリン、コリノイド、クロリン、バクテリオクロロフィル、コルフィン（corphin）、クロロフィリン、バクテリオクロリン、または鉄イオンと錯化されたイソバクテリオクロリン部分であり得る。ヘム部分は、ヘム含有タンパク質などのヘム補因子；非ペプチド性ポリマーまたはリポソーム、ポリエチレングリコール、炭水化物、多糖類、もしくはシクロデキストリンなどの他の巨大分子に結合されるヘム部分であ

50

(21)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

り得る。

【0043】

いくつかの実施形態では、鉄複合体は、単離され精製されるヘム含有タンパク質である。本明細書で使用される場合、タンパク質またはタンパク質画分に関する用語「単離され精製された」は、タンパク質またはタンパク質画分が、原料物質の他の構成成分の乾燥重量により少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%）を含まないように、タンパク質またはタンパク質画分が、原料物質（例えば、他の動物、植物、真菌、藻類、または細菌タンパク質）の他の構成成分から分離されていることを示す。

【0044】

本明細書で使用される場合、「濃縮された」タンパク質またはタンパク質画分組成物は、原料物質に対してそのタンパク質またはタンパク質画分中で少なくとも2倍（例えば、少なくとも3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍）濃縮される。

【0045】

用語「ヘム含有タンパク質」は、「ヘム含有ポリペプチド」または「ヘムタンパク質」または「ヘムポリペプチド」と同義的に用いることができ、ヘム部分に共有結合または非共有結合することができる任意のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ヘム含有ポリペプチドは、グロビンであり、グロビンフォールドを含むことができ、これは一連の7個から9個の α ヘリックスを含む。グロビンタイプタンパク質は、任意のクラス（例えば、クラスI、クラスII、またはクラスIII）のものであり得、いくつかの実施形態では、酸素を輸送または貯蔵することができる。例えば、ヘム含有タンパク質は、ヘモグロビンまたはレグヘモグロビンの非共生タイプであり得る。ヘム含有ポリペプチドは、モノマー、すなわち、単一のポリペプチド鎖であってもよく、二量体、三量体、四量体、および/または高次のオリゴマーであってもよい。ヘム含有タンパク質の酸化した Fe^{2+} 状態の寿命は、ミオグロビンの寿命と類似してもよく、ヘムタンパク質含有消耗品が製造される、貯蔵される、取り扱われるまたは消費のために調製される条件下で、それを10%、20%、30%、50%、100%またはそれ以上まで超えてもよい。ヘム含有タンパク質の酸化されない Fe^{2+} 状態の寿命は、ミオグロビンの寿命と類似してもよく、ヘムタンパク質含有消耗品が、製造される、貯蔵される、取り扱われるまたは消費のために調製される条件下で、それを10%、20%、30%、50%、100%またはそれ以上まで超えてもよい。

【0046】

ヘム含有ポリペプチドの非限定的な例には、アンドログロビン、サイトグロビン、グロビンE、グロビンX、グロビンY、ヘモグロビン、ミオグロビン、エリトロクルオリン、 β ヘモグロビン、 α ヘモグロビン、プロトグロビン、シアノグロビン、サイトグロビン、ヒストグロビン、ニューログロビン、クロロクルオリン、切断型ヘモグロビン（例えば、HbNまたはHbO）、切断型2/2グロビン、ヘモグロビン3（例えば、Glb3）、チトクロム、またはペルオキシダーゼを含むことができる。

【0047】

本明細書に記載したひき肉レプリカにおいて用いることができるヘム含有タンパク質は、哺乳動物（例えば、雌ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、雄ウシ、またはウサギなどの家畜）、鳥類、植物、藻類、真菌類（例えば、酵母または糸状菌）、繊毛虫類、または細菌由来であり得る。例えば、ヘム含有タンパク質は、家畜（例えば、雌ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、魚、雄ウシ、またはウサギ）などの哺乳動物または七面鳥もしくはニワトリなどの鳥類由来であり得る。ヘム含有タンパク質は、ニコチアナ・タバカム（*Nicotiana tabacum*）またはニコチアナ・シルベストリス（*Nicotiana glauca*）（タバコ）；ゼア・マユス（*Zea mays*）（トウモロコシ）、シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）、グリシン・マックス（*Glycine max*）（ダイズ）、ヒヨコマメ（*Cicer arietinum*）（ガルバンゾまたはヒヨコマメ）、エンドウ（*Pisum sativum*）（エンドウマメ）もしくはスナップエンドウなどのビスム・サティヴム（*Pisum sativum*）（エンドウマメ）品種などのマメ科植物、グリーンピース

(22)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

、クロマメ、白インゲンマメ、ノーザンビーンズ (northern beans)、もしくはピントビーン (pinto bean) などのインゲンマメのファセオルス・ブルガリス (*Phaseolus vulgaris*) 品種、ヴィグナ・ウングイクラタ (*Vigna unguiculata*) 品種 (ササゲ)、ヴィグナ・ラジアタ (*Vigna radiata*) (リョクトウ)、ルピナス・アルブス (*Lupinus albus*) (ルピナス)、またはメジカゴ・サチヴァ (*Medicago sativa*) (アルファルファ)；ブラシカ・ナパス (*Brassica napus*) (カノーラ)；トリチカム (*Triticum*) 種 (コムギ粒、およびスペルトコムギを含めたコムギ)；ゴシピウム・ヒルスツム (*Cossypium hirsutum*) (ワタ)；オリザ・サティヴァ (*Oryza sativa*) (イネ)；ジザニア (*Zizania*) 種 (ワイルドライス)；ヘリアンサス・アンヌウス (*Helianthus annuus*) (ヒマワリ)；ベータ・ブルガリス (*Beta vulgaris*) (サトウダイコン)；ペニセツム・グラウカム (*Penisetum glaucum*) (パールミレット)；ケノボジウム (*Chenopodium*) 種 (キノア)；セサマム (*Sesamum*) 種 (ゴマ)；リナム・ウシタチシマム (*Linum usitatissimum*) (フラックス)；あるいはホルデウム・ウルガレ (*Hordeum vulgare*) (オオムギ) などの植物由来であり得る。ヘム含有タンパク質は、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、マグナポルテ・オリザエ (*Magnaporthe oryzae*)、フサリウム・グラミネアルム (*Fusarium graminearum*)、コウジカビ (*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、ミセリオブテラ・テルモフィル (*Myceliophthora thermophila*)、クルイベラミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、またはフサリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) などの真菌類から単離することができる。ヘム含有タンパク質は、細菌、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、巨大菌 (*Bacillus megaterium*)、シネコシステリス (*Synechocystis*) 種、アクイフェクス・エオリクス (*Aquifex aeolicus*)、メチルアシジフィルム・インフェルノラム (*Methylobacillus thermophilus*)、またはテルモフィラス (*Thermophilus*) 種などの好熱性細菌から単離することができる。多数のヘム含有タンパク質の配列および構造は、公知である。例えば、Reedy, et al., *Nucleic Acids Research*, 2008, Vol. 36, Database issue D307-D313およびワールドワイドウェブ (<http://hemeprotein.info/heme.php>) で利用可能なヘムタンパク質データベースを参照のこと。

[0 0 4 8]

いくつかの実施形態では、非共生ヘモグロビン、任意の植物由来であり得る。いくつかの実施形態では、非共生ヘモグロビンは、ダイズ、発芽ダイズ、アルファルファ、ゴールデンフラックス (golden flax)、クロマメ、ブラックアイドピー (black eyed pea)、ノーザンビーン、タバコ、エンドウマメ、ガルバンゾ、リョクトウ、ササゲ、ピントビーン、サヤエンドウ、キノア、ゴマ、ヒマワリ、コムギ粒、スペルト、オオムギ、ワイルドライス、およびイネからなる群から選択される植物由来であり得る。

[0 0 4 9]

いくつかの実施形態では、レグヘモグロビンは、ダイズ、エンドウマメ、またはササゲレグヘモグロビンであり得る。

[0 0 5 0]

いくつかの実施形態では、単離された植物タンパク質が用いられる。本明細書で用いられる場合、タンパク質またはタンパク質画分 (例えば、7 S 画分) に関する用語「単離された」は、タンパク質またはタンパク質画分が、原料物質の他の構成成分の乾燥重量により少なくとも 2 % (例えば、少なくとも 5 %、10 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、または 99 %) を含まないように、タンパク質またはタンパク質画分が、原料物質 (例えば、他の動物、植物、真菌、藻類、または細菌タンパク質) の他の構成成分から分離されていることを示す。したがって、いくつかの実施形態では、鉄複合体は、単離されるヘム含有タンパク質 (例えば、植物ヘム含有タンパク質) であり得る。タンパク質は、これらの分子量に基づき、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、膜による限外ろ過、または密度遠心分離により分離することができる。いくつかの実施形態では

(23)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

タンパク質は、これらの表面電荷に基づき、例えば、等電沈澱、陰イオン交換クロマトグラフィー、または陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離することができる。タンパク質はまた、これらの溶解性に基づき、例えば、硫酸アンモニウム沈澱、等電沈澱、界面活性剤、洗剤または溶媒抽出により分離することができる。タンパク質はまた、例えば、疎水性相互作用クロマトグラフィー、反応染料、またはヒドロキシアパタイトを用いて、別の分子へのそれらの親和性により、分離することができる。アフィニティークロマトグラフィーはまた、ヘム含有タンパク質に対する特異的結合親和性を有する抗体、His-タグ付き組換えタンパク質のためのニッケルニトリロ酢酸 (NTA)、糖タンパク質において糖部分に結合するためのレクチン、またはタンパク質を特異的に結合させる他の分子を用いることを含むことができる。

10

[0051]

実施例2は、植物（例えば、ハウレンソウまたはアルファルファ）から RuBisCO を単離するための方法を記載している。抽出プロセスは、メタ重亜硫酸塩（約2% w/v またはそれ以上の溶液）などの還元剤を初回の抽出緩衝液に加え、プロセスを通して嫌気条件を維持することにより、および/または Superfloc 781G, Magnafloc LT 7989 (BASF)、または Tramfloc 863A などの0.05~1% v/v 陽イオン性凝集剤を、抽出緩衝液に加えることにより、さらに改善することができる。pH7、0の精密ろ過後、かかる方法からの再懸濁させたタンパク質ベレットは、それでもなお機能し、同じ色を呈し、同じ変性特性を有する。

20

[0052]

実施例4は、ダイズなどの植物からコングリシニン（7S画分と称することもできる）を単離するための方法を記載している。7Sの他の供給源には、それだけには限らないが、エンドウマメ、ヒヨコマメ、リョクトウ、インゲンマメ、ソラマメ、ササゲ、松の実、イネ、トウモロコシ、およびゴマなどの種子が含まれる。可溶性タンパク質は、脱脂ダイズ粉から抽出し、次いで、混合物を、（例えば、pH4.5まで）酸性にしてタンパク質を沈澱させることができる。コングリシニンは、再溶解させ、例えば、限外ろ過を用いて濃縮することができる。

[0053]

いくつかの実施形態では、単離されたタンパク質は、脱色される。例えば、RuBisCO濃縮物は、活性炭で充てんされたカラムに通すことにより脱色することができる（pH7~9）。着色料はカラムに結合することができ、一方、RuBisCOは、ろ液中で単離することができる。あるいは、RuBisCO濃縮物は、カラムまたはバッチモードに充てんされたFPX66 (Dow Chemicals) 樹脂で溶液をインキュベートすることにより脱色することができる。スラリーは、30分間インキュベートされ、次いで、液体は、樹脂から分離される。着色料は、樹脂に結合することができ、RuBisCOは、カラム通過画分中で収集することができる。

30

[0054]

いくつかの実施形態では、単離されたタンパク質は、実施例3に記載されている通り精製し、脱色することができる。2014年10月1日出願の米国特許出願第62/058,211号「Methods for Extracting and Purifying Native Proteins」も参照のこと。

40

[0055]

いくつかの実施形態では、脱色された単離された植物タンパク質は、脱色せずに単離された植物タンパク質を含む、対応する食肉レプリカと比較して、食肉レプリカの赤色に対する有効期間の安定性を高めることができる。いくつかの実施形態では、脱色されたタンパク質は、対応する脱色せずに単離された植物タンパク質を含む食肉レプリカにおいて観察されたものと比較して、食肉レプリカの風味プロファイルを改善させる。

[0056]

ヘム含有または他のタンパク質はまた、ポリペプチド発現技法（例えば、細菌細胞、昆虫細胞、酵母などの真菌細胞、タバコ、ダイズ、もしくはアラビドプシス (Arabidopsis)）などの植物細胞、または哺乳動物細胞を用いた異種の発現技法を用いて組み換えによ

50

(24)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

って生成することができる。例えば、レグヘモグロビンは、実施例1に記載されている通り大腸菌 (*E. coli*) またはピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) において組み換えによって生成することができる。場合によっては、標準的なポリペプチド合成技法 (例えば、液相ポリペプチド合成技法または固相ポリペプチド合成技法) を用いて、ヘム含有タンパク質を合成により生成することができる。場合によっては、*in vitro* 転写-翻訳技法を用いて、ヘム含有タンパク質を生成することができる。

【0057】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される食肉レプリカは、非動物供給源、例えば、植物、真菌、または微生物ベースの供給源に由来する成分から実質的にまたは完全に構成される。いくつかの実施形態では、食肉レプリカは、1種または複数の動物ベースの生成物を含むことができる。例えば、食肉レプリカは、植物ベースおよび動物ベースの供給源の組合せから製造することができる。

10

【0058】

食肉レプリカの製造

肉の生地は、単離された植物タンパク質および任意選択の食用の繊維状構成成分、任意選択の矯味剤、および任意選択の非動物脂肪を混合し、水またはブロスなどの水性構成成分を、混合物に加え、手動もしくは機械的に練り合わせてまたは別の方法で混合し、生地を形成することにより調製することができる。植物タンパク質および繊維状構成成分の混合物に加える前に、水性構成成分は加熱することができる。肉の生地が形成された後、肉の生地を、150°F から250°F (例えば、160°F から240°F、170°F から230°F、180°F から220°F、または190°F から212°F) までの温度に加熱する (例えば、蒸すまたはゆでる)。例えば、肉の生地は、炊飯器、スチームキャビネット、またはトンネルスチーマーに置くことにより蒸すことができる。肉の生地は、乾熱を加える、例えば、パン焼き器もしくはオーブンに置くことにより、または熱湯もしくはブロスに浸漬することにより加熱することができる。ブロスでゆでると、有益な風味および異臭マスキング剤を生地に吸収させることができるため、肉の生地の風味を向上することができる。質感特性はまた、調理方法の選択により調節することもできる。

20

【0059】

本明細書で使用される場合、用語「単離された植物タンパク質」は、タンパク質またはタンパク質画分が、原料物質の他の構成成分の乾燥重量により少なくとも2% (例えば、少なくとも5%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%) を含まないように、植物タンパク質 (例えば、ヘム含有タンパク質、コムギグルテン、デヒドリンタンパク質、アルブミン、グロブリン、コングリシニン、グリシニン、もしくはゼイン、またはそれらの混合物) または植物タンパク質画分 (例えば、7S画分) は、原料物質 (例えば、他の動物、植物、真菌、藻類、または細菌タンパク質) の他の構成成分から分離されていることを示す。例えば、コムギグルテンは、単独でまたは1種もしくは複数の他のタンパク質 (例えば、デヒドリン) と組み合わせて用いることができる。デヒドリンは、ひき肉レプリカにおいて多汁性および質感を高めるために特に有用であり得る。いくつかの実施形態では、食肉レプリカは、グルテンを含まないように配合することができ、例えば、トウモロコシデンプン、タピオカ粉、米粉、およびグアーガムのブレンドは、肉の生地中のコムギグルテンと置換することができる。

30

40

【0060】

食用の繊維状構成成分は、植物繊維、単離された植物タンパク質 (例えば、コムギグルテンまたは他の単離された植物タンパク質、例えば、グルテリン、アルブミン、レグミン、ビシリン (*vicillin*)、コンビシリン、グリシニンおよびダイズ、エンドウマメ、レンズマメなどを含めた任意の種子またはマメ由来などのタンパク質分離物など) の押出成形された混合物、または溶液紡糸タンパク質繊維であり得る。いくつかの実施形態では、溶液紡糸タンパク質繊維は、プロラミン溶液紡糸タンパク質繊維である。プロラミンは、任意の植物供給源 (例えば、トウモロコシまたはエンドウマメ) 由来であり得、ゼイン、プ

50

(25)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

ロラミン、カフェリン (kafirin)、セカリン、ホルデイン、またはアベニンを含むことができる。ひき肉生成物 (例えば、肉のパテ) の質感は、繊維性および引張強さなどの食用の繊維状構成成分の特性に依存する。本明細書に記載した通り、単離された植物タンパク質または溶液紡糸タンパク質繊維の押出成形された混合物は、結合組織レプリカと称することができ、結合組織レプリカの繊維性および引張強さは、温度、処理量、およびダイ寸法などの押出パラメーターの共変動により制御することができる。例えば、より低い押出温度、中間/低処理量およびより小型のダイの組合せは、引張強さが低い繊維性のより高い組織の生成に好都合に働き、より高い押出温度、より高い処理量およびより大型のダイは、引張強さが非常に高い繊維性の低い組織レプリカの生成に好都合に働く。

【0061】

10

結合組織レプリカの繊維性および引張強さはまた、押出混合物の組成を変化させることにより調節することもできる。例えば、単離された植物タンパク質 (例えば、コングリシニンなどのダイズタンパク質) とコムギグルテンとの比を 3 : 1 w/w に上げ、同時に押出混合物の含水量を 50 % まで減らすことにより、繊維よりが薄く引張強さがより大きい結合組織レプリカを製造することができる。

【0062】

肉の生地質感はまた、酒石酸水素カリウムを調製に加えることにより改変することもできる。例えば、酒石酸水素カリウムを含有する肉の生地調製は、成形しやすいように、牛のひき肉と類似する挽いた後の形状因子により、より粘着力があってもよい。酒石酸水素カリウムは、0.05 % から 2.5 % の間 (例えば、0.5 %) で加えることができる。

20

【0063】

ひき肉レプリカの外観は、食用の繊維状構成成分を、所望のサイズおよび形状の断片に細長く切ることにより調節することができる。いくつかの実施形態では、食用の繊維状構成成分は、市販のシュレッダー、例えば、艶消し刃が付属した *Cuisineart* チョッパー/グラインダー、UM12、Comitrol シュレッダー (*Urschel Laboratories, Indiana*) または類似のシュレッダーを用いて細長く切ることができる。繊維のサイズは、シュレッダーのタイプ、刃の選択、およびスクリーンのタイプによりならびに細長く切る時間を調整することにより、肉の繊維の外観を模倣するために調整することができる。

30

【0064】

他の実施形態では、食用の繊維状構成成分は、携帯型のカーダー (carder) または梳綿機、例えば、Pat Green カーダーを用いて梳くことにより繊維に分離することができる。サイズを変えるおよびカーディングドラムのピンの間隔を開けることにより、繊維のサイズを調整して、肉の繊維の外観を模倣することができる。

【0065】

他の実施形態では、食用の繊維状構成成分は、ローラー (例えば、KITCHENAID (登録商標) パスタアタッチメント) に通してそれを押し、その後、UM12 マシンで、例えば、艶消し刃を用いて、静かに細長く切ることにより繊維に分離することができる。ローラーの番号およびローラー間隔を変えることにより、繊維のサイズを調整して、肉の繊維の外観を模倣することができる。

40

【0066】

結合組織レプリカの繊維性、引張強さ、および外観は、目的に合わせて、特定のひき肉生成物 (例えば、牛のひき肉または挽くことができる牛肉の異なる切り身) を模倣して作ることができる。

【0067】

いくつかの実施形態では、食用の繊維状構成成分には、可溶性または不溶性植物繊維が含まれる。例えば、ニンジン、タケ、エンドウマメ、ブロッコリー、ジャガイモ、サツマイモ、トウモロコシ、全粒粉、アルファルファ、ケール、セロリ、セロリの根、パセリ、キャベツ、ズッキーニ、グリーンビーンズ、インゲンマメ、クロマメ、アズキ、白インゲ

50

(26)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

ン、ビート、カリフラワー、ナッツ、リンゴの皮、カラスミギ、コムギ、もしくはオオバコ、またはそれらの混合物由来の植物繊維は、食用の繊維状構成成分として用いることができる。

[0068]

いくつかの実施形態では、食用の繊維状構成成分には、押出プロセス中に異臭の発生を防止する化合物が含まれ得る。押出混合物が押出プロセス中に曝露される温度が高く水分が少ない条件により、穀物のような (grainy)、木のような、ナッツのような、ゴムのようなおよび他の異臭を伴う化合物を形成する。酸化防止剤またはカロテノイドなどのある特定のクラスの化合物を含むことによって、異臭化合物の形成を低下させるのに役立てることができる。例えば、押出成形された混合物は、穀物のような異臭の発生を防止するためにカンタキサンチンを含むことができる。カロテノイドは、食用の繊維状構成成分の約0重量%から約1重量%であり得る。

10

[0069]

いくつかの実施形態では、肉の生地は、単離された植物タンパク質と食用の繊維状構成成分のおおよそ等しい割合を用いて形成される。比は、最終生成物の特性を目的に合わせて作るのに望ましいように変えることができることが理解されよう。

[0070]

いくつかの実施形態では、ブロス、例えば、風味を付けたブロスは、肉の生地に用いることができる。例えば、肉の生地は、単離された植物タンパク質とブロスのおおよそ等しい割合を用いて形成することができる。

20

[0071]

いくつかの実施形態では、風味ブロスには、肉の生地に加える前にフレーバー前駆物質を予備反応させる (調理する) ことにより創出された風味混合物が含まれる。フレーバー前駆物質分子または組成物は、精製された形態で予備反応混合物に加えられてもよいし、および/または例えばヤシ油、システイン、グルコース、リボース、チアミン、藻類油、乳酸および/または酵母抽出物などの特定のフレーバー前駆物質または組成物のうち1種または複数を含むかおよび/またはそれらが富化された未調理の肉の生地中の成分に由来するものでもよい。得られた風味および/または芳香プロファイルは、他の因子の中でもとりわけ、フレーバー前駆物質のタイプおよび濃度、反応のpH、調理の長さ、調理の温度、鉄複合体 (例えば、タンパク質を含有する鉄、ヘム含有タンパク質などのヘム補因子、または鉄クロロフィリン) または鉄塩 (グルコン酸鉄) のタイプおよび量、反応の温度、ならびに生成物中の水分活性の量により調節することができる。風味ブロスは、非動物性生成物 (例えば、植物) を含有してもよく、風味ブロスは、動物および非動物ベースの前駆物質 (例えば、ラード) の組合せであってもよい。風味ブロスは、牛肉、ベーコン、豚肉、仔ヒツジの肉、ヤギ肉、七面鳥の肉、鴨肉、鹿肉、ヤクの肉、バイソンの肉、鶏肉の味およびにおいまたは望ましい食肉の風味になる消費できる食品に風味をもたらし得る。

30

[0072]

いくつかの実施形態では、風味を付けたブロスは、鉄複合体 (例えば、単離されたヘム含有タンパク質) および/または鉄塩 (例えば、グルコン酸鉄、塩化鉄、シュウ酸塩、硝酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、硫酸第一鉄、ピロリン酸第二鉄、または任意の他の水溶性の塩) を、1種もしくは複数のフレーバー前駆物質および脂肪 (例えば、非動物系脂肪) と組み合わせることにより、ならびに混合物を加熱して、1種または複数のフレーバー化合物を含有する風味を付けたブロスを得ることにより作製することができる。適当なフレーバー前駆物質には、糖、糖アルコール、糖誘導体、遊離脂肪酸、トリグリセリド、 α -ヒドロキシ酸、ジカルボン酸、アミノ酸およびその誘導体、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ビタミン、ペプチド、リン脂質、レシチン、ピラジン、クレアチン、ピロリン酸塩および有機分子が含まれる。例えば、糖、糖アルコール、糖酸、および糖誘導体は、グルコース、フルクトース、リボース、スクロース、アラビノース、グルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、フルクトース1,6-二リン酸、イノシトール、マル

40

50

(27)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

トース、マンノース、グリセロール、糖蜜、マルトデキストリン、グリコーゲン、ガラクトース、ラクトース、リビトール、グルコン酸、グルクロン酸、アミロース、アミロペクチン、またはキシロースを含むことができる。遊離脂肪酸は、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α リノレン酸、 γ リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、エイコサペンタエン酸、ペトロセリン酸またはエルカ酸を含むことができる。トリグリセリドは、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 α リノレン酸、 γ リノレン酸、アラキジン酸、アラキドン酸、ベヘン酸、エイコサペンタエン酸、ペトロセリン酸またはエルカ酸の脂肪酸エステルを含むことができる。アミノ酸およびその誘導体は、システイン、シスチン、システインスルホキシド、アリシン、セレノシステイン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、リシン、フェニルアラニン、トレオニン、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、バリン、アルギニン、ヒスチジン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、グルタミン、グリシン、プロリン、セリン、チロシン、オルニチン、カルノシン、シトルリン、カルニチン、オルニチン、テアニン、およびタウリンを含むことができる。リン脂質は、脂肪酸、グリセロールおよび極性基を含む、複数の両親媒性分子を含むことができる。脂肪酸は、オレイン酸、パルミトレイン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、カプロン酸、カプリン酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、ウンデカン酸、リノール酸、20:1 エイコサン酸、アラキドン酸、エイコサペンタン酸、ドコサヘキサン酸、18:2 共役リノール酸、共役オレイン酸、またはオレイン酸、パルミトレイン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、カプロン酸、カプリン酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、ウンデカン酸、リノール酸、20:1 エイコサン酸、アラキドン酸、エイコサペンタン酸、ドコサヘキサン酸、18:2 共役リノール酸もしくは共役オレイン酸のエステル、またはオレイン酸、パルミトレイン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、カプロン酸、カプリン酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、ウンデカン酸、リノール酸、20:1 エイコサン酸、アラキドン酸、エイコサペンタン酸、ドコサヘキサン酸、18:2 共役リノール酸もしくは共役オレイン酸のグリセロールエステル、またはオレイン酸、パルミトレイン酸、パルミチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸、ミリストレイン酸、カプロン酸、カプリン酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、ウンデカン酸、リノール酸、20:1 エイコサン酸、アラキドン酸、エイコサペンタン酸、ドコサヘキサン酸、18:2 共役リノール酸、もしくは共役オレイン酸のトリグリセリド誘導体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、極性基は、コリン、エタノールアミン、セリン、リン酸塩、グリセロール-3-リン酸、イノシトールおよびイノシトールリン酸からなる群から選択される。

[0073]

ヌクレオシドおよびヌクレオチドは、イノシン、イノシン-リン酸 (IMP)、グアノシン、グアノシン-リン酸 (GMP)、アデノシン、またはアデノシン-リン酸 (AMP) を含むことができる。ビタミンは、チアミン、ビタミンB2、ビタミンB9、ビタミンC、4-アミノ安息香酸、コリン、ナイアシン、ビタミンB8、ビタミンB12、ピオチン、ベタイン、ビタミンA、 β カロテン、ビタミンD、ビタミンB6、またはビタミンEを含むことができる。酸、例えば、酢酸、コーヒー酸、グリコール酸、アスパラギン酸、パントテン酸、乳酸もしくはグリコール酸などの α -ヒドロキシ酸、クエン酸などのトリカルボン酸、またはコハク酸もしくは酒石酸などのジカルボン酸。ペプチドおよびタンパク質加水分解物は、グルタチオン、植物性タンパク質加水分解物、ダイズタンパク質加水分解物、コムギタンパク質加水分解物、トウモロコシタンパク質加水分解物、酵母タンパク質加水分解物、藻類タンパク質加水分解物、および食肉タンパク質加水分解物を含むことができる。抽出物は、麦芽抽出物、酵母抽出物、またはペプトンを含むことができる。

[0074]

例えば、いくつかの実施形態では、プロスは、鉄複合体 (例えば、レグヘモグロビンな

どの単離され精製されたヘム含有タンパク質)および/または鉄塩(例えば、グルコン酸鉄、塩化鉄、シュウ酸塩、硝酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、硫酸第一鉄、ピロリン酸第二鉄、または任意の他の水溶性の塩)を1種または複数のフレーバー前駆物質(例えば、表2または表13に示される前駆物質のミックス)および脂肪(例えば、非動物系脂肪)と合わせることで、ならびに混合物を加熱して1種または複数のフレーバー化合物を含有する風味を付けたブロスを得ることにより作製することができる。非動物脂肪は、植物由来油、藻類油、または細菌もしくは真菌類由来の油を含むことができる。適当な植物由来油には、ヤシ油、マンゴー油、ヒマワリ油、綿実油、ペニバナ油、米糠油、カカオバター、パーム核油、ヤシの実の油、パーム油、ダイズ油、ナタネ油、カノーラ油、トウモロコシ油、ゴマ油、クルミ油、扁桃油、アマニ油、ホホバ油、ヒマシ油、グレープシード油、ラッカセイ油、オリーブ油、ルリジサ油、藻類油、真菌油、クロスグリ油、パパス油、シアバター、マンゴーバター、コムギ胚芽油、クロスグリ油、シーバックソーン油、マカダミア油、ノコギリヤシ油、共役リノール酸油、アラキドン酸強化油、ドコサヘキサエン酸(DHA)強化油、エイコサペンタエン酸(EPA)強化油、またはマーガリンが含まれる。油は、水素化されていても(例えば、水素化された植物油)、水素化されていなくてもよい。ステアリン(例えば、パームステアリン)またはオレインなどの油画分を用いることもできる。例えば、非動物脂肪は、ヤシ油でも、ヤシ油およびステアリンの組合せでもよい。いくつかの実施形態では、脂肪は、非動物(例えば、植物)生成物を含有してもよく、脂肪は、動物および非動物ベースの前駆物質(例えば、ラード)の組合せ、またはもっぱら動物系脂肪でもよい。

[0075]

いくつかの実施形態では、風味を付けたブロスは、水、ヤシ油などの非動物系脂肪、および酸(例えば、乳酸)などの矯味剤、カロテノイド(例えば、ルテイン)、または酸化防止剤を合わせることで、ならびに混合物を加熱してブロスを作製することにより作製することができる。

[0076]

前述した肉の生地を加熱後、矯味剤を任意選択で含有する非動物脂肪は、肉の生地と合わせることができる。通常、肉の生地は、肉の生地を非動物脂肪と合わせる前に(例えば、室温まで)放冷する。非動物脂肪は、非動物脂肪を、鉄複合体または鉄塩および(前述の)1種もしくは複数のフレーバー前駆物質と合わせることで、ならびに混合物を加熱してフレーバー化合物を生成することにより風味付けすることができる。非動物系脂肪が固化することができるように加熱された混合物は、冷却することができる。1種または複数の追加の非動物脂肪(例えば、藻類油)、1種もしくは複数のマスキング剤(例えば、ラクトン、例えばブチロラクトン、 δ -トリデカラクトン、 γ -デカラクトン、 δ -ドデカラクトン、 γ -オクタラクトン、ジヒドロ-5-メチル2(3H)-フラン、4-ヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-フラン、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラン、 δ -テトラデカラクトン、またはそれらの組合せ)、または1種もしくは複数の風味付け化合物(例えば、アセトイン、カロテノイド、酸化防止剤、野菜ジュースもしくは果汁、ピューレ、または抽出物)は、混合物が固化する前に加えて非動物脂肪の風味を改善することができる。いくつかの実施形態では、5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フラン、ブチロラクトン、 γ -オクタラクトン、および/または δ -テトラデカラクトンの組合せは、マスキング剤として用いることができる。(例えば、 10^{-3} から 10^{-10} の濃度で)1種または複数のラクトンを加えると、その結果、穀物、卵、苦味、厚紙、肝臓、またはマッシュルームのように感じる異臭が減り、クリームのような、バターのような、カラメルになった、脂っこい、新鮮な、およびフルーツのようななどの所望の風味を増すことができる。例えば、2種、3種、または4種のラクトンの組合せを用いて、苦味などの特性をマスキングすることができる。さらに、ラクトンはまた、 10^{-3} から 10^{-11} の間の濃度で用いて、クリームのような、バターのような、カラメルになった、脂っこい、新鮮な、フルーツのような、獣脂および肉のような香気などの所望の風味を、食肉レプリカに与えることができる。した

10

20

30

40

50

(29)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

がって、ラクトンは、マスキング剤または矯味剤として用いることができる。ラクトンは、それだけには限らないが、牛乳、チーズ、およびヨーグルトなどの乳製品のレプリカ、またはプロテインバーおよびタンパク質粉末などのタンパク質サプリメントを含めた、他の製品においてマスキング剤として作用することができる。ラクトンの組合せは、食肉レプリカなどの食品において肉の風味（例えば、脂っこい獣脂および甘い芳香）を創出するまたは非牛肉食品に牛肉の風味を与える上で重要な独特な風味プロファイルを提供することができる。食肉レプリカは、ラクトンが生成物に加えられる場合、全体的な嗜好および肉のような特質（*meatiness*）の評価を改善する。いくつかの実施形態では、例えば、ブチロラクトン、 δ -テトラデカラクトン、および5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3-(2H)-フランソンの組合せは、肉のような風味を提供するために用いることができる。ラクトンは、植物油に加えて、より動物脂肪に近い脂肪の味を作り、口全体に広がる感じ（*perception of mouth coating*）を増すことができる。ラクトンはまた、糖含有量を変えずに生成物の甘味を増すために加えることもできる。ラクトンおよびカロテノイドなどの作用物質が、食肉またはチーズレプリカを含めた、食品レプリカ（例えば、植物ベースの食品レプリカ）に風味を付けるために用いることができ、食肉およびチーズなどの食品の風味を変更するために（例えば、食肉またはチーズ風味を増すために）用いることもできることに留意すべきである。

[0077]

いくつかの実施形態では、 β -カロテン、ゼアキサンチン、ルテイン、*trans*- β -アポ-8'-カロテナル、リコペン、およびカンタキサンチンなどのカロテノイドを用いて、所望の風味の創出を制御し、植物ベースの食品（例えば、本明細書に記載した食肉レプリカ）などの食品を創出することによって望まれない風味を防止することができる。カロテノイドは、乳製品のレプリカを含めた、他の食品における植物の異臭を減らすために用いることができる。カロテノイドの各タイプは、所望の風味を創出するおよび異臭を制御する異なる特性を有することが判明した。実施例18および26を参照のこと。カロテノイドは、0.00001%から0.1%の間で加えられる場合、食肉レプリカを改善する甘いおよび脂のような香気を増すことができる。

[0078]

カロテノイドは、風味エマルジョンまたは風味ブロスにカロテノイドを加えることにより食肉レプリカに加えることができる。カロテノイドは、調理前後に加えることができる。カロテノイドは、0.00001%から0.1%の間で加えることができる。カロテノイドを調理前に加える場合、カロテノイドは、食肉レプリカに加える前に風味を創出する反応風味混合物において基質として作用することができる。カロテノイドはまた、酸化防止剤として作用することによって生成される他の風味についての経路を変える。カロテノイドを加えると、風味エマルジョンは、風味の質を改善することができ、（ろうのような、魚のような、絵の具のような）質の悪い酸化臭が減少し、（土のような、マッシュルーム、穀物のような、豆のような）他の質の悪い香気が減少し、甘い、脂っこい、肉のような、および新鮮な風味が増す。各カロテノイドは、得られた異なる風味プロファイルを有する。例えば、調理前に風味エマルジョンにリコペンを加えると、淡泊な風味になり、一方、 β -カロテンは、非常に味が良く、対照と比べて脂っこいおよび肉のような香気加わる。調理前にカロテノイドを加える風味プロファイルは、風味プロファイルに大きな効果を有する。調理後にカロテノイドを加える場合、特に貯蔵で生じる異臭を減じることに関して、さらに有益な効果であり得る。風味エマルジョンまたは風味ブロス中の他のフレーバー前駆物質分子は、カロテノイドの効果に影響を与える。得られた風味および/または芳香プロファイルは、他の因子の中でもとりわけ、フレーバー前駆物質のタイプおよび濃度、反応のpH、調理の長さ、調理の温度、鉄複合体（例えば、ヘム含有タンパク質などのヘム補因子、または鉄クロロフィリン）または鉄塩（グルコン酸鉄）のタイプおよび量、反応の温度、ならびに生成物中の水分活性の量により調節することができ、そのすべては、カロテノイドがどのように風味プロファイルを変えるかによって変わる。特定の例には、特に油供給源中に金属がある場合、カロテノイドがどのように植物油において生成

10

20

30

40

50

(30)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

されるフレーバー化合物の創出を減らすまたは防止することができるかが含まれる。リノール酸、γリノール酸、DHA、およびEPAのようなポリ不飽和脂肪酸を有する脂肪および油を含む風味エマルジョンに加える場合、カロテノイドは、腐った魚のような、絵の具のような、および野菜風味の香気を抑制し、肉のような特質と甘い香気の生成を促進することができる。

【0079】

特にカロテノイドは、穀物のような、木のような、土のような、マッシュルーム、植物臭および酸化臭を減らすことができる。カロテノイドは、植物ベースの製品の異なるパートに加えて、異なる影響を与えることができる。カロテノイドは、コムギグルテンを含めた小麦粉において生成された異臭化合物の創出を減らすまたは防止することができる。例えば、ルテインは、生肉の生地に加え、全体的な風味の強度を低下させ、調理された肉の生地および最終生成物において穀物のような、木のような香気、および酸化臭を減らすことができる。風味の特徴のこれらの変化は、いくつかの場合においてSPMEガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)によって示されている通り、特定のフレーバー化合物の減少によって裏付けられ、他の場合では、フレーバー化合物の変化はないが、穀物の特徴の減少が観察され、起こっている化学反応を変化させることによりおよび特定の風味をマスキングすることによりカロテノイドが作用することが示唆されている。さらに、肉の生地に加えられたカロテノイドによって、試料がカロテノイドを含まない対照よりも脂っこく甘くなったということが記載されている。ルテインによって減少した主な化合物には、(Z)-2-ノネナール、(E,E)-2,4-ノナジエナール、および1-ペンテン-3-オールを含めたアルコールおよびアルデヒドのような酸化したフレーバー化合物が含まれ;さらに、硫黄化合物は、メタンチオール、2-アセチルチアゾール、および硫化ジメチルを含めたルテインで減少し;これらの化合物の多くはまた、ガスクロマトグラフィー嗅覚検査(GCO)により訓練を受けたフレーバーサイエンティストにより穀物のような香気および酸化臭と記載された。

【0080】

没食子酸エピガロカテキン(EGCG)などの酸化防止剤はまた、植物ベースの製品(例えば、食肉レプリカ)などの食品の異臭を減らすために用いることができる。緑茶抽出物において見出される(および緑茶抽出物から精製することができる)、EGCGなどの酸化防止剤は、0.0001%から0.1%で加えることができる。EGCGを含めた酸化防止剤はまた、肉の生地に加え、調理された肉の生地および生地から創出された消費者製品の両方の風味プロファイルを変化させることができる。EGCGは、生地の風味全体を低下させ、特に、訓練を受けたフレーバーサイエンティストによって記載され、GCMSを用いて確認された通り、穀物のような、および酸化した風味のような異臭を減少させる。

【0081】

野菜または果物(液汁、ピューレ、または抽出物)は、食肉レプリカに加えて、知覚される食肉の風味(例えば、肉のような特質)および生成物の好ましさを高める、ならびに知覚される脂肪質および口全体に広がる脂肪を増すことができる。さらに、これらにより、食肉レプリカの知覚される多汁性を増やして、製品を食べる場合、食味検査員は、唾液分泌が多くなり得る。野菜または果物が増強する食肉の風味のタイプは、タイプおよび加工に依存している。例には、調理で強化されるキュウリおよびメロンに由来する追加の獣脂の脂のような香気;ハネデューに由来する追加の甘い芳香、黒こげの肉(char meat)および香ばしい香気;パイナップルに由来する追加の甘い芳香および新鮮さならびにトマトに由来する追加の香ばしい、きつね色に焼けた食肉の風味が含まれる。

【0082】

野菜または果物は、加圧、搾汁、流動抽出物、加圧蒸留、溶媒によって補助された風味抽出、または他の方法から創出された、液汁、ピューレ、抽出物の形態で食肉の再現物に加えることができる。野菜または果物は、調理されていなくても処理されていなくてもよい、または調理されていてもよく、別の方法で処理して(例えば、低温殺菌によってまた

(31)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

は酵素不活性化によって)、タンパク質(例えば、リポキシゲナーゼ)を変性されていてもよい。風味プロファイル、すなわち、果物または野菜の青っぽいもしくは野菜のような香気を含めた、肉のような特質および腐った香気の量の両方は、調理または他の処理に応じて、ならびに調理または他の処理の量およびプロセスに応じて変化し得る。果物および野菜の抽出物、ピューレ、および液汁の風味の多くは、酵素によって創出される。これらの酵素は、望まれるもしくは望まれない風味を創出することができ、所望の風味は、抽出物および液汁の適用に依存している。果物または野菜の適切なタイプの選択および処理によって、食肉レプリカについて適切な風味の創出が可能になる。さらに、加工中、異臭を引き起こす恐れがある酵素を非活性化することが望ましいこともある。食肉の再現のために加えられる場合、抽出物中で異臭を生成し得る特定の酵素は、リポキシゲナーゼであり、リポキシゲナーゼは、果物および野菜の皮に特に活性がある。皮の破損によって、リポキシゲナーゼ活性を高めることができる。したがって、果物または野菜の皮を切る前の酵素不活性化は、異臭を減らすのに役立ち得る。果物および野菜抽出物、ピューレ、または液汁の生成において、酵素は、60℃を超える加熱、高圧低温殺菌、または酵素阻害により非活性化することができる。いくつかの実施形態では、例えば、リポキシゲナーゼは、没食子酸エピガロカテキン(EGCG)などの阻害物質の添加により、または他の酸化還元活性のある酵素の添加により阻害することができる。いくつかの実施形態では、丸ごとの果物または野菜は、皮を貫通させる前に調理しても処理してもよく、調理は、生成物を切った後行ってもよい。調理または他の処理は、短時間(分)でも長時間(時間)でもよい。調理が用いられる場合、温度は、室温から圧力下120℃を超えるまでわずかに上昇させることができる。例えば、果物または野菜は、60~100℃(例えば、70~80℃、80~90℃、または90~100℃)の温度で調理することができる。プロセスは、ブレンディング、伸長、およびまたは加圧を含むことができる。種子は、場合によっては除去することができるまたは種子は残すことができる。

[0083]

例えば、食肉レプリカに加えられたキュウリピューレは、追加の脂っこい獣脂の風味を提供することができるが、青野菜の香気をもたらす恐れがある。果物が最初に調理される場合、青っぽい、および強いキュウリの香気の原因である2-ノネナールおよび2,6-ノナジエナールを含むがそれだけに限らない数種の化合物が減少する。さらに、バターのような、脂っこい、および獣脂の風味が増し、これらは、SPME-GC-MSによって示されている通りラクトンの濃度の増加から起こり得る。トマトを調理することによっても、青っぽいおよびトマト風味を低減しながら、肉のような香気を強める。

[0084]

果物または野菜風味の液体は、生成物の異なる構成成分に加えることができ、例えば、調理前に肉の生地に加える、調理後または調理前に脂肪エマルジョンに加える、ゲル状の基質に加える、完全に組み合わせで作られた生成物に加える、または未反応の風味プロセスに加えることができる。抽出物は、抽出物の場合の0.0001%からピューレおよび液汁の場合の最大10%まで加えることができる。

[0085]

乳酸などの酸は、肉の生地に加えて、pHを低下させ、調理および加工で起こる風味反応を変化させることができる。牛肉は、pHがおおよそ5.5であり; pH5.5の肉の生地を達成させるために、追加の酸性度が必要とされる。乳酸は、牛肉において示されるものように望ましい新鮮な、酸味をもたらす。

[0086]

他の実施形態では、非動物脂肪は、単離された植物タンパク質を含むことができる。例えば、エマルションは、植物由来の油、藻類油、または細菌もしくは真菌類由来の油および任意選択のフレーバー剤を、単離された植物タンパク質(例えば、ダイズ由来のコングリシニン)の水溶液と合わせることで、次いで、例えば、高速ホモジナイザーを用いて混合物をホモジナイズすることおよび短期間、例えば、90℃で5分間これを加熱することにより作製することができる。融解温度、硬度、脆性、色などのエマルションの物理的特性

(32)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

は、異なるタイプの単離されたタンパク質を用いること、タンパク質濃度、油対水の比、ホモジナイゼーションの速度、加熱温度および加熱時間を変化させることにより調節することができる。例えば、油対水の比が高くタンパク質濃度が低いエマルションは、より壊れやすく、融解し易いが、油対水の比がより低くタンパク質濃度がより高いエマルションは、より軟らかく、壊れにくく、より粘着性があり、より高い温度で融解する。

【0087】

いくつかの実施形態では、エマルションは、植物由来の油、藻類油、または細菌もしくは真菌類由来の油および任意選択の矯味剤を、 $pH > 10$ （例えば、 $pH 12$ ）を有する単離されたタンパク質（例えば、ダイズコングリシニン）の例えば、水酸化ナトリウムを含む水溶液と合わせることでより作製することができる。本混合物を振とう、攪拌または

10

【0088】

他の実施形態では、エマルションは、植物由来の油、藻類油、または細菌もしくは真菌類由来の油、塩および矯味剤（例えば、フレーバー前駆物質）の水溶液、ならびに乳化剤を混合することにより作製することができる。例えば、モノ/ジグリセリド、レシチン、リン脂質、Tween界面活性剤、ステアロイル乳酸ナトリウム、またはDATEM（モノグリセリドのジアセチル酒石酸エステル）は、乳化剤として用いることができる。これらのエマルションの物理的特性は、乳化剤タイプおよび濃度、ホモジナイゼーションの速度および油対水の比を変化させることにより制御することができる。

20

【0089】

固化された、任意選択で風味を注入したおよび/またはタンパク質を含有する脂肪は、肉の生地と合わせることができ、肉の生地および非動物脂肪の混合物は、例えば、みじん切りにする、挽く、切断する、ミンチにする、剪断する、または引きちぎることにより、より細かく砕くことができる。いくつかの実施形態では、剪断は、加熱しながら生地に適用することができ、その結果、生地が固まり、最終的に、調理プロセス中粉碎される。したがって、粉碎するための別のステップは必要ないはずである。

30

【0090】

炭水化物系ゲルおよび任意選択の結合剤は、生地-脂肪混合物に加えることができる。炭水化物系ゲルはまた、食肉レプリカの質感を生じるおよびべとべとせずに最終生成物に多汁性をもたらすために有用である。通常、融解温度が約 45°C から約 85°C の間である炭水化物系ゲルが用いられる。適当な炭水化物系ゲルの非限定的な例には、寒天、ペクチン、カラギーナン、（グルコマンナンとしても公知の）コンニャク、アルギン酸塩、化学修飾されたアガロース、またはそれらの混合物が含まれる。

【0091】

結合剤は、単離された植物タンパク質でも炭水化物系ゲルでもよい。適当な植物タンパク質の非限定的な例には、RuBisCO、アルブミン、グルテン、グリシニン、コングリシニン、レグミン、グロブリン、ビシリン、コンアルブミン、グリアジン、グルテリン、グルテニン、ホルデイン、プロラミン、ファゼオリン、プロテインプラスト、セカリン、コムギ連（triticeae）グルテン、ゼイン、オレオシン、カロレオシン（caloleosin）、ステロレオシン（steroleosin）、またはそれらの混合物（例えば、アルブミン画分）が含まれる。植物タンパク質は、ダイズ、エンドウマメまたはレンズマメを含めた、任意の供給源から得ることができる。いくつかの実施形態では、有用な結合剤は、非植物ベースの供給源から得ることができる。例えば、卵アルブミンまたはコラーゲンは、いくつかの実施形態において結合剤として用いることができる。

40

【0092】

結合剤がタンパク質である場合、タンパク質の変性温度が炭水化物系ゲルの融解温度よ

50

(33)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

り低い場合有用である。例えば、適当なタンパク質結合剤（例えば、RuBisCO、アルブミン、ダイズコングリニン、もしくはグルテン、またはそれらの混合物）の変性温度は、約40℃から約80℃の間であり得る。これによって、タンパク質結合剤が変性した後に炭水化物系ゲルが融解することが可能になり、一緒になって食肉レプリカが結合され、より良い質感がもたらされ、食肉レプリカが形成される。

【0093】

いくつかの実施形態では、結合剤として用いられるタンパク質は、化学的にまたは酵素的に修飾されて、これらの組織構造上の特性および／または風味特性を改善することができる。例えば、タンパク質を、パepsinなどの食品用酵素を用いて部分的にタンパク分解して、ゲル化および調理中に、より優れた水放出プロファイルをもたらすことができる。いくつかの実施形態では、結合剤として用いられるタンパク質は、化学的にまたは酵素的に修飾されてタンパク質の変性およびゲル化温度を変更し、例えば、特定のゲル化温度（例えば、ミオシンを模倣するためには52℃またはアクチンを模倣するためには68℃）に達してもよい。いくつかの例では、プロテアーゼなどのタンパク質は、精製されたタンパク質画分に存在し得る苦味を減らすために用いることができる。

【0094】

いくつかの実施形態では、結合剤は、炭水化物系ゲルである。例えば、140°Fから190°F（例えば、150°Fから180°F）まで調理後固くなる炭水化物系ゲル。炭水化物系ゲルの非限定的な例には、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどの改質されたデンプン、グアーガム、イナゴマメガム、キサンタンガム、またはそれらの混合物が含まれる。

【0095】

さらに、鉄-複合体および／または鉄塩および矯味剤は、食肉レプリカに加えることができる。鉄-複合体および／または鉄塩は、肉の生地、結合組織レプリカ、または非動物系脂肪に風味を付けるために用いられる鉄-複合体および／または鉄塩と同一でも異なっている。調理後、食肉レプリカ、鉄-複合体および／または鉄塩ならびにフレーバー前駆物質が反応し、フレーバー化合物を生成することができるよう、矯味剤は、フレーバー前駆物質または（前述の通り）フレーバー前駆物質の混合物であり得る。矯味剤はまた、酵母抽出物、加水分解されたタンパク質、またはフレーバー化合物などの調味料であり得る。フレーバー化合物には、例えば、フェニル酢酸、(E,E)-2,4-ノナジエナール、水溶性樹脂タマネギ、油溶性タマネギ、p-クレゾール、酢酸アセトニル、4-ヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-フラノン、(E,E)-2,4-オクタジエナール、2-メチル-1-ブタンチオール、2-メチル-3-フリルテトラスルフィド、2-メルカプトプロピオン酸エチル、2-メルカプト-3-ブタノール（異性体の混合物）、n-デカン-d 22、油溶性ニンニク、スルフロール、酢酸スルフリル、メルカプト-3-ブタノール、スピロミート（spiroheat）、1-ペンテン-3-オン、2-メチル-3-フランチオール、2-メチル-3-テトラヒドロフランチオール、オレイン酸、ジプロピルトリスルフィド、ジフルフリルジスルフィド、メチルシクロペンテノン、3-メチルチオヘキサナール、酪酸、ブチロラクトン、5-メチル-2(3H)-フラノン、フラネオール、1-(1H-ピロール-2-イル)-エタノン、ヘキサン酸、およびそれらの組合せを含むことができる。追加のフレーバー化合物は、Sigma Aldrich (St. Louis, MO)、Penta Manufacturing Co. (Fairfield, NJ)、Advanced Biotech (Totowa, NJ)、Firmenich (Meyrin, Switzerland)、Givaudan (Vernier, Switzerland)、International Flavors and Fragrances (New York, NY)、およびWild Flavors (Erlanger, KY)などの会社から市販品として購入することができる。

【0096】

いくつかの実施形態では、シーズニング剤、例えば、食用塩（例えば、塩化ナトリウム

(34)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

または塩化カリウム)、ニンニク、またはハーブ(例えば、ローズマリー、タイム、バジル、セージ、またはミント)、乳化剤(例えば、レシチン)、追加の繊維(例えば、ゼインまたはイヌリン)、鉱物(例えば、ヨウ素、亜鉛、および/またはカルシウム)、肉の保存期間延長剤(meat shelf life extender)(例えば、一酸化炭素、亜硝酸塩、メタ重亜硫酸ナトリウム、ボンバル(Bombal)、ビタミンE、ローズマリー抽出物、緑茶抽出物、カテキンおよび他の酸化防止剤)は、食肉レプリカに取り込むことができる。

【0097】

本明細書に記載した食肉レプリカはまた、ウコンもしくはビート液汁などの天然着色剤、またはアゾ染料、トリフェニルメタン、キサントゲン、キニン、インジゴイド、二酸化チタン、赤色3号、赤色40号、青色1号、もしくは黄色5号などの人工着色剤、または天然および/もしくは人工着色剤の任意の組合せを含むこともできる。

10

【0098】

本明細書に記載したレプリカのいずれかは、所望の使用に成形する、例えば、パテ、ローフ、チャブ(chubs)、ミートボール、またはナゲットに形成する、ひき肉が用いられる食品の任意のタイプにおいて、例えば、タコスの具(taco filling)として、またはキャセロール、ソース、トッピング、スープ、シチュー、ミートボール、またはミートローフにおいて用いることができる。いくつかの実施形態では、食肉レプリカは、例えば、ミートボールまたはナゲットに形成し、次いで、利便性をよくするためにパン粉、コメ、または小麦粉(例えば、カラスミギ粉もしくはココナッツ粉)でコーティングすることができる。

20

【0099】

食肉レプリカ

本明細書に記載した食肉レプリカは、食肉レプリカ生地約5重量%から約88重量%(例えば、約10重量%から約40重量%、約25重量%から約35重量%、約40重量%から約88重量%、または45重量%から約60重量%)、炭水化物系ゲル約0重量%から約40重量%(例えば、約15重量%から約25重量%)、非動物脂肪約3重量%から約35重量%(例えば、約10重量%から約15重量%)、矯味剤約0.00001重量%から約10重量%、結合剤約0重量%から約15重量%(例えば、約2重量%から約15重量%または約2重量%から約10重量%)、ならびにヘム含有タンパク質および/または鉄塩などの鉄複合体約0.01重量%から約4重量%(例えば、約0.05重量%から約1重量%、または約0.2重量%から約2重量%)を含むことができる。矯味剤の量は、矯味剤のタイプに応じて変わり得る。いくつかの実施形態では、矯味剤は、食肉レプリカの約0.5%から約7%であり得る。例えば、フレーバー前駆物質の混合物などの矯味剤は、食肉レプリカの約0.5%から約7%(例えば、約1%から約3%;約3%から約6%;約4%から約7%)であり得る。いくつかの実施形態では、風味付け化合物などの矯味剤は、食肉レプリカの約0.00001%から約2%であり得る。

30

【0100】

本明細書に記載した通り、構成成分の1種もしくは複数、2種以上、3種以上、または4種以上は、矯味剤を含むことができる。例えば、肉の生地は、矯味剤(例えば、鉄複合体または鉄塩を1種もしくは複数のフレーバー前駆物質と合わせ加熱することにより生成された風味付け化合物)を含むことができる、または食用の繊維状構成成分中の酵母抽出物などの調味料を含むことができる。非動物脂肪はまた、矯味剤(例えば、鉄複合体または鉄塩を1種もしくは複数のフレーバー前駆物質と合わせ加熱することにより生成された風味付け化合物)を含むことができる。レプリカはまた、レプリカを調理する際に反応して、レプリカを調理する感覚的な体験を強化することができる、鉄複合体または鉄塩および1種もしくは複数のフレーバー前駆物質を含むことができる。さらに、レプリカは、調味料または風味付け化合物を含むことができる。

40

【0101】

いくつかの実施形態では、構成成分を、所望の粒度で生成させ、次いで、5分間から24時間(例えば、10分間から2時間、1から4時間、4から8時間、6から12時間、

50

(35)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

または12から24時間)一緒に圧縮して、構成成分を食肉レプリカに付着させる。次いで、食肉レプリカを挽いて、ひき肉の特質を再現することができる。食肉レプリカを、任意の所望の形態に圧縮して、例えば、ステーキ、ステーキロイン、チョップ、またはヒレ肉の形状および密度を再現することができる。食肉レプリカはまた、ソーセージなどの加工肉にさらに加工することができる。

【0102】

本発明は、以下の実施例にさらに記載されており、これは、特許請求の範囲に記載されている本発明の範囲を限定しない。

【実施例】

【実施例1】

【0103】

レグヘモグロビンの単離および精製

ダイズ (*Glycine max*) レグヘモグロビンC2 (UniProt KB P02236) をN-末端His6エピトープタグおよびTEV切断部位でコードする核酸を、pJespresso401ベクター (DNA2.0) にクローン化し、大腸菌 (*E. coli*) BL21に形質転換した。形質転換細胞を、カナマイシン、0.1 mM塩化第二鉄および5-アミノレブリン酸10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を補充した流加発酵 (fed-batch fermentation) により増殖させた。0.3 mMイソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) によって発現を誘導し、細胞を30°Cで24時間増殖させた。細胞を遠心分離によって濃縮し、20 mMリン酸カリウム (pH7.8)、100 mM NaClに再懸濁させた。高圧ホモジナイゼーションによって細胞を溶解させ、遠心分離および精密ろ過によって澄ませた。レグヘモグロビンを、亜鉛によって荷電された (zinc-charged) IMACセファロース高速流動樹脂 (GE Healthcare) を用いて可溶性ライセートから精製した。結合されたレグヘモグロビンは、500 mMリン酸二水素カリウム、100 mM NaClで樹脂を溶出させた。精製されたレグヘモグロビンを、中和させ、限外ろ過を用いて濃縮した。濃縮されたレグヘモグロビンを20 mM亜ジチオン酸Naで還元した。亜ジチオン酸Naを、ダイアフィльтраーションにより除去した。レグヘモグロビン濃度を、ソーレーピーク (soret peak) 吸収度によって決定し、60~70 mg/mlに調整した。最終レグヘモグロビン生成物を、液体窒素で凍結し、凍結乾燥し、-20°Cで貯蔵した。レグヘモグロビンの純度 (部分存在量) を、SDS-PAGEによって分析し、約80%と決定した。UV-VISスペクトル (250~700 nm) の分析によって、ヘムを負荷したレグヘモグロビンと整合したスペクトルの痕跡が明らかになった。

【0104】

(表1に列挙される) ダイズ (*Glycine max*) レグヘモグロビンC2および8つのピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) ヘム生合成遺伝子を、pAOX1メタノール誘導プロモーターの制御下で、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 発現ベクターpJA (BioGrammatics Inc.; Carlsbad, CA) にクローン化した。ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 株Bg11 (BioGrammatics, Inc.) を、線形化されたプラスミドで形質転換し、安定した成分を、抗生物質抵抗性によって選択した。

【0105】

(36)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 1 】

表 1

遺伝子	種	機能	UniprotKB 番号
レグヘモグロビン C2	ダイズ(<i>Glycine max</i>)	レグヘモグロビン生成	P02236
ALA シンターゼ	ピキア・パストリス(<i>Pichia pastoris</i>)	ヘム酵素-ステップ 1	F2QS71
ALA デヒドラターゼ	ピキア・パストリス(<i>Pichia pastoris</i>)	ヘム酵素-ステップ 2	F2QZA1
ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ	ピキア・パストリス(<i>Pichia pastoris</i>)	ヘム酵素-ステップ 3	F2QP90
ウロポルフィリノーゲン III シンターゼ	ピキア・パストリス(<i>Pichia pastoris</i>)	ヘム酵素-ステップ 4	F2QSR5
ウロポルフィリノーゲン III デカルボキシラーゼ	ピキア・パストリス(<i>Pichia pastoris</i>)	ヘム酵素-ステップ 5	F2QUW1
コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ	ピキア・パストリス(<i>Pichia pastoris</i>)	ヘム酵素-ステップ 6	F2QUX3
プロトポルフィリノーゲン III オキシダーゼ	ピキア・パストリス(<i>Pichia pastoris</i>)	ヘム酵素-ステップ 7	F2R0D
フェロケラターゼ	ピキア・パストリス(<i>Pichia pastoris</i>)	ヘム酵素-ステップ 8	F2QWX6
Sh プレオマイシン	ストレプトアロテイクス・ヒンドゥスタヌス(<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>)	Zeocin への抵抗性	P17493
β ラクタマーゼ	大腸菌(<i>E.coli</i>)	アンピシリンへの抵抗性	Q9L5C7
ハイグロマイシン	大腸菌(<i>E.coli</i>)	ハイグロマイシンへの抵抗性	P00557
NatR	ストレプトマイセス・ノールセイ(<i>Streptomyces noursei</i>)	ノーセオスリシン(Nourseothricin) 抵抗性	O33583
ネオマイシン抵抗性	合成の細菌性トランスポゾン Tn5	ゲンチシン(gentamicin)(G418) への抵抗性	n/a

【 0 1 0 6 】

形質転換されたピキア (*Pichia*) 細胞を、流加発酵によって増殖させ、レグヘモグロビ

(37)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

ン発現を、メタノールで30℃で120時間誘導した。細胞を遠心分離によって濃縮し、水に再懸濁させ、高圧ホモジナイゼーションにより溶解させた。固体を、Tramflo c 863Aによる処理、遠心分離、および0.2 μm精密ろ過(Koch Membrane Systems)により除去した。可溶性ライセートを濃縮し、3 kDa 限外ろ過(Spectrum Laboratories)を用いて水で透析ろ過した。配合されたライセートを、HPA25L陰イオン交換樹脂(Mitsubishi)を用いて、最終純度約40%まで部分的に精製した。部分的に精製されたレグヘモグロビン溶液を、濃縮および3 kDa 限外ろ過(Spectrum Laboratories)を用いた水ダイアフィльтраーションによって再配合し、Q高速流動陰イオン交換樹脂(GE Lifesciences)を用いてさらに精製した。最終レグヘモグロビン生成物を、3 kDa 限外ろ過を用いて濃縮し、-20℃で凍結した。最終生成物は、純度約80%であり、80 g/Lのレグヘモグロビンを含有した。

10

【実施例2】

【0107】

RuBisCOの単離

新鮮なホウレンソウの葉1 kgを、0.1 M NaClを含有するリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)で1:1の比で Vita-prep 3 blender (Vita mix Corp, Cleveland, OH)に浸軟した。抽出を、最高設定(3 HP モーター)で10分間行った。温度を30℃未満で維持した。10 M NaOH溶液を用いて挽いた後、pHを7.4に調整した。ホモジネートを3500 gで5分間遠心分離し、スケールで(供給量約1 gpmでGEA Westfalia decanter GCE-345を用いて)条件をシミュレートした。ペレットを捨てた。次いで、遠心分離液(liquid centrate)(約1.6 L)を、中空糸形式(Spectrum Laboratories Inc, Rancho Dominguez, CAのKrosFlo K02E20U-05N)の0.2 μm改変されたポリエーテルスルホン(mPES)膜を用いてマイクロフィルターにかけた。残余分(約0.25 L)を、抽出緩衝液約1.5 Lを用いて透析ろ過した。このろ過ステップからの透過物(約3 L)を、10 kDa mPES膜(Spectrum Laboratories Inc, Rancho Dominguez, CAのMiniKros N02E010-05N)を用いて約0.1 Lまで濃縮した。タンパク質濃縮物は、pH約7.4であった。6 M塩酸などの濃酸溶液を、濃縮物にゆっくりと加えて、pHを5まで下げた。混合物を、マグネチックスタープレートまたはホモジナイザーを用いて30分間激しく攪拌し、次いで、3500 gで5分間遠心分離して、オフホワイトのペレットおよび褐色の遠心分離液を得た。遠心分離液を捨て、タンパク質ペレットを脱イオン水で洗浄した。ペレットを0.05~0.1 LのDI水に再懸濁させた。溶液を、一様のスラリーに激しく混合し、10 M水酸化ナトリウムなどの濃縮された基礎液を用いて、pHを11までゆっくりと上げた。得られた溶液は、清澄な黄色であった。次いで、pHを9まで下げて、清澄な混合物を維持した。生成物を、噴霧乾燥機を用いて乾燥させた、または凍結乾燥器を用いて凍結し乾燥させた。この材料を、AAOC法(AOAC, 2000)によりLeco FP-528 Nitrogen Combustion Analyzer(Leco, St. Joseph, MI)を用いて分析した。タンパク質を、%窒素×6.25として算出し、タンパク質86%と算出した。得られた生成物は、わずかに脱色し、低温変性特性を保持した。

20

30

40

【実施例3】

【0108】

RuBisCOの単離および脱色

新鮮なホウレンソウの葉1 kgを、8%(w/v)PEG(Carbowax Sentry PEG 8000; Dow Chemicals, Midland, MI)および0.1%(w/v)陽イオン性凝集剤(863A; Tramflo c, Inc., Houston, TX)を含有するリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)で1:1(w/w)の比でVita-prep 3 blender (Vita mix Corp., Cleve

50

(38)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

eland、OH)で浸軟した。抽出を、すべての時間で30℃未満の温度を維持しながら最高設定(3HPモーター)で3分間行った。挽いた後10M NaOH溶液を用いてpHを7.4まで調整した。ホモジネートを、ベンチトップ遠心分離機(Allegra X15R、SX4750ローター; Beckman Coulter, Inc., Pasadena, CA)を用いて、3500gで5分間遠心分離した。ペレットを捨て、上澄み(約1.6L)を別々に収集した。硫酸マグネシウム七水和物の塩(K+S KAL I GmbH, Kassel, Germany)を上澄みに加えて、1M濃度にした。溶液を完全に混合し、ベンチトップ遠心分離機(Allegra X15R、SX4750ローター; Beckman Coulter, Inc.)を用いて、5451gで3分間遠心分離した。3つの層が遠心分離ボトル中に形成され、残りの緑色の固体を、ペレット(約0.1L)として分離した。PEG層(約0.3L)を分離し、最上層を形成し、着色化合物および臭気化合物を選択的に分画した。次いで、中間層に残存する清澄な生成物を、中空糸形式(Spectrum Laboratories Inc.)で0.2μm改変されたポリエーテルスルホン(mPES)膜を用いてマイクロフィルターにかけた。残余分(約0.25L)を、1M硫酸マグネシウム溶液約0.75Lを用いて透析ろ過した。このろ過ステップからの透過物(約3L)を、70kDa mPES膜(Spectrum Laboratories, Inc.)を用いて約0.1Lに濃縮した。これを、5つのステップで約0.5LのDI水でさらに透析ろ過した。タンパク質濃縮物は、pH約7であり、導電率は、5mS/cm未満であった。得られたタンパク質濃縮物は、清澄な淡黄色であった。生成物を、噴霧乾燥機を用いて乾燥させた、または凍結乾燥器を用いて凍結し乾燥させた。この材料を、標準の660nm Pierceタンパク質アッセイおよびSDSゲルデンシトメトリーを用いて分析した。乾燥固形物を、IR湿度計を用いて分析した。最終生成物中の凝集剤およびPEG濃度を、滴定法を用いて分析した。タンパク質濃度は、約91%(w/w)であり、全固形分は、約95%(w/w)であった。PEGおよび凝集剤濃度を、0.2%(w/w)未満で分析した。生成物は、純度90%を超え、プロセスを通じて90%を超える回収であった。得られた生成物は、脱色し、低温変性特性を保持した。

【実施例4】

【0109】

可溶性ダイズコングリシニンの単離

ダイズタンパク質の可溶性コングリシニン画分(7S画分)を、以下の方法を用いて得た。脱脂ダイズ粉(CHS HONEY SOY(登録商標)PDI 90)1kgを、オーバーヘッドミキサーを取り付けた容器で10Lの脱イオン水で混合した。ダイズ粉の凝集塊が分散した後、スラリーのpHを、2N NaOHを用いて8まで調整した。混合物を、4℃で1時間攪拌して、すべての可溶性タンパク質を抽出した。次いで、混合物のpHを2N H₂SO₄を用いて5.8まで調整し、4℃でさらに1時間混合した。次いで、混合物を、JLA 8.1ローター(JHC遠心分離機、Beckman Coulter Inc.)において10000gで10分間遠心分離して、不溶性炭水化物およびタンパク質(グリシニン)を除去した。可溶性の上澄みを、2N H₂SO₄を用いてpH4.5までさらに酸性にし、4℃で1時間混合した。次いで、酸性化混合物を10000gで10分間遠心分離して、沈殿したタンパク質を収集し、リポキシゲナーゼ、ダイズレシチンおよびトリブシン阻害物質を含有する上澄みを捨てた。4体積の水(およそ2L)にペレットを再懸濁することにより、pH4.5の沈殿したタンパク質画分中のコングリシニンを溶解化し、2N NaOHを用いてpH8まで調整した。混合物を、4℃で1時間攪拌した。混合物のpHを2N H₂SO₄を用いて再度5.8まで下げて、汚染物タンパク質の同時精製を最小限にした。混合物を15000gで20分間遠心分離して、上澄み中の可溶性コングリシニンを収集した。コングリシニン画分を、限外ろ過(70kDa mPES限外ろ過膜、2600sq. cm、Spectrum Laboratories Inc.)を用いて濃縮した。得られたタンパク質溶液(10%タンパク質濃度でおよそ0.5L)は、65℃で55~65%純コングリシニンおよびゲルを含む。

(39)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

次いで、タンパク質を、凍結乾燥し、食肉レブリカの製造に用いられるまで室温で貯蔵した。

【実施例5】

【0110】

肉の生地を予め風味付けするための生地ブロスの調製

生地ブロスを、1×前駆物質のミックス1（表2を参照のこと）、0.5%レグヘモグロビン（Leg H、実施例1に記載されている通り単離され精製された）、および18%純化、漂白、脱臭された（RBD: Refined, Bleached, and Deodorized）ヤシ油（Shay and company、Milwaukee、OR）を混合し、溶液が沸騰するまで加熱しながら攪拌し、次いで、ぐつぐつと（at a low 10
boil）10分間煮立たせることにより創出した。この溶液を、「生地ブロス」と称し、実施例10の肉の生地を創出するために用いた。ヤシ油をLeg Hおよび前駆物質の混合でインキュベートすることにより、カラメルになった、脂っこい、牛肉のような、ナッツのような、硫黄、金属に似た、バターのような、甘い、香ばしい、およびうま味を含めて、ブロス中の香ばしいまたは肉のような風味が生成される。

【0111】

(40)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 2 】

表 2
マジックミックスの組成

前駆物質	前駆物質のミックス 1(mM)	前駆物質のミックス 2(mM)
アラニン	15.0	7.5
アルギニン	0.6	0.3
アスパラギン	0.8	0.4
アスパラギン酸塩	0.8	0.4
システイン	9.0	9.0
グルタミン酸	50.0	50.0
グルタミン	0.7	0.3
グリシン	1.3	0.7
ヒスチジン	0.6	0.3
イソロイシン	0.8	0.4
ロイシン	2.0	1.0
リシン	5.0	2.5
メチオニン	1.0	0.5
フェニルアラニン	0.6	0.3
プロリン	0.9	0.4
トレオニン	0.8	0.4
トリプトファン	1.5	0.8
チロシン	0.6	0.3
バリン	1.0	0.5
グルコース	5.6	2.8
リボース	5.0	5.0
チアミン	0.2	0.2
IMP + GMP	2.0	1.0
乳酸	9.0	4.5
クレアチン	3.0	1.5
L-タウリン	40.0	20.0
グルタチオン	2.0	1.0
N-アセチル L-システイン	10.0	5.0

10

20

30

40

【 実施例 6 】

【 0 1 1 2 】

風味を注入された脂肪レプリカの調製

風味を付けた脂肪レプリカを、0、5 % の（実施例 1 からの）Leg H、1 × 前駆物質のミックス 1（表 1）、および 30 % RBD ヤシ油（Shay and company、Milwaukee、OR）の溶液を混合し、沸騰するまで加熱しながら攪拌し、次いで、10 分間ぐつぐつと煮立たせることにより創出した。溶液を冷却して油を固化させた。油が固化した後、これを水層から分離し、実施例 11 に記載のハンバーガーを調製するのに用いた。ヤシ油を Leg H および前駆物質のミックスでインキュベートすることによ

50

(41)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

り、香ばしい、肉のような、牛肉の脂肪、わずかに甘いおよび硫黄を含めて、油中に風味の香気が注入される。

【実施例7】

【0113】

「軟らかい結合」組織レプリカの調製

軟らかい結合組織レプリカを、ダイズタンパク質単離物(SUPRO(登録商標)EX38(Solaie))、Vitalコムギグルテン(131100、Guisto's Specialty Foods、San Francisco、CA)、および水を用いて調製した。Nano16押出機(Leistritz Advanced Technologies Corp.、Somerville、NJ)を、特注の冷却ダイ(円形、ID 6.5mm、長さ300mm)、冷却水サーキュレーター、および高圧水ポンプ(Optos、Eldex Laboratories Inc.)と共に用いた。

10

【0114】

ダイズタンパク質単離物50gおよびコムギグルテン粉末50gを、5分間手動混合および混転で完全に混合し、次いで、押出機の原料投入機(batch feeder)の装填管(load ing tube)に添加した。乾燥混合物を2.4g/分の速度で押出機に送った。3.6ml/分の速度で押出機のパレルの第2のゾーンにポンプにより水を送った。押出機のスクリュウ速度を、120RPMで維持した。温度勾配を、押出機パレルに沿って次の通り設定した。供給ゾーン-25℃、ゾーン1-30℃、ゾーン2-60℃、ゾーン3-110℃、ゾーン4-110℃。ダイプレートは、能動的に加熱も冷却もされなかった。冷却ダイを、24℃でダイを維持する冷却水サーキュレーターにより冷却した。

20

【0115】

本方法によって生成された軟らかい結合レプリカは、色がオフホワイトであり、繊維性の高い糸状であり、味および風味がはっきりしなかった。この材料の引張強さは低く、柔らかい牛肉のローストの引張強さに匹敵した。

【実施例8】

【0116】

「硬い繊維性の結合」組織レプリカの調製

硬い繊維性の結合組織レプリカを調製するために、ダイズタンパク質単離物50gおよびコムギグルテン粉末50gを、5分間手動混合および混転で完全に混合し、押出機の原料投入機の装填管に添加した。乾燥混合物を、3.6g/分の速度で押出機に送った。5.4ml/分の速度で押出機のパレルの第2のゾーンにポンプにより水を送った。押出機のスクリュウ速度を120RPMで維持した。温度勾配を押出機パレルに沿って次の通り設定した。供給ゾーン-25℃、ゾーン1-37℃、ゾーン2-61℃、ゾーン3-135℃、ゾーン4-135℃。ダイプレートを、能動的に加熱も冷却もしなかった。冷却ダイを、26℃でダイを維持する冷却水サーキュレーターにより冷却した。

30

【0117】

本方法によって生成された硬い繊維性の結合レプリカは、薄褐色であり、はっきりしない味および風味を有する繊維状/層状材料であった。この材料の引張強さは、高く、調理された牛肉の腿の引張強さに匹敵した。

40

【実施例9】

【0118】

予め風味付けされた「軟らかい結合」組織の調製

風味を付けた軟らかい結合組織レプリカを調製するために、ダイズタンパク質単離物50g、コムギグルテン粉末50g、酵母抽出物番号9(Flavor house inc.、X11020)1g、および酵母抽出物番号21(Biospringer 1405/40 MGI)を、5分間手動混合および混転で完全に混合し、押出機の原料投入機の装填管に添加し、実施例7に記載されている通り押出成形した。予め風味付けされた軟らかい結合組織は、香ばしい味がし、実施例7で生成された軟らかい結合組織に比べて、風味の複雑性が増し、腐った香気が減った。

50

(42)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【実施例10】

【0119】

「肉の生地」の調製

牛のひき肉ーレプリカのための「肉の生地」を、以下の成分を用いて調製した。

a. Vital コムギグルテン(番号131100、Guisto's Specialty Foods、San Francisco、CA)

b. 軟らかい結合組織レプリカ(実施例7を参照のこと、実施例9の予め風味付けされた軟らかい結合組織もまた用いられ得る)

c. 生地ブロス(実施例5を参照のこと)

【0120】

肉の生地の一部100gを以下の通り調製した。第一に、軟らかい結合組織レプリカ25gを、1本の長さおよそ1インチに、縦方向に手で細かくちぎった(hand shredded)。細かくちぎられた軟らかい結合レプリカを、ミキシングボウルにおいて乾燥コムギグルテン25gと合わせ、手で静かに軽く混ぜて、均等に混合した。別々の容器において、生地ブロス50mLを沸騰させ、10分間弱火で煮立てた。熱い生地ブロスを、乾燥グルテンー結合組織レプリカミックスに加え、スタンドミキサー(例えば、生地を混合する付属品が付いたKITCHENAID(登録商標)Professional 600 Series 6 Quart Bowl-Lift Stand Mixer model KP26M1XER、速度2に設定)で30秒間練って、肉の生地を形成した。

【0121】

練った後、肉の生地を平板に形成し、蒸すために別の容器に移した。肉の生地を、(Arroma Rice cooker Model No. ARC-1030SB中で)で内部温度が、およそ200°Fになるまで蒸し、さらに20分間その温度で保持した。蒸した後、生地を、水上の容器に移して、室温まで冷却した。蒸した肉の生地はまた、この時点で4℃で最大1週間まで貯蔵することができる。牛肉パテのレプリカを形成する前に、蒸した肉の生地を、手でおおよそ1インチ角に細かく裂いた。混合物は、牛肉パテのレプリカ(実施例11および12に記載されている)の形成において、すぐに用いることができる状態である。

【実施例11】

【0122】

ハンバーガーの組み立ておよび調理

表3の成分を含有するレプリカハンバーガーを調製した。1%寒天調製物を、ガラスビーカー中で水99mLに寒天粉末(品目6410、Now Foods Bloomingdale、IL)1gを加えることにより作製した。混合物を攪拌しながら100℃まで加熱することにより寒天を完全に可溶化し、次いで、堅固なゲルが固まるまで氷浴で20~30分間冷却した。次いで、ゲルをコーヒングライnder(Cuisinart(登録商標)Model 番号CUI DCG-20N)に移し、20秒間挽いて、混合するために細かく砕いた。

【0123】

(43)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【表3】

表3
ハンバーガーの組成

成分	%
肉の生地(実施例10)	54.1
1%寒天調製物	20.0
フレーバー系を有するヤシ油(実施例6)	13.5
16×前駆物質のミックス2(表1)	5.9
RuBisCO 調製物(乾燥)(実施例2)	5.3
LegH 調製物(乾燥)(実施例1、大腸菌(E.coli))	1.2
合計	100

10

【0124】

肉の生地(実施例10)および風味を付けたヤシ油(実施例6)をボウル中で手で混合した。典型的なバッチサイズは、100gから2000gであった。次いで、混合物を、食品グラインダー付属品を取り付けたスタンドミキサー(KITCHENAID(登録商標) Professional 600 Series 6 Quart Bowl-Lift Stand Mixer model KP26M1XERおよびKITCHENAID(登録商標) Food Grinder model FGA, St. Joseph, MI)を用いて、速度設定1で挽いた。混合物を、固定孔プレートの前に掘え付けられた回転ナイフを通り過ぎてスクリュコンベヤーにより送った。挽いた組織をボウルに収集した。

20

【0125】

次いで、以下の成分を、表3に示される比: 1%寒天調製物、RuBisCO(およそ50重量% RuBisCO)、16×前駆物質のミックス2、およびLegH(350~650mg/g)で加えた。成分を、ここに列挙された順序で加え、それぞれ加えた後、材料を静かに混合した。次いで、挽いた組織の部分30gまたは90gを、手で円形のパテ形に形成した。パテ30gの典型的な寸法は、50mm×12mmであった。パテ90gの典型的な寸法は、70mm×18mmであった。組み立て、挽くおよび形成する間、すべての材料を、低温(4~15℃)に保った。パテを調理するまで冷蔵した。パテを、予熱した(325~345°F)焦げ付かないフライパン(non-stick skillet)で調理し、2分ごとにひっくり返しなが、内部温度160°Fまで加熱した。典型的な調理時間は、12から15分に及んだ。調理されたパテは、訓練を受けた官能試験調査員によって判断される通り、外観、質感、および風味が、牛のひき肉に類似した。パテ形式で調理するほかに、未形成の材料はまた、タコスの具、キャセロール、ソース、トッピング、スープ、シチュー、またはローフなど様々な料理に用いることもできる。

30

【実施例12】

40

【0126】

フレーバー分子のハンバーガーへの添加

表4の成分を含有するレプリカハンバーガーを調製した。

【0127】

(44)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 4 】

表 4
ハンバーガーの組成

成分	%
味が付いていない肉の生地	54.1
1%寒天調製物(実施例 11 を参照のこと)	20.0
ヤシ油	13.5
16×前駆物質のミックス 2(表 1)	5.9
RuBisCO 調製物(乾燥)(実施例 2)	5.3
LegH 調製物(乾燥)(実施例 1、大腸菌(E.coli))	1.2
フェニル酢酸(CAS 番号 103-82-2)	0.003%
フラネオール(CAS 番号 3658-77-3)	0.003%
2-メルカプト-3-ブタノール(CAS 番号 37887-04-0)	0.0015%
ニンニク、油溶性(Kalsec)	0.0015%
合計	100

10

【 0 1 2 8 】

20

味が付いていない肉の生地（コムギグルテン、味が付いていない軟らかい結合組織、および水）およびヤシ油を、ボウル中で手で混合し、実施例 11 に記載されている通り挽いた。次いで、以下の成分を、表 4 の比：1 % 寒天調製物、RuBisCO（およそ 50 重量 %）、16×前駆物質のミックス 2、および LegH（350 ~ 650 mg / g）で加えた。フレーバー化合物およびニンニク油を 1×10^{-2} まで希釈し、次いで、表 4 に列挙された濃度で加えた。成分を、ここに列挙された順序で加え、それぞれ加えた後、材料を静かに混合した。次いで、挽いた組織の部分 100 g を手で円形のパテ形に形成した。組み立て、挽くおよび形成する間、すべての材料を、低温（4 ~ 15 °C）に保った。パテを、予熱した（325 ~ 345 °F）焦げ付かないフライパンで調理し、2 分ごとにひっくり返ししながら、内部温度 160 °F まで加熱した。パテは、通常、12 から 15 分で調理した。調理されたパテは、外観、質感、および風味が牛のひき肉に類似にした。これらのパテは、予め風味付けされた生地および脂肪で創出されたハンバーガーと同じくらいの風味の深みがなかったが、これらのハンバーガーは、訓練を受けた官能試験調査員によって判定された通り、牛肉に伴う追加の風味の香気を有した。

30

【 実施例 13 】

【 0 1 2 9 】

結合組織レプリカについての溶液紡糸ゼイン繊維の調製

溶液紡糸ゼイン繊維を、ゼイン粉末（Prairie Gold Inc.、Bloomington, IL）、エタノール（Luxco による 190 proof Everclear）、水酸化ナトリウム（Fisher Scientific）、グリセロール（Fisher Scientific）、および水を用いて生成した。ゼイン粉末 50 g、グリセロール 10 g、エタノール 36 g、および水 4 g を、ホモジナイザーを用いて 5 分間ガラス製広口びん中で混合した。溶液の pH を、水酸化ナトリウムのエタノール 1 M 溶液で 7.0 まで調整した。溶液を、30 ゲージ針を有する 1 ml 注射器に装填した。注射器をシリンジポンプ（New Era Syringe Pumps, Inc.）に取り付け、Delrin スプールを有する特注のファイバースプルーラーに対して、針を下に向け、これを垂直に据え付けた。スプーリングロッドを 3 RPM で回転するように設定した。

40

【 0 1 3 0 】

シリンジポンプを、0.12 ml / h に設定して作動させた。溶液の液滴が針の先端で

50

(45)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

形成された場合、これをへらですくい取り、繊維に広げた。繊維の端を、付着するまでスプーリングロッドに接触させた。次いで、繊維アタッチメントの位置でスプーリングロッドに面している加熱ファンにスイッチを入れ、繊維乾燥を容易にした。繊維を、注射器が空になるまでスプールに巻き、その後、注射器に再装填し、上記の手順を繰り返した。スプールに巻いた後、繊維を110℃のオーブンで1時間早期硬化させ、次いで、175℃で5分間焼くことにより完了した。

【0131】

本プロセスによって得られたゼイン繊維は、光学顕微鏡により測定された通り、60～80マイクロメートル厚のやや清澄な、薄黄色に着色された繊維であった。これらは、空気および水に非常に柔軟性があり、数時間の水浸後でも、動物の結合組織(10～15 MPa)に類似の高い引張強さを維持した。

10

【実施例14】

【0132】

予め風味付けしている肉の生地についてのグルコン酸鉄による生地プロセスの調製

生地プロセスを、1×前駆物質のミックス1(表2を参照のこと)、1 mMグルコン酸鉄、および18%純化、漂白、脱臭された(RBD)ヤシ油(Shay and company)を混合し、溶液を沸騰するまで加熱しながら攪拌し、次いで、ぐつぐつと30分間煮立たせることにより創出した。この溶液を、「グルコン酸鉄生地プロセス」と称し、実施例10の肉の生地において用いられる「生地プロセス」の代わりに用いることができる。ヤシ油をグルコン酸鉄および前駆物質のミックスでインキュベートすることにより、プロセス中の豚肉、牛肉のような、硫黄、金属に似た、甘い、香ばしい、およびうま味を含めて、プロセス中の香ばしいおよびまたは肉のような風味が生成される。

20

【実施例15】

【0133】

風味を注入された脂肪レプリカのグルコン酸鉄による調製

グルコン酸鉄を含有する風味を付けた脂肪レプリカを、0.25%のLeg Hの溶液、1 mMグルコン酸鉄、1×前駆物質のミックス1(表1)、および30%RBDヤシ油(Shay and company)を混合し、沸騰するまで加熱しながら混合物を攪拌し、次いで、ぐつぐつと10分間煮立たせることにより創出した。溶液を4℃まで冷却して、油を固化させた。油が固化した後、これを水層から分離し、実施例13に記載されているハンバーガーを調製する際に風味を付けた脂肪レプリカの代わりに用いた。ヤシ油をLeg H、グルコン酸鉄、および前駆物質のミックスでインキュベートすることにより、香ばしい、肉のような、牛肉の脂肪の香気、甘い、金属に似た、および硫黄の香気を含めて、油において風味の香気を注入する。

30

【実施例16】

【0134】

酒石酸水素カリウムを含有する肉の生地の調製

肉の生地を、表5に示される成分を用いて以下の通り調製した。

【0135】

(46)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【表5】

表5
肉の生地組成

成分	%
グルテン粉	48.2
水	35.0
ヤシ油	9.0
1M 乳酸溶液	6.0
加水分解された植物性タンパク質	1.3
酒石酸水素カリウム	0.5
合計	100.0

10

【0136】

第1に、水、ヤシ油、1M 乳酸溶液、および加水分解された植物性タンパク質を、混合し、60℃まで加熱してブロスを作製した。融解させ、ヤシ油を分布させるのを助けるために加熱を行った。グルテン粉(vital コムギグルテン番号131100、Guisto's Specialty Foods、San Francisco、CA)および酒石酸水素カリウムを、別々の容器において混合した。次いで、温かいブロスを、乾燥混合物に加えて、スタンドミキサー(例えば、生地を混合する付属品が付いた、KITCHENAID(登録商標) Professional 600 Series 6 Quart Bowl-Lift Stand Mixer model KP26MIXER、速度2に設定)で30秒間練って、肉の生地を形成した。練った後、肉の生地を平板に形成し、蒸すために別の容器に移した。内部温度がおよそ88℃になるまで、肉の生地を、(例えば、Aroma Rice cooker Model No. ARC-1030SB)で蒸した。蒸した後、生地を氷上の容器に移して4℃まで冷却した。酒石酸水素カリウムは、有利な方法で生地の質感を改質した。実施例10の肉の生地と比較した場合、本実施例の肉の生地は、より粘着性であり、挽いた後、牛のひき肉により類似した形状因子であり、成形しやすくパテを形成しやすかったため、未加工の取扱い特性を改善した。

20

30

【実施例17】

【0137】

ルテインを含有する肉の生地の調製

肉の生地を表6に示される成分を用いて以下の通り調製した。

【0138】

【表6】

表6
肉の生地組成

成分	%
水	50
グルテン粉	40
ヤシ油	9.0
ルテイン SAF 調製物	1
合計	100.0

40

50

(47)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【0139】

第1に、水、ヤシ油(Shay and company、Milwaukie、OR)、およびルテイン(FloraGLO Lutein 20% SAF、DSM Nutritional Products、Overland Park、KS)を混合し、25℃を超えるまで加熱してブロスを作製した。融解させ、ヤシ油およびルテインを分布させるのを助けるために加熱を行った。次いで、温かいブロスを、グルテン粉(vital コムギグルテン PROLIGH T(登録商標)LF、ADM、Chicago、IL)に加え、速度「2」で設定したスタンドミキサー(例えば、生地を混合する付属品が付いたKITCHENAID(登録商標)Professional 600 Series 6 Quart Bowl-Lift Stand Mixer model KP 26 MIXER)で30秒間練って、肉の生地を形成させた。練った後、肉の生地を平板に形成し、実施例16と同様に、蒸すために別の容器に移し、次いで、氷上の容器に移して4℃まで冷却した。肉の生地の対照バッチを、ルテインを加えなかったことを除いて前述した通り作製した。ルテインを含有する肉の生地は、穀物のような風味が少なく、対照の肉の生地よりも牛肉に近いと記載された。

10

【実施例18】

【0140】

カロテノイドの添加による穀物の風味および異臭の低減

肉の生地を表7に示される成分を用いて以下の通り調製した。

20

【0141】

【表7】

表7
肉の生地の組成

成分	%
グルテン粉(ADM PROLITE(登録商標)Low Flavor Vital Wheat Gluten(Montreal、Canada))	40.0
水道水	50.0
ヤシ油	10.0
カロテノイド(DSM)	0.005
合計	100.0

30

【0142】

第1に、融解したヤシ油(50℃)をカロテノイドで混合し、次いで、これを水に混合した。ブロスを、激しく攪拌し、次いで、速やかにコムギグルテン粉をブロスに加え、スプーンでよく混合した。形成した生肉の生地を、実施例16に記載されている通り、蒸すために金属製ラミキンまたはガラスピーカーに移し、次いで、氷上の容器に移して4℃まで冷却した。

40

【0143】

カロテノイドを加えて、有利な方法で生地の風味が改質され；カロテノイドを含まない肉の生地(実施例10)と比較した場合、5名の訓練を受けたフレーバーサイエンティストは、カロテノイドを含む肉の生地が、4品の試食では穀物の風味が少なく、酸化臭が弱く、全体的な異臭が少ないと記載した。表8は、穀物の風味に関して5名の訓練を受けた

50

(48)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

フレーバーサイエンティストによって評価された、異なるカロテノイドを含む試料のパネルにより得られたまとめられた感覚についての結果を示す。訓練を受けたフレーバーサイエンティストは、穀物の風味に対して試料を1から5で評価し、1は穀物の風味が最も低く、5は最も高かった。ルテインを含む肉の生地中の異臭の減少は、SPMEガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)データによって裏付けられた。さらに、カロテノイド(リコペン、 β -カロテン、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、およびルテイン)を肉の生地に加えると、試料が、より脂っこいおよびより甘いということが記載された。
【0144】

肉の生地にはルテインを加えることによって、大部分のフレーバー化合物は、ルテインの濃度に応じて低下した。表9を参照のこと；ルテイン濃度は、なし、0.0005%、および0.005%であった。カロテノイドにより低下した主な化合物には、(Z)-2-ノネナール、(E,E)-2,4-ノナジエナール、および1-ペンテン-3-オールを含めた、アルコールおよびアルデヒドのような、酸化したフレーバー化合物が含まれ；さらに、メタンチオール、2-アセチルチアゾール、および硫化ジメチルを含めた、硫黄化合物も低下し；これらの化合物の多くはまた、ガスクロマトグラフィー嗅覚検査(GCO)による訓練を受けたフレーバーサイエンティストによって、穀物のような香気および酸化臭と記載された。

【0145】

【表8】

表 8

穀物の風味の減少のためにカロテノイドを加えた肉の生地の感覚的エマルション

以下を含む肉の生地:	穀物ランキング:1~5(1=最低値)
対照のヤシ油ブランク	3.0±0.8
リコペンの追加	2.8±0.6
β -カロテンの追加	1.5±0.7
ゼアキサンチンの追加	1.6±0.8
カンタキサンチンの追加	1.6±0.8
ルテインの追加	1.9±0.8

【0146】

(49)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 9 】

表9

フレーバー化合物は、調理後コムギグルテン粉中にカロテノイドを添加することにより影響を受ける。データはSPME GC/MSにより収集された。

化合物	ピーク面積		
	ルテイン量 なし	少	多
(E,E)-2,4-デカジエ	■	■	■
2-ピロリジノン	■	■	■
ジメチルトリスルフィド	■	■	■
2-アセチルチアゾール	■	■	■
二硫化炭素	■	■	■
メタンチオール	■	■	■
ペンタン酸	■	■	■
酢酸	■	■	■
ブタン酸	■	■	■
プロパン酸	■	■	■
1-(2-フラニル)-エタノン	■	■	■
6-メチル-5-ヘプテン-2-オン	■	■	■
(Z)-4-ヘプテナール	■	■	■
3-フルアルデヒド	■	■	■
(Z)-2-ノネナール	■	■	■
フェニルアセトアルデヒド	■	■	■
(E,E)-2,4-ノナジエナール	■	■	■
アセトアルデヒド	■	■	■
3-メチル-ブタナール	■	■	■
2-メチル-プロパナール	■	■	■
アセトン	■	■	■
フルフラール	■	■	■
ブタナール	■	■	■
3-オクテン-2-オン	■	■	■
(E,E)-3,5-オクタジエン-2-オン	■	■	■
フェノール	■	■	■
1-ペンテン-3-オール	■	■	■
ベンジルアルコール	■	■	■
(Z)-2-ペンテン-1-オール	■	■	■
3-メチル-1-ブタノール	■	■	■
ブチロラクトン	■	■	■
5-エチル-2(5H)-フラノン	■	■	■
5-エチル-2(5H)-フラノン	■	■	■

10

20

30

40

【 実施例 19 】

50

(50)

JP 2017-509349 A 2017. 4. 6

【 0 1 4 7 】

酸化防止剤の添加による穀物の風味および異臭の低減

肉の生地を、表 1 0 に示される成分を用いて以下の通り調製した。

【 0 1 4 8 】

【 表 1 0 】

表 10
肉の生地の組成

成分	%
グルテン粉(ADM PROLITE(登録商標)Low Flavor Vital Wheat Gluten)	40.0
水道水	50.0
ヤシ油	9.95
EGCG(Swanson Superior Herbs)	0.05
合計	100.0

10

20

【 0 1 4 9 】

E G C G (没食子酸エピガロカテキン) を、水に可溶化し、次いで、融解したヤシ油 (5 0 ℃) を、水に混合した。ブrossを激しく攪拌し、次いで、速やかにコムギグルテン粉をブrossに加え、スプーンでよく混合した。形成した生肉の生地を、実施例 1 6 に記載されている通り、蒸すため金属製ラミキンまたはガラスピーカーに移し、次いで、氷上の容器に移して 4 ℃ まで冷却した。

【 0 1 5 0 】

訓練を受けたフレーバーサイエンティストにより記載された、E G C G を添加した肉の生地中の異臭の減少は、S P M E G C - M S データによって裏付けられる。G C M S データでは、G C O によって穀物のような香気および酸化臭であると記載された、化合物 2 - ペンチル - フラン、6 - メチル - 5 - ヘプテン - 2 - オン、1 - ペンテン - 3 - オール、2 - ペンテン - 1 - オール、メチル - ピラジン、ブタナール、5 - エチル - 2 (5 H) - フラノン、5 - エチルジヒドロ - 2 (3 H) - フラノン、2 - ノネナール、フェニルアセトアルデヒド、および 3 , 5 - オクタジエン - 2 - オンを含めて、もはや検出不可能であるまたは少なくとも 2 倍減少した複数のフレーバー化合物が示された。

30

【 実施例 2 0 】

【 0 1 5 1 】

コムギグルテンを洗浄することによる穀物の風味を低減した肉の生地の調製

肉の生地を、表 1 1 に示される成分を用いて以下の通り調製した。

40

【 0 1 5 2 】

(51)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【表11】

表 11
肉の生地の組成

成分	%
グルテン粉	40.0
水道水	50.0
ヤシ油	10
合計	100.0

10

【0153】

コムギグルテン粉 (ADM PROLITE (登録商標) Low Flavor Vital Wheat Gluten) を、10×洗浄溶液 (50mM NaCl) を含有する溶液中へゆっくりと攪拌し、次いで、十分に混合して凝集塊を形成するのを防いだ。溶液を5分間氷上に置き、その間、コムギグルテンは底に沈んだ。第2の洗浄ステップ後、第1の洗浄溶液を除去し、10×新鮮な洗浄溶液中に攪拌した。第2の溶液を捨て、続いて、水道水で最後の洗浄を行った。水洗浄溶液を捨て、次いで、洗浄したコムギグルテンを測定して、水の正確な量を取り込まれたことを判定した。コムギグルテン生地の重さが、量り分けた最初のコムギグルテン粉の量および理論水量に等しくなるように、水を加えたまたは圧搾した。融解したヤシ油を加え、生地を30秒間手練りして、油を取り込んだ。形成した生肉の生地を、実施例16と同様に蒸すために金属製ラミキンまたはガラスピーカーに移し、次いで、氷上の容器に移して4℃まで冷却した。

20

【0154】

洗浄ステップによって、有利な方法で生地の風味が改質され；洗浄していない肉の生地と比較した場合、5名の訓練を受けたフレーバーサイエンティストは、洗浄した肉の生地が、4品の試食では穀物の風味が少なく、酸化臭が弱く、全体的な異臭が少ないと記載した。洗浄した肉の生地の異臭の減少は、洗浄していない肉の生地を、洗浄した肉の生地と比較したGC Oと一緒に、SPME GC-MSによって裏付けられる。洗浄した肉の生地において、フレーバー化合物は、アルコールおよびアルデヒドなどの酸化したフレーバー化合物、ならびに1-(2-フラニル)-エタノン、メチルーピラジン、ペンタン酸、3-メチルー1-ブタノール、2,3-ブタンジオン、ベンジルアルコール、(E,E)-3,5-オクタジエン-2-オン、(E)-2-ノネナール、(E,E)-2,4-デカジエナール、および1-オクテン-3-オンを含めた特定の化合物を含めて減少し、GC Oにより臭気活性化合物と決定され、これらの化合物の検出は、洗浄した肉の生地において減少したまたは検出されなかった。

30

40

【実施例21】

【0155】

血液寒天の調製

血液寒天を、表12に示される成分を用いて調製した。

【0156】

(52)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 1 2 】

表 12
血液寒天の組成

成分	%
風味ブロス	41.5
レグヘモグロビン、50mg/ml 液体	26.7
17×液体マジックミックス	17.3
RuBisCO、乾燥(実施例 2)	12.0
1M 乳酸溶液	1.5
寒天粉末	1
合計	100.0

10

【 0 1 5 7 】

寒天粉末 (Now Foods 、 B l o o m i n g d a l e 、 I L) を、攪拌ブーカ
中で 1 0 0 ℃ まで加熱することにより、乳酸および風味ブロスの混合物 (表 1 3 からの 1
0 % ヤシ油およびマジックミックス 1 を用いたことを除いて、実施例 5 と同様に作製した
) に溶解した。溶液を、氷浴に浸漬することにより 6 5 ℃ まで冷却した。次いで、 1 7 ×
液体マジックミックス (表 1 3 からのマジックミックス 2) およびレグヘモグロビンをど
ちらも 4 ℃ で加え、混合物の温度を 5 0 ℃ まで下げた。レグヘモグロビンを変性させない
ようにするために、レグヘモグロビンを加える前に、混合物を冷却することが重要である
。次いで、乾燥 R u B i s C O を加え、混合物を、手で激しく攪拌した。R u B i s C O
を加える場合、4 0 ℃ から 6 0 ℃ の間の温度であることが重要である。温度が非常に高い
場合、R u B i s C O は、変性する恐れがあり、最終生成物の調理中、固化剤 (f i r m i n g
agent) として機能しない。温度が非常に低い場合、寒天は、固化し、均質な混合物の生
成を妨げる。

20

30

【 0 1 5 8 】

(53)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 1 3 】

表 13
マジックミックスの組成

前駆物質	前駆物質の ミックス 1	前駆物質の ミックス 2
	(mM)	(mM)
アラニン	15.0	7.5
アルギニン	0.6	0.3
アスパラギン	0.8	0.4
アスパラギン酸塩	0.8	0.4
システイン	9.0	9.0
グルタミン酸	20	20
グルタミン	0.7	0.3
グリシン	1.3	0.7
ヒスチジン	0.6	0.3
イソロイシン	0.8	0.4
ロイシン	2.0	1.0
リシン	5.0	2.5
メチオニン	1.0	0.5
フェニルアラニン	0.6	0.3
プロリン	0.9	0.4
トレオニン	0.8	0.4
トリプトファン	1.5	0.8
チロシン	0.6	0.3
バリン	1.0	0.5
グルコース	5.6	2.8
リボース	5.0	5.0
チアミン	0.2	0.2
IMP + GMP	2.5	1.3
乳酸	10.0	5.0
クレアチン	3.0	1.5
L-タウリン	10.0	5.0

10

20

30

【 実施例 2 2 】

【 0 1 5 9 】

血液寒天の調製

血液寒天を、表 1 4 に示される成分を用いて調製した。

40

【 0 1 6 0 】

(54)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【表14】

表 14
血液寒天の組成

成分	%
水	81.1
1M 乳酸溶液	9.2
17×液体マジックミックス(表 12)	4.4
レグヘモグロビン、87mg/ml 液体	4.3
寒天粉末	1.0
合計	100.0

10

【0161】

寒天粉末 (Agar 100、TIC Gums、White Marsh、MD) を、攪拌ビーカー中で少なくとも 91℃ まで加熱することにより、水および乳酸の混合物に溶解した。加熱を行って、寒天を完全に可溶化した。次いで、溶液を 50～70℃ まで冷却し、レグヘモグロビン (発現したピキア (Pichia)、実施例 1) および 17×液体マジックミックス (表 12) の予備混合物を加えた。温度が非常に高い場合、レグヘモグロビンは、変性する恐れがあり、風味反応化学を目的としたとき機能しない。温度が非常に低い場合、寒天は、固化し、均質な混合物の生成を妨げる。次いで、混合物を攪拌し、さらに、4～25℃ まで冷却した。完成された生成物は、外観および質感がケチャップのようである。

20

【実施例 23】

【0162】

溶解性、接着性および食感特性を改善した脂質レプリカエマルションの調製

脂質レプリカ 100g を調製するため、乾燥前駆物質の混合 1 (表 12) 1g を、水 18.8ml に溶解し、pH を濃縮 NaOH 溶液で 6 まで調整した。レグヘモグロビン (5.5%) の凍結した溶液を前駆物質溶液に加え、回転速度 250RPM で、160℃ で維持した攪拌ホットプレートに入れた。

30

【0163】

別々の容器において、ヤシ油 (Shay and company、Milwaukee、OR) 35g およびパームステアリン 35g を、60℃ の水浴で一緒に融解した。融解した油混合物を、攪拌速度を 450RPM まで上げながら、ゆっくりと (約 12ml / 分) 前駆物質およびレグヘモグロビンの溶液に加えた。

【0164】

油を加えた後、得られた高濃度のエマルションを、同じ温度および攪拌速度で 23 分間維持した。次いで、エマルションを 600ml ビーカーに移し、急冷のために氷上に置き、冷蔵庫に入れた。エマルションが 25℃ に達した場合、藻類植物油 0.35g およびアセトイン 0.35g を、エマルションに加え、へらで急速に混合した。(実施例 31 に記載されている通り) 風味を改善し、異臭をマスキングするためのラクトンを、以下の量で加えた。5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フランオンを、最終濃度 2.5×10^{-5} % まで加え、ブチロラクトンを、最終濃度 2.5×10^{-6} % まで加え、 δ -テトラデカラクトンを、最終濃度 5×10^{-9} % まで加えた。エマルションを、設定 6 で携帯型ホモジナイザーを用いて、2.5 分間ホモジナイズした。エマルションを、完全に固形化するまで、4℃ でインキュベートした。

40

【0165】

凝固した後、脂質レプリカエマルションは、オフホワイトからわずかに褐色であり、室温でろう状の固形物であり、風味は、香ばしい、肉のような、血液のような、および鶏脂様と特徴付けられた。牛のひき肉レプリカに取り込まれる場合、レプリカの取り扱われる

50

(55)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

および成形される能力と同様にレプリカの粘着性は高まった。

【実施例24】

【0166】

ダイズコングリシニンタンパク質によって安定化された脂質レプリカエマルションの調製

脂質レプリカ100gを調製するため、実施例4からの単離されたダイズコングリシニン粉末1.5gを水28.5mlに溶解し、熱攪拌プレート(hot stir plate)に置いた。別々の容器において、ヤシ油(Shay and company)70gを60℃の水浴で融解した。融解した油混合物を、一定の攪拌で、精製されたタンパク質の溶液にゆっくりと(約12ml/分)加えた。得られたエマルションを最高90℃の温度まで加熱し、この温度で5分間維持した。次いで、エマルションを、600mlビーカーに移し、急冷のために氷上に置き、冷蔵庫に入れた。エマルションが25℃に達した場合、藻類植物油0.35gをエマルションに加え、へらで急速に混合した。(実施例31に記載されている通り)風味を改善し、異臭をマスキングするためのラクトンを、以下の量で加えた。5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フランオンを、最終濃度2.5*10⁻⁵%まで加え、ブチロラクトンを、最終濃度2.5*10⁻⁸%まで加え、 δ -テトラデカラクトンを最終濃度5*10⁻⁹%まで加えた。エマルションを、設定6で携帯型ホモジナイザーを用いて2.5分間ホモジナイズし、完全に固形化するまで、4℃の冷蔵庫でインキュベートした。凝固した後、脂質レプリカエマルションは、白色からわずかにオフホワイト色であり、室温で固体であり、刺激の少ない、非常にはっきりしない風味であり、質感は、与えられた牛肉の脂肪と類似するものと特徴付けられた。

【実施例25】

【0167】

pH逸脱方法によるダイズコングリシニンタンパク質によって安定化された脂肪レプリカエマルションの調製

脂肪レプリカ100gを調製するために、実施例4からの単離されたダイズグリシニンタンパク質粉末0.5gをビーカー中の水29.5mlに溶解した。水酸化ナトリウム2M溶液を用いて、タンパク質溶液のpHを12に調整した。別々の容器において、ヤシ油(Shay and company)70gを60℃の水浴で融解した。融解した油混合物を、一定の攪拌で、精製されたタンパク質の溶液にゆっくりと(約12ml/分)加えた。藻類植物油0.35gを、エマルションに加え、へらで急速に混合した。水酸化ナトリウム2M溶液を用いて、タンパク質溶液のpHを12に調整し、エマルションを、設定6で携帯型ホモジナイザーを用いて30s(30秒)間ホモジナイズし、完全に固形化するまで4℃でインキュベートした。凝固した後、脂質レプリカエマルションは、白色からわずかにオフホワイト色であり、室温で固体であり、刺激の少ない、非常にはっきりしない風味であり、カッテージチーズ様の質感であった。

【実施例26】

【0168】

風味エマルション中にカロテノイドを加えて肉のような風味を高める

各カロテノイド(カンタキサンチン、 β -カロテン、ルテイン、またはリコペン)(Shay and company, Milwaukie, OR)を、溶解性に応じて、10%でヤシ油または水に個別に溶解した。0.5%のLeg Hの溶液、1×前駆物質のミックス1(表1)、30%RBDヤシ油、および個別の10%カロテノイド溶液(エマルション中の最終カロテノイド濃度は、0.025%であった)を混合し、沸騰するまで加熱しながら混合物を攪拌し、次いで、10分間ぐつぐつと煮立たせることにより、カロテノイドを調理前に風味エマルションに加えた。0.7%の追加の藻類植物油を、実施例32に記載されている通り、風味の創出のための追加の前駆物質について加えた。(実施例31に記載されている通り)風味を改善し、異臭をマスキングするためのラクトンを、以下の量で加えた。5-エチル-4-ヒドロキシ-2-メチル-3(2H)-フランオンを最終濃度2.5*10⁻⁵%まで加え、ブチロラクトンを最終濃度2.5*10⁻⁸%まで

(56)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

加え、 δ -テトラデカラクトンを最終濃度 5×10^{-9} %まで加えた。エマルジョンを、設定6で携帯型ホモジナイザーを用いて2.5分間ホモジナイズし、次いで、完全に固形化するまで4℃でインキュベートした。次いで、エマルジョンを、実施例30に記載されている通り調製したタコスミートに加えた。次いで、試料を、カロテノイドを加えない対照と異なるカロテノイドと比較した。試料は、少なくとも5名の訓練を受けたフレーバーサイエンティストによって評価された。結果を表15にまとめた。

【 0 1 6 9 】

【 表 1 5 】

表 15

異なるカロテノイドで調製した風味エマルジョンで試食したタコスからの風味の記載

カロテノイド	要約-共通な点	要約-特有な点
カンタキサンチン	褐色の増加(2) [§] 、対照と類似(2)、グリーンフローラル/野菜臭(2)、焼けた穀物臭の低下(2)、脂臭(2)、奇妙な/化学物質/ビタミン臭の増加(2)	甘い、牛肉臭の増加、穀物臭の低下、sl*フローラル
β -カロテン	肉/牛肉臭の増加(3)、脂臭の増加(2)、グリーン/フローラルの抑制、鶏臭の低下	香ばしさの増加、香ばしさの低下、sl 苦い、sl ニンジンっぽい、sl 刺激の少ない
ルテイン	対照と類似(3)、褐色の増加(2)	グリーンフローラル、フローラル、厚紙/穀物臭の低下、バター、野菜ストック臭の増加、そう快であり異臭がない
リコペン	脂臭(2)、穀物臭(3)	グリーン/フローラル/穀物臭の低下、野菜臭の増加、あまり肉のようでない、異臭の低下、香ばしい、対照と同じ

*わずかに

[§]括弧内の番号は、その回答をした食味検査員の番号を示す。

【 実施例 2 7 】

【 0 1 7 0 】

ハンバーガーの組み立ておよび調理

表16の成分を含有するレプリカハンバーガーを調製した。

【 0 1 7 1 】

(57)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【表16】

表 16
ハンバーガーの組成

成分	%
肉の生地(実施例 16)	26.9
血液寒天(実施例 21)	33.9
風味を付けたエマルション(実施例 21)	20.0
軟らかい結合組織(実施例 7)	19.2
合計	100.0

10

【0172】

冷却した肉の生地を、食品グラインダー付属品(KITCHENAID(登録商標) Professional 600 Series 6 Quart Bowl-Lift Stand Mixer model KP26M1XERおよびKITCHENAID(登録商標) Food Grinder model FGA、St. Joseph, MI)を取り付けたスタンドミキサーを用いて、速度設定1で挽いた。本装置において、材料を、固定孔プレートの前に据え付けられた回転ナイフを通り過ぎてスクリュコンベヤーにより送った。軟らかい結合組織を、鈍い刃を取り付け、低速で20〜30秒間運転したUniversal Machine(UM-12、Stephen Machinery GmbH、Schwarzenbeck、Germany)を用いて細長く切った。風味を付けたエマルションを、−20℃まで冷却し、次いで、一段階プロセスにおいて、ミニチョッパー(Mini-Prep(登録商標) Plus Processor model DLC-2L Cuisinart、Stamford、CT)で刻んだ。エマルションおよそ400gを、ミニチョッパーに入れ、細断設定で60秒間処理して、長さ1〜3mmの切片を得た。

20

【0173】

次いで、ひき肉生地、細長く切られた軟らかい結合組織、および風味を付けたエマルション片を混合した。混合中、混合物を−5から4℃で維持して、脂肪を溶融しないようにした。次いで、血液寒天を加え、完全に取込まれるまで混合した。合計バッチサイズは、1kgであった。次いで、挽いた組織の部分50gまたは150gを、手で円形のパテ形に形成した。パテ50gの典型的な寸法は、55mm×15mmであった。パテ150gの典型的な寸法は、100mm×22mmであった。パテを調理するまで冷蔵した。パテを、予熱した(325〜345°F)焦げ付かないフライパンで調理し、2分ごとにひっくり返ししながら、内部温度160°Fまで加熱した。調理されたパテは、牛のひき肉と類似の外観、質感、および風味であった。パテ形式で調理するほかに、未形成の材料はまた、タコスの具、キャセロール、ソース、トッピング、スープ、シチュー、またはローフなど様々な料理に用いることができる。

30

【実施例28】

40

【0174】

ハンバーガーの組み立ておよび調理

表17の成分を含有するレプリカハンバーガーを調製した。

【0175】

(58)

JP 2017-509349 A 2017. 4. 6

【 表 1 7 】

表 17
ハンバーガーの組成

成分	%
肉の生地(実施例 17)	26.8
脂肪エマルジョン(実施例 23)	20
軟らかい結合組織(実施例 7)	19.2
血液寒天(実施例 22)	13.0
水和液体	10.5
ダイズコングリシニン、乾燥	10.5
合計	100.0

10

【 0 1 7 6 】

冷却した肉の生地を、食品グラインダー付属品 (K I T C H E N A I D (登 録 商 標) P
r o f e s s i o n a l 6 0 0 S e r i e s 6 Q u a r t B o w l - L i f t
S t a n d M i x e r m o d e l K P 2 6 M 1 X E R および K I T C H E N A I
D (登 録 商 標) F o o d G r i n d e r m o d e l F G A 、 S t . J o s e p h 、
M I) を取り付けたスタンドミキサーを用いて、速度設定 1 で挽いた。軟らかい結合組織
を、鈍い刃を取り付け、低速で 2 0 ～ 3 0 秒間運転した U n i v e r s a l M a c h i
n e (U M - 1 2 、 S t e p h e n M a c h i n e r y G m b H 、 S c h w a r z e
n b e c k 、 G e r m a n y) を用いて細長く切った。風味を付けたエマルジョンを、-
2 0 ℃まで冷却し、次いで、S A L A D S H O O T E R (登 録 商 標) N a t i o n a l
P r e s t o I n d u s t r i e s 、 I n c . E a u C l a i r e 、 W I) で刻ん
で、長さ 1 ～ 3 m m の切片を得た。次いで、ひき肉生地、細長く切られた軟らかい結合組織、風味を付けたエマルジョン片、および乾燥ダイズコングリシニンを混合した。混合中
、混合物を - 5 ℃から 4 ℃で維持して、脂肪を溶融しないようにした。次いで、水和液体 (実施例 2 2 に記載されている通りレグヘモグロビンおよび 1 7 × 液体マジックミックスが 1 : 1 の混合物) を加え、混合物を最低 1 5 分間 4 ℃で保持して、乾燥ダイズコングリシニンを水和させた。最後に、血液寒天を加え、完全に取り込まれるまで混合した。合計パ
ッチサイズは、2 0 0 g であった。次いで、挽いた組織の部分 5 0 g を、手で円形のパテ
形に形成した。パテ 5 0 g の典型的な寸法は、5 5 m m × 1 5 m m であった。パテは、調
理するまで冷蔵した。パテを、予熱した (3 2 5 ～ 3 4 5 ° F) 焦げ付かないフライパン
で調理し、毎分ひっくり返しなが、内部温度 1 7 0 ° F まで加熱した。調理されたパテ
は、牛のひき肉と類似の外観、質感、および風味であった。パテ形式で調理するほかに、
未形成の材料はまた、タコスの具、キャセロール、ソース、トッピング、スープ、シチュ
ー、またはローフなど様々な料理に用いることができる。

30

40

【 実施例 2 9 】

【 0 1 7 7 】

1 0 % の肉の生地を有するハンバーガーの組み立ておよび調理

表 1 8 の成分を含有するレプリカハンバーガーを調製した。

【 0 1 7 8 】

(59)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【表18】

表 18
ハンバーガーの組成

成分	%
肉の生地(実施例 17)	10
脂肪エマルジョン(実施例 23)	20
軟らかい結合組織(実施例 7)	36
血液寒天(実施例 22)	13.0
水和液体	10.5
ダイズコングリシニン、乾燥	10.5
合計	100.0

10

【0179】

冷却した肉の生地を、食品グラインダー付属品(KITCHENAID(登録商標) Professional 600 Series 6 Quart Bowl-Lift Stand Mixer model KP26M1XERおよびKITCHENAID(登録商標) Food Grinder model FGA、St. Joseph、MI)を取り付けたスタンドミキサーを用いて、速度設定1で挽いた。軟らかい結合組織を、鈍い刃を取り付け、低速で20〜30秒間運転したUniversal Machine(UM-12、Stephen Machinery GmbH、Schwarzenbeck、Germany)を用いて細長く切った。風味を付けたエマルジョンを、−20℃まで冷却し、次いで、SALADSHOOTER(登録商標) National Presto Industries、Inc、Eau Claire、WI)で刻んで、長さ1〜3mmの切片を得た。次いで、ひき肉生地、細長く切られた軟らかい結合組織、風味を付けたエマルジョン片、および乾燥ダイズコングリシニンを混合した。混合中、混合物を−5から4℃で維持して、脂肪を溶融しないようにした。次いで、水和液体(実施例22に記載されている通りレグヘモグロビンおよび17×液体マジックミックスが1:1の混合物)を加え、混合物を最低15分間4℃で保持して、乾燥ダイズコングリシニンを水和させた。最後に、血液寒天を加え、完全に取り込まれるまで混合した。合計パッチサイズは、200gであった。次いで、挽いた組織の部分50gを、手で円形のパテ形に形成した。パテ50gの典型的な寸法は、55mm×15mmであった。パテを調理するまで冷蔵した。パテを予熱した(325〜345°F)焦げ付かないフライパンで調理し、毎分ひっくり返ししながら内部温度170°Fまで加熱した。調理されたパテは、牛のひき肉と類似の外観、質感、および風味であった。パテ形式で調理するほかに、未形成の材料はまた、タコスの具、キャセロール、ソース、トッピング、スープ、シチュー、またはローフなど様々な料理に用いることができる。

20

30

【実施例30】

40

【0180】

「タコスミート」の組み立ておよび調理

表19の成分を含有する「タコスミート」レプリカを調製した。

【0181】

(60)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 1 9 】

表 19
ハンバーガーの組成

成分	%
肉の生地 (実施例 17)	29.9
脂肪エマルジョン(実施例 23)	22.3
軟らかい結合組織(実施例 7)	21.5
血液寒天(実施例 22)	14.5
水和液体	11.7
合計	100.0

10

【 0 1 8 2 】

冷却した肉の生地を挽き、軟らかい結合組織を細長く切り、風味を付けたエマルジョンを実施例 2 8 に記載されている通り刻んだ。次いで、ひき肉生地、細長く切られた軟らかい結合組織、および風味を付けたエマルジョン片を混合した。混合中、混合物を - 5 から 4 °C で維持して、脂肪を溶融しないようにした。次いで、水和液体 (実施例 2 2 に記載されている通りレグヘモグロビンおよび 1 7 × 液体マジックミックスが 1 : 1 の混合物) および血液寒天を加え、混合した。合計パッチサイズは、2 0 g であった。次いで、混合した組織を、予熱した (3 2 5 ~ 3 4 5 ° F) 焦げ付かないフライパンで 1 6 0 ° F までで調理した。調理された組織は、牛のひき肉と類似の外観、質感、および風味であった。この物質は、外観がタコスミートに似ており ; 7 S タンパク質を含まなくても、この肉は、共に等しく硬くならず固着しなかった。

20

【 実施例 3 1 】

【 0 1 8 3 】

マスキング剤としてのラクトンの使用

ラクトンを、溶解性に応じて水または油に希釈した。次いで、希釈したラクトンを、表 2 0 に示される通り、風味を付けたエマルジョン (実施例 2 3) に加え、ホモジナイズした。ラクトンの最終濃度を、表 2 0 に示す。風味を付けたエマルジョンを、ひき肉 (例えば、タコスミート) (食肉レプリカのすべての構成成分は、R u B i s C O を含まない) の最終の 2 0 % のために加えた。風味を付けたエマルジョンを、例 1 7 に示した通りであるが R u B i s C O を含まず、肉の生地、結合組織、マジックミックスおよびヘムと混合した。次いで、ひき肉は、全体的な味、異臭の任意の減少、および全体的な改善について、5 名の訓練を受けたフレーバーサイエンティストによって試験された。まとめた結果を、表 2 0 に示す。特定のラクトンおよびラクトンの組合せを加えると、穀物、卵のような、苦味、肝臓のような、およびマッシュルームを含めた、異臭が低減された。苦味のような特定のマスキング特性のために独自の組合せを必要とした。ラクトンはまた、クリームのような、バターのような、カラメルになった、脂っこい、新鮮な、およびフルーツのような所望の風味を増した。

30

40

【 0 1 8 4 】

(61)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【表 20 ~ 1】

表 20

食肉レプリカ中でマスキング剤としてのラクトンの添加に関する感覚によるデータ

化合物	試験され た肉の濃 度(%)	化合物	試験され た肉の濃 度(%)	化合物	試験され た肉の濃 度(%)	対照より好 んだ食味検 査員の%	一般的な風味 の記述語	異臭のマス キングまた は防止?
ブチロラクトン	2.5×10^{-9}	γ -オクタラクトン	2.5×10^{-8}	-	-	80%	酸っぱい、香 ばしい	苦味
δ -トリデカラクト ン	2.5×10^{-5}	5-エチル-4-ヒドロキシ-2- メチル-3(2H)-フラノン	2.5×10^{-6}	-	-	75%	塩味、香ばし い、クリーム のような/バタ ーのような	苦味
ジヒドロ-5-メチル- 2(3H)-フラノン	2.5×10^{-8}	5-エチル-4-ヒドロキシ-2- メチル-3(2H)-フラノン	2.5×10^{-6}	-	-	75%	刺激の少な い、脂っこ い、塩味	苦味、穀物
ジヒドロ-5-メチル- 2(3H)-フラノン	2.5×10^{-8}	5-エチル-4-ヒドロキシ-2- メチル-3(2H)-フラノン	2.5×10^{-6}	δ -トリデカラ クトン	2.5×10^{-6}	83%	バターのよう な、脂っこ い、鮮明であ る/苦い、香ば しい	卵のよう な、穀物
ジヒドロ-5-メチル- 2(3H)-フラノン	2.5×10^{-8}	5-エチル-4-ヒドロキシ-2- メチル-3(2H)-フラノン	2.5×10^{-6}	δ -トリデカラ クトン	2.5×10^{-6}	83%	わずかに甘 い、脂っこい	穀物

【 0 1 8 5 】

50

(62)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【表20～2】

ブチロラクトン	2.5×10^{-8}	5-エチル-4-ヒドロキシ-2- メチル-3(2H)-フラノン	2.5×10^{-6}	γ -オクタラク トン	2.5×10^{-7}	83%	クリームのよ うな、金属に 似た	卵のような
γ -デカラクトン	5×10^{-5}					40%	キャラメルにな った/香りが甘 い、塩味	穀物
δ -トリデカラクト ン	5×10^{-5}					60%	キャラメルにな った/香りが甘 い	マッシュル ーム
δ -ドデカラクトン	1×10^{-5}					60%	バターのよう な、脂っこい/ 油っこい、わ ずかに牛肉の ような	穀物
4-ヒドロキシ-2,5- ジメチル-3(2H)-フ ラノン	1×10^{-5}					60%	わずかに甘い/ キャラメルにな った	穀物
γ -オクタラクトン	1×10^{-5}					80%	脂っこい、甘 い/キャラメルに なった	穀物
ブチロラクトン	2.5×10^{-8}					83%	鮮明である/切 れがある/苦 い、甘い、脂 っこい	卵のような

【0186】

50

40

30

20

10

(63) JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 2 0 ~ 3 】

卵のよう な、穀物	プロスのよう な、脂っこい	83%					5*10 ⁹	δ-テトラデカラク トン
卵のよう な、穀物	おだやかに香 ばしい、わず かな甘さがあ る	100%					5*10 ⁹	ジヒドロ-5-メチル- 2(3H)-フランolin

10

20

30

40

【 実施例 3 2 】

50

(64)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【0187】

肉のような脂肪風味の創出のための多価不飽和脂肪の添加

藻類植物油(DSM life's omega 45 02412-0100)を、食肉レプリカ中の最終濃度0.07%について、風味を付けたエマルション(実施例23)に加え、次いで、ホモジナイズした。風味エマルションを、実施例27に記載されている通り、レプリカに加えた。藻類植物油を加えると、訓練を受けたフレーバーサイエンティストによって記載された通り、獣脂の味、脂肪質、および全体的な肉のような特質が増したレプリカになった。

【0188】

藻類油を添加すると、脂っこいフレーバー分子の創出のために必要であるエイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸を含めた、前駆物質が増加した。SPMEガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)によって検出された通り、藻類油を含まない対照と比較して、藻類油を前駆物質のミックスおよびヘモグロビンに添加することにより、ノナン、(E,E)-3,5-オクタジエン-2-オン、1-ヘプテン-3-オール、1-ペンテン-3-オン、2-プロピルフラン、n-カブロン酸ビニルエステル、3-エチル-2-メチル-1,3-ヘキサジエン、1-エチル-5-メチルシクロペンテン、trans-2-(2-ペンテニル)フラン、1-ペンテン-3-オール、4,7-ジメチルウンデカン、1-オクタノール、3-エチルピリジン、3-エチルシクロペンタノン、(Z)-2-オクテン-1-オール、2-n-ヘプチルフラン、(Z)-2-デセナール、ヘキサノール、(E,E)-2,4-ノナジエナール、6-メチル-2-ヘプタノン、(Z)-2-ヘプタナール、(E,E)-2,4-ヘプタジエナール、1-ヘキサノール、(E,E)-2,4-デカジエナール、(E,Z)-2,6-ノナジエナール、および1-オクテン-3-オールを含めた風味を創出した。

【実施例33】

【0189】

食肉レプリカのためのウリ属(Cucumis)スラリーの創出

ゆでたキュウリスラリーを創出するため、(皮を剥かずに、または別の方法でばらばらにして)浸透させなかった新鮮な種類のキュウ리를丸ごと用いた。水浴は、80~90℃まで加熱し、キュウ리를丸ごと水浴に入れ、キュウリの内部温度が水浴の温度と平衡するまで、本実施例の場合およそ30分間調理した。次いで、水浴からキュウ리를引き上げ、キュウリの皮を身から完全に取除いた。キュウリの身を種子とブレンドし、次いで、ふるいにかけて、より大きい微粒子物のいずれかを分離した。次いで、ブレンドしたキュウリの身をスラリーとして用い、食肉レプリカに加えた。ハネデュメロンおよびカンタロープを含めたウリ属(Cucumis)の他の品種でこの同じ方法を用いた。

【実施例34】

【0190】

溶媒によって補助された風味抽出を用いたウリ属(Cucumis)抽出物の創出

抽出物を、溶媒によって補助された風味抽出(SAFE:solvent assisted flavor extraction)、および溶媒として水を用いて創出した。SAFEは、圧力を加え、温度をわずかに上昇させた材料の外にフレーバー化合物を引き出すことにより行われる。

【0191】

抽出物を、新鮮な種類のキュウリの皮をすべて取り除き、キュウ리를細断することにより創出し、次いで、特効薬とブレンドした。次いで、キュウリスラリーを、Edwards 12床用電気掃除機(floor vacuum)を用いて圧力下にある、SAFEガラス製品の試料の注入口に注ぎ入れ、温度を、水ポンプおよび試料丸底フラスコのための温水浴で40℃に設定した。少量(試料2~4mL)のキュウリスラリーを、試料丸底フラスコに入れた。試料丸底フラスコに移動させたとき、スラリーは、直ちに沸騰するようにみえた。目に見えて沸騰が停止したとき、より多く試料体積を試料丸底フラスコに加えた。試料全体がSAFEガラス製品装置に入るまで、これを続けた。試料全体がなくなったら、水浴が40℃に達するにつれて試料を抽出し続け、次いで、さらに20分間抽出した。抽出が

(65)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

行われるとき、収集丸底フラスコを、液体窒素に沈め、コールドフィンガー注入口を、液体窒素で満たした。次いで、抽出物を、収集丸底フラスコから収集した。

【実施例35】

【0192】

ゲル状の基質に加えることにより肉のような特質および脂肪質を増加させるためのウリ属 (Cucumis) 液体の食肉レプリカへの添加

実施例22で概説した血液寒天を、DI水の代わりにウリ属 (Cucumis) 液体を加えることを除いて記載された通り、作製した。ウリ属 (Cucumis) 液体は以下のうち1つであった。(i) DI水2%で加えた、カンタロープメロン由来の市販の水抽出物、(ii) ~ (v) 実施例33に記載されている通り、ハネデューメロン (6.25%) またはキュウリ (3.2%) の調理済みもしくは調理されていないスラリー、または (vi) 実施例34に記載されている通り、キュウリ (加圧蒸留物) の溶媒によって補助されたフレーバー抽出物。これらのキュウリおよびメロン抽出物を加えることにより、肉のような風味プロファイルのある特定の要素が、レプリカの全体的な嗜好および肉のような特質を強化した。SPME-GC-MSによって実証され、訓練を受けたフレーバーサイエンティストによりGC-Oを用いて臭気活性化合物と確認された通り、化合物の多くは、アルデヒド、ラクトンであり、それらの多くは、牛肉において見られる。牛肉とウリ属 (Cucumis) との間で類似する化合物には、それだけには限らないが、ノナナール、2-デセナール、2-ノネナール、2-ヘプテナール、2,6-ノナジエナール、2,4-デカジエナール、2-ウンデセナール、2-オクテナール、2-ノネナール、ドデカナール、2,4-ヘプタジエナール、2,6-ノナジエナール、2,4-ノナジエナール、2,4-オクタジエナール、デカナール、5-(メチレンシクロプロピル)-ペンタナール、6-ノネナール、3,7-ジメチル1,6-オクタジエン-3-オール、2-ノネン-1-オール、3-ノネン-1-オール、3,5-オクタジエン-2-オン、2,3-ブタンジオン、2-メチルシクロペンタノン、2-ブタノン、α-イオノン、6-オクテン-2-オン、ジヒドロ-5-ベンチル-2(3H)-フランオン、1-メントン、n-カプロン酸ビニルエステル、4-メチルオクタン酸、および酢酸エチルエステルが含まれる。

【0193】

抽出物を含む血液寒天が、実施例30に記載されている通り、食肉レプリカに加えられる場合、甘い芳香、脂肪質、いくつかの場合において、獣脂および牛肉のような風味が高まった。5名の訓練を受けたフレーバーサイエンティストによる、対照および盲検の対照において示されなかった追加の風味の香気の十分な説明について、表21を参照のこと。さらに、これらのメロンおよびキュウリ抽出物の添加によって、穀物のような、土のような、木のような、および渋みのある臭いを含めた異臭の認識も減ったことが観察された。

【0194】

これらの抽出物のうちの3つを、8名の訓練を受けたパネリストを含む正式な記述的パネルで試験し、対照、80:20牛肉、およびウリ属 (Cucumis) 液体を含む3種の追加の試料 (調理済みのキュウリスラリーは最終タコスミートの0.37%で試験され、調理済みのハネデュースラリーは最終タコスミートの0.73%で試験され、カンタロープ抽出物 (TREATT製) は最終タコスミートの0.24%で試験された) とは表示されない盲検対照として表示された1つの対照レプリカと比較した。結果では、3つすべての試料は、脂肪質および甘い芳香が高く、土のような、穀物のような、渋みのある、および青っぽい腐った香気が減ったと評価されたことが示された。カンタロープ抽出物は、牛肉において味わわれるものと違って甘いメロン風味の対照からの追加の腐った香気を有した。他の2つの試料である、実施例33に記載されている通り作製された、調理済みのハネデュースラリーおよびキュウリスラリーは共に、両方の対照よりも肉のような特質および脂肪質が高く、記載された追加の腐った香気を有さなかったと評価された。

【0195】

(66)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

【 表 2 1 】

表 21

ウリ属(Cucumis)液体を食肉レプリカに加えることによる風味の説明

ウリ属 (Cucumis) 液体	タコスに加えた場合の風味の説明	
	望ましい風味の増加	望まれない 風味の減少
調理済みの ハネデュー スラリー	脂っこい、バター、新鮮な、甘い、食欲をそそる、 および脂っこさが口全体を覆う	青っぽい、 穀物、土の ような
調理済みの キュウリス ラリー	牛脂、よりバターのような、脂っこい、新鮮な、果 物、脂っこさが口全体を覆う	青っぽい、 穀物、土の ような
ハネデュー スラリー	香ばしい、メロン、わずかにバター、豚肉、甘い芳 香、脂っこい、食欲をそそる、口全体を覆う	青っぽい、 穀物、土の ような
キュウリス ラリー	フルーツのような、脂っこい、キュウリ、野菜スト ックおよびメロン	青っぽい、 穀物、土の ような
カンタロー ブ抽出物	甘い、フルーツのような、芳香、わずかにバター、 メロン、キャンディー	青っぽい、 穀物、土の ような
キュウリ SAFE	鶏のようでない、新鮮さ、甘い、ほとんどキュウリ でない	青っぽい、 穀物、土の ような

10

20

30

【 0 1 9 6 】

他の実施形態

本発明は、その詳細な説明と併せて記載されており、前述の説明は、例証であり、本発明の範囲を制限するものではなく、添付した特許請求の範囲の範囲によって定義されるものと理解されるべきである。他の態様、利点、および修正は、以下の特許請求の範囲内である。

40

(67)

JP 2017-509349 A 2017.4.6

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/023679
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A23J 3/22 (2015.01) CPC - A23J 3/227 (2015.05) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A23J 3/14, 3/22 (2015.01) CPC - A23J 3/14, 3/227 (2015.05) (keyword delimited) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 420/573, 574 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Public AppFT and PatFT, Google Scholar Search terms used: "meat replica" isolated plant protein dough cucumis juice cucumber food flavor meat vegetarian		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2008/0254199 A1 (ORCUTT et al) 18 October 2008 (15.10.2008) entire document	99, 100, 103, 104 28-34, 77-83, 87-94, 101, 102, 113
Y	WQ 2013/010042 A1 (SAND HILL FOODS INC) 17 January 2013 (17.01.2013) entire document	1-3, 18-27, 33-36, 85-94, 110-113
Y	US 2006/0204644 A1 (CAVALLINI et al) 14 September 2006 (14.09.2006) entire document	1-3, 18-36, 77-83, 110-113
Y	US 2002/0034570 A1 (KRAMMER et al) 21 March 2002 (21.03.2002) entire document	75, 76, 85, 86, 97, 98
Y	US 2003/0212281 A1 (SINHA et al) 13 November 2003 (13.11.2003) entire document	75, 76, 85, 86, 97, 98
Y	WQ 2013/010037 A1 (LYRICAL FOODS INC) 17 January 2013 (17.01.2013) entire document	75, 76, 97, 98
Y	US 2010/0310736 A1 (LUDWIG) 09 December 2010 (09.12.2010) entire document	81, 82, 91, 92, 101, 102
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 May 2015		Date of mailing of the international search report 28 AUG 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Blaine R. Copenhagen PCT Number: 571-273-4300 PCT DSP: 571-273-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

(68)

JP 2017- 509349 A 2017. 4. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2015/023679

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-17, 37-74, 84, 86, 98, 106-109
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2009)

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BYGH OMKE, LR, LS, MYNZ, NA, RWSD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW, EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM, EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RQ, RS, SE, SI, SK, SM, TR, OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG, AE, AG, AL, AM, AQ, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DQ, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, N, NQ, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RQ, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (72) 発明者 ヴァラダン, ランジャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 3 6 , フレモント, スケルトン コート 1 5 8 0
- (72) 発明者 ソロマトン, セルゲイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 4 0 , マウンテン ビュー, ヒルウッド コート 4 2 2
- (72) 発明者 ホルツシーティングー, セレスト
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , イースト バロ アルト, セージ ストリート 1 1 5 9
- (72) 発明者 コーン, エリシア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 4 1 , マウンテン ビュー, カリフォルニア ストリート 1 8 8 5 , アパートメント 4 9
- (72) 発明者 クラフォルツブラウン, アリエル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 6 2 , レッドウッド シティ, サファイア ストリート 4 4 1
- (72) 発明者 シウ, ジェニファー ウォーン- イ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 0 , サンフランシスコ, フェア アベニュー 3 8
- (72) 発明者 ケール, アニケット
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 4 0 4 , フォスター シティ, カタマラン ストリート 6 4 1 , アパートメント 3
- (72) 発明者 カール, ジェシカ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 0 7 , サンフランシスコ, カンサス ストリート 4 5 6
- (72) 発明者 フラサー, レイチェル
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 0 , サンフランシスコ, 2 4 ティーエイチ ストリート 3 6 5 3 , アパートメント 2
- F ターム(参考) 4B001 AC20 AC21 AC22 AC25 AC99 B008 E001
4B035 LC01 LC04 LG12 LG15 LG32

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	43903939
Application Number:	15913090
International Application Number:	
Confirmation Number:	9878
Title of Invention:	METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES
First Named Inventor/Applicant Name:	Rachel Fraser
Customer Number:	26191
Filer:	Heather L. Flanagan/Karissa Robinson
Filer Authorized By:	Heather L. Flanagan
Attorney Docket Number:	38767-0015008
Receipt Date:	29-SEP-2021
Filing Date:	06-MAR-2018
Time Stamp:	16:33:08
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	no				
File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Information Disclosure Statement (IDS) Form (SB08)	IDS.pdf	353825 f5ebf9e105960ece280f6f85f312eae9ec3c8362	no	4
Warnings:					

Information:					
This is not an USPTO supplied IDS fillable form					
2	Foreign Reference	JP2010200627.pdf	442833	no	11
			b36b68428a59ca0f9e5da6ca12b30a10be9c0590		
Warnings:					
Information:					
3	Foreign Reference	JP2017509349.pdf	5267036	no	70
			443e57c6879dcf4532c5d5ce272519ce9a1952d6		
Warnings:					
Information:					
4	Non Patent Literature	EESR_211613245_09-22-2021.pdf	756448	no	12
			6d2e8ff53bdcaea465f447b5857503818a497e91		
Warnings:					
Information:					
5	Non Patent Literature	KOLODYAZNAYA_Pishchevaya Khimiya.pdf	1205479	no	4
			cab3c63c02474efa1478092376ad86fa863ac5d8		
Warnings:					
Information:					
6	Non Patent Literature	LISITSIN_AnaloguesOfMeat.pdf	2166994	no	6
			e9ff5c5275ab2aa91bd9c4ac6b9a0a9313b36224		
Warnings:					
Information:					
Total Files Size (in bytes):			10192615		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111

If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371

If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office

If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Doc code: IDS

Doc description: Information Disclosure Statement (IDS) Filed

PTO/SB/08a (02-18)

Approved for use through 11/30/2020. OMB 0651-0031

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number	15913090
	Filing Date	2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser
	Art Unit	1796
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney
	Attorney Docket Number	38767-0015008

U.S.PATENTS						
Examiner Initial*	Cite No	Patent Number	Kind Code ¹	Issue Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
	1					

If you wish to add additional U.S. Patent citation information please click the Add button.

U.S.PATENT APPLICATION PUBLICATIONS						
Examiner Initial*	Cite No	Publication Number	Kind Code ¹	Publication Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
	1					

If you wish to add additional U.S. Published Application citation information please click the Add button.

FOREIGN PATENT DOCUMENTS								
Examiner Initial*	Cite No	Foreign Document Number ³	Country Code ²	Kind Code ⁴	Publication Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁵
	1	KR 1020090110423	KR		2009-10-22	NAT UNIV CHONBUK IND COOP		☒

If you wish to add additional Foreign Patent Document citation information please click the Add button

NON-PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc), date, pages(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁵

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number		15913090
	Filing Date		2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser	
	Art Unit	1796	
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney	
	Attorney Docket Number	38767-0015008	

	1		☐
If you wish to add additional non-patent literature document citation information please click the Add button			
EXAMINER SIGNATURE			
Examiner Signature		Date Considered	
*EXAMINER: Initial if reference considered, whether or not citation is in conformance with MPEP 609. Draw line through a citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.			
¹ See Kind Codes of USPTO Patent Documents at www.USPTO.GOV or MPEP 901.04. ² Enter office that issued the document, by the two-letter code (WIPO Standard ST.3). ³ For Japanese patent documents, the indication of the year of the reign of the Emperor must precede the serial number of the patent document. ⁴ Kind of document by the appropriate symbols as indicated on the document under WIPO Standard ST.16 if possible. ⁵ Applicant is to place a check mark here if English language translation is attached.			

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number		15913090
	Filing Date		2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser	
	Art Unit	1796	
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney	
	Attorney Docket Number	38767-0015008	

CERTIFICATION STATEMENT

Please see 37 CFR 1.97 and 1.98 to make the appropriate selection(s):

☐ That each item of information contained in the information disclosure statement was first cited in any communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application not more than three months prior to the filing of the information disclosure statement. See 37 CFR 1.97(e)(1).

OR

☐ That no item of information contained in the information disclosure statement was cited in a communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application, and, to the knowledge of the person signing the certification after making reasonable inquiry, no item of information contained in the information disclosure statement was known to any individual designated in 37 CFR 1.56(c) more than three months prior to the filing of the information disclosure statement. See 37 CFR 1.97(e)(2).

☐ See attached certification statement.

☐ The fee set forth in 37 CFR 1.17 (p) has been submitted herewith.

☒ A certification statement is not submitted herewith.

SIGNATURE

A signature of the applicant or representative is required in accordance with CFR 1.33, 10.18. Please see CFR 1.4(d) for the form of the signature.

Signature	/Heather L. Flanagan/	Date (YYYY-MM-DD)	2021-10-28
Name/Print	Heather L. Flanagan	Registration Number	54,101

This collection of information is required by 37 CFR 1.97 and 1.98. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 1 hour to complete, including gathering, preparing and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. **DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether the Freedom of Information Act requires disclosure of these records.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspections or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

patSnap

Patent

Start your search with a keyword, company name, patent number etc.



KR1020090110423A

Withdrawn

헴철-폴리펩타이드 복합체를 이용한 철 보충용 음료의 제조

English

Abstract

Claims

Description

Images (4)

PDF

Valuation

Legal

Citation

Family

Similar Patents

[Translation] Title: Use of Heme-iron polypeptide as iron supplement in beverage

본 발명은 헴철-폴리펩타이드 복합체를 이용하여 액상의 식품원료나 액상의 철보충용 건강기능식품 또는 식품료를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 흡수율이 높은 철공급원 중의 하나인 헴철-폴리펩타이드 복합체의 제조공정을 개선하여 액상의 헴철-폴리펩타이드 재료를 제조하는 기술과, 분말상으로 제형화된 헴철-폴리펩타이드를 물(정제수)에 용해하여 액상의 헴철-폴리펩타이드 재료를 제조하는 기술, 그리고, 최적의 풍미와 기호도를 보유하고 있으며, 정도편리가 가동한 철 보충용 건강기능식품용 음료의 배합 방법에 관한 것이다.

[Translation]

PURPOSE: A method for preparing an iron-supplementary drink using heme-iron polypeptide is provided as an anemia medicine or food additive. CONSTITUTION: A method for preparing an iron-supplementary drink using heme-iron polypeptide comprises the following steps. A heme-iron polypeptide composite is dissolved in purified water to obtain a heme-iron polypeptide composite solution. The iron-supplementary drink contains the heme-iron polypeptide composite therein. The heme-iron polypeptide composite solution does not precipitate or gelate in the concentration of 10%(w/v) or less. The iron-supplementary drink can contain heme-iron polypeptide composite powder and food additives.

18 Apr 2008

KR1020080036017

Application Date

Current Patent

Application Number

22 Oct 2009

KR1020090110423A

First Publication Date

Current Patent

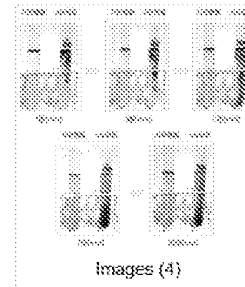
Publication Number

Patent Authority & Type

Applications (Korea)

Value (USD)

Unavailable



Images (4)

Standardized Current Assignee

INDIAL COOPERATION FOUND CHONBUK NAT UNIV

Current Assignee

전북대학교산학협력단 (INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY)
전라북도 전주시 덕진구

Standardized Original Assignee (Applicant)

INDIAL COOPERATION FOUND CHONBUK NAT UNIV

List

2 Patents

Search Results

1 KR1011020701

발명의 명칭 누수 방지형 정수기

2 KR1020090110423A

헴철-폴리펩타이드 복합체를 이용한 철 보충용 음료의 제조

Help

공개특허 10-2009-0110423

	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호	10-2009-0110423
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자	2009년10월22일
(51)	Int. Cl.	(71)	출원인
	A23L 2/38 (2006.01) A23L 2/52 (2006.01)		전북대학교산학협력단
	A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)		전라북도 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14 본부
(21)	출원번호		별관 3층
	10-2008-0035917	(72)	발명자
(22)	출원일자		한명관
	2008년04월18일		전북 전주시 완산구 중화산동2가 하늘채아파트
	심사청구일자		110동 101호
	없음		김우현
			전북 전주시 덕진구 송천동1가 현대4차아파트 40
			2동 503호
		(74)	대리인
			김순웅

전체 청구항 수 : 총 3 항

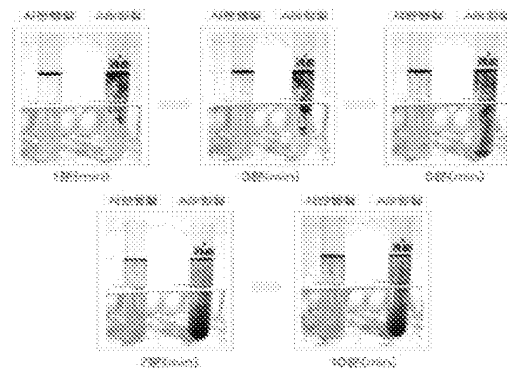
(54) 헵탈-폴리펩타이드 복합체를 이용한 철 보충용 음료의제조

(57) 요약

본 발명은 헵탈-폴리펩타이드 복합체를 이용하여 액상의 식품원료나 액상의 철보충용 건강기능식품 또는 식음료를 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 흡수율이 높은 철공급원 중의 하나인 헵탈-폴리펩타이드 복합체의 제조공정을 개선하여 액상의 헵탈-폴리펩타이드 재품을 제조하는 기술과, 분말상으로 제조화된 헵탈-폴리펩타이드를 물(정제수)에 용해하여 액상의 헵탈-폴리펩타이드 재품을 제조하는 기술, 그리고, 최적의 풍미와 기호도를 보유하고 있으며, 경도관리가 가능한 철 보충용 건강기능식품용 음트의 배합 방법에 관한 것이다.

도 1



공개특허 10-2009-0110423

특허청구의 범위

청구항 1

헴철-폴리펩타이드 복합체를 들(정제수)에 용해하여 헴철-폴리펩타이드 복합체 액을 제조하는 방법.

청구항 2

헴철-폴리펩타이드 복합체를 함유하는 액상의 건강기능성 식품 (철 보충용)을 제조하는 방법.

청구항 3

헴철-폴리펩타이드 복합체를 함유하는 액상의 식품을 제조하는 방법.

발명 상세 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 헴철-폴리펩타이드 복합체를 이용하여 액상의 식품원료나 액상의 철보충용 건강기능식품 또는 식료를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 철분은 생체 내에서 중요한 무기질로 산소운반에 필수적인 역할을 한다. 우리나라에서 철분의 1일 권장량은 소아가 10-12 mg, 성인남자 12 mg, 성인 여자 18 mg, 임산부 26-30 mg, 수유부는 20 mg이다. 식품 중 철분은 헴철 (heme iron)과 비헴철 (non-heme iron)의 2가지 형태로 존재하며 동물성 식품 중의 철 함량의 평균 40 %가 헴철형이고 나머지 60 %가 비헴철형으로 식물성 식품 중의 철은 모두 비헴철형으로 존재한다.

<3> 헴철은 대부분 헤모글로빈과 마이오글로빈의 형태로 섭취되며 흡수율이 매우 높고 다른 식재료에 의하여 영향을 받지 않으나 비헴철의 흡수는 여러가지 요인에 의하여 영향을 받으며 식품의 종류에 따라 큰 차이가 있다. 육류식품에서의 철의 흡수율은 10 % 가량이며 곡류의 경우 5 % 이하여서 다량을 섭취하여야 한다. 또한 개인의 철 영양상태에 따라서도 흡수율은 영향을 받는다. 여성과 어린이들과 같이 체내 보유량이 적으면 흡수율은 높아지고 남성처럼 철 저장량이 높으면 낮아진다. 이와 같이 철분의 흡수율은 섭취한 철분의 형태 및 다른 식재료의 존재, 체내 철분 저장상태에 영향을 받으며 통상 건강인은 섭취한 철분의 5 % 정도만을 흡수하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 철의 결핍은 전 세계적으로 가장 흔한 영양문제로 그 원인은 부적절한 섭취, 철 흡수의 불량, 빠른 성장과 혈액손실, 반복되는 임신 등 의한 저장 철의 고갈 등이다. 철 결핍의 위험이 높은 시기는 급격한 신체성장이 이루어지는 6개월-4세의 영유아기, 사춘기, 월경혈의 손실이 있는 가임기여성, 철의 요구가 증가하는 임산기이며 특히 영 유아와 임산부는 철 결핍이 되기 쉬운 것으로 알려져 있다. 철 결핍을 예방, 치료하기 위하여 염화 제2철 (ferric chloride), 구연산 철 (ferric citrate), 구연산 철 암모늄 (ferric ammonium citrate), 호박산 구연산 철 나트륨 (iron and sodium succinate citrate), 젖산 철 (ferrous lactate), 피로인산 제2철 (ferric pyrophosphate), 헴철 (heme iron) 등의 철 화합물이 식품의 철 강화제 및 제약 원료로 사용되고 있다.

<4> 인간은 매일 1 mg의 철이 장내 상피세포를 통하여 소실되므로 이를 보충하기 위해서는 1 mg의 철흡수가 필요하다. 위에서 설명한 흡수율 7%를 고려한다면 1 mg의 철 흡수를 위해서는 음식물로부터 매일 15 mg의 철을 섭취해야 한다. 빈혈환자의 경우는 매일 10 mg의 철 흡수가 필요하며 이를 위해서는 무기철 50-150 mg (흡수율 7% 고려)의 철분을 투여하고 있다. 그러나 흡수되지 않고 남은 철은 장을 자극하여 변비 등을 비롯한 소화기 장애가 발생하여 장이 민감한 빈혈환자에게서 문제가 되고 있다. 따라서 흡수율이 좋은 빈혈 치료제 개발이 절실히 요구되고 있다.

<5> 철 화합물 중 헴철을 제외한 나머지는 무기철 성분으로 철 함량이 높고 경제적으로 저렴한 장점이 있으나 생체에서 흡수율이 낮고 과잉 섭취시 철 중독을 유발할 수 있는 단점이 있어 점차 흡수율이 높고 부작용이 없는 유기철 성분인 헴철의 사용량이 증가하고 있다. 현재까지 가장 흡수율이 좋은 철 형태는 헴철 (정확한 표현은 헴철-폴리펩타이드 복합체)로 알려져 있다(흡수율 35%). 헴철은 무기철과는 달리 장내 특이 수용체에 의해

공개특허 10-2009-0110423

약 35% 정도가 흡수되고 비록 흡수되지 않는 철이라도 장을 자극하지 않는 형태로서 체내 부작용이 없다.

- <6> 헴철의 많은 장점에도 불구하고 철분시장에서의 점유율이 미미한 이유는 국내시판 헴철이 물에 용해되지 않는 수입산 헴철을 원료로 사용하고 있기 때문이다. 헴철이 용해도와 흡수성이 좋은 이유는 철분자를 단백질 부분이 물리싸고 있는 구조를 가지고 있어, 단백질 부분이 물분자와 반응하여 용해가 되며, 또한 이 단백질 부분이 철 수용체와 반응하기 때문인데, 물에 용해되지 않는 헴철은 그러한 기능을 할 수 없어서 결국 시장에서 외면을 당하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하고자 하는 과제

- <7> 이에 본 발명에서는 물에 용해되는 헴철을 대량 생산할 수 있는 방법을 선행적으로 개발하였으며, 이러한 용해도가 높은 헴철의 장점을 극대화하기 위한 액체 형태의 헴철을 생산할 수 있는 방법을 개발하였다.

- <8> 즉, 본 발명은 용해도가 높은 헴철 (본 발명에 의해 생산되는 헴철-폴리펩타이드 복합체의 형태로서 이후 부록 '헴철-폴리펩타이드 복합체'로 표기함)을 바탕으로 액상의 헴철-폴리펩타이드 복합체와 그를 이용한 식음료, 철 보충용 건강기능식품을 제조하는데 목적이 있다.

과제 해결수단

- <9> 이러한 본 발명의 기술적 과제는 동물의 전혈 또는 응고혈을 여러 공정으로 가공하여 얻어진 액상의 헴철-폴리펩타이드 복합체와 분말상 헴철-폴리펩타이드를 물에 재용해하여 풍미와 기호도를 향상시킨 철 보충용 식음료 또는 건강 기능식품의 조성을 확립함으로써 달성하였다.

- <10> 즉, 본 발명은 흡수율이 높은 철 공급원 중의 하나인 헴철-폴리펩타이드 복합체를 철보충용 식음료 또는 건강 기능식품을 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 용해도가 높은 고순도의 헴철-폴리펩타이드 복합체를 이용한 철 보충용 식음료 또는 건강 기능식품의 첨가물로 사용하는 것과, 풍미도와 기호도를 향상시키는 조성을 제시하는 것이다.

- <11> 본 발명은 (주)에이비아이에서 전혈 또는 응고혈을 이용하여 제조한 헴철-폴리펩타이드 복합체 분말은 용해도가 우수하여 물(정제수)에도 용해가 되므로 이를 용해하고 살균하여 액상으로 제품을 생산할 수 있다. 이때 얻어지는 용해액은 흑갈색의 액체로서 자연조건에서 최대 10% (w/v)의 수용액을 제조할 수 있다. 조건을 달리하면 더 높은 농도의 수용액을 제조할 수 있으나 보관 환경에 따라 파포화로 인한 침전이 일어날 수 있다. 철의 함량 등은 용해할 때의 헴철-폴리펩타이드 복합체 분말과 물의 비율로서 계산하여 얻을 수 있다.

- <12> 그러나 현재 대한민국 내에서 유통되고 있는 헴철은 중성부근의 용액에 전혀 용해되지 않아서 수용액상의 철보충용 식음료 또는 건강 기능 식품을 제조하는데 어려움이 있었고, 풍미와 기호도를 조절하는데 문제점이 있었다. 본 발명은 헴철-폴리펩타이드의 식음료 및 건강 기능식품에 최적의 용해도와 풍미, 기호도를 향상시키는 발명을 완성하였다.

효과

- <13> 본 발명에서 사용한 헴철-폴리펩타이드 복합체의 높은 용해도는 pH 중성 부근의 십이지장부터 시작되는 철분의 흡수효율을 높여주므로 좋은 빈혈치료제로 사용될 수 있을 뿐 아니라 식품 첨가물로서도 높은 효용성을 갖는다. 또한, 보다 나은 흡수효율을 위해서 액체 형태의 헴철-폴리펩타이드 복합체를 얻을 수 있게 되어 제조 공정상의 비용감소와 더불어 현재 유통되어지는 캡슐이나 정제형태의 철분제를 대체하는 액체철분제가 될 수 있을 것이며, 이를 바탕으로 일반 식음료에 안정적으로 철분을 첨가할 수 있게 되어 다양한 식음료에 건강기능성을 보장할 수 있게 된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <14> 실시예 1: 헴철-폴리펩타이드 복합체 분말의 용해도 검사

- <15> 헴철-폴리펩타이드 복합체 분말과, 공정 미상의 방법으로 분리하여 시판되고 있는 헴철 분말을 물에 녹여 비교한 결과 도 1과 같이 헴철-폴리펩타이드는 높은 용해도를 나타냄을 알 수 있었다. 이에 반해 시중에 유통중인 헴철은 전혀 물에 용해되지 않고 전부 침전되는 것을 확인하였다.

공개특허 10-2009-0110423

<16> 실시예 2: 헴철-폴리펩타이드 복합체 용액액의 제조방법

<17> 헴철-폴리펩타이드 복합체 분말을 공류수에 농량을 달리하여 용액시켜 농도가 다른 용액액을 얻었다. 이를 고온가압 살균한 후에 밀봉하여 실온에 보관하며 1일 경과 후 마다 그 색상 변화를 관찰하고 도 2에 도시하였다.

<18> 도 2에서 보듯이, 고형분 함량으로 10%(w/v)이하의 농도에서는 침전이나 겔 형성 같은 변화를 일으키지 않음을 확인하였다.

<19> 실시예 3: 헴철-폴리펩타이드 복합체를 이용한 철 보충용 음료의 제조방법

<20> 본 발명의 방법으로 제조된 헴철-폴리펩타이드 복합체의 분말과 국내에서 첨가 가능한 식품 첨가물 등을 이용하여 여러 종류의 철 보충용 건강기능식품인 음료 샘플을 만들었다. 관능평가를 통해 기호성이 우수한 샘플들을 고온가압 살균한 후에 밀봉하여 실온에 보관하며 1일 경과 후 마다 그 색상 변화를 관찰하였다

<21> 색상 변화가 일어난 샘플의 배합 원료를 각각 헴철-폴리펩타이드 복합체 수용액에 첨가하여 변화의 원인 원료를 찾아내었다. 그 결과로 헴철-폴리펩타이드 복합체를 이용한 액상의 영양보충용(철) 건강기능식품 제조시 성상의 변화 없이 기호성도 뛰어난 하기 표 1과 같은 적정 원료배합을 얻었다.

표 1

원료명	비율(%)	1일 섭취량 (20 ml)	mg 환산
헴철분말	3.000	0.6000	600.0
액상과당	15.000	3.0000	3000.0
유단백 가수분해물(CPF)	0.100	0.0200	20.0
비타민C	0.500	0.1000	100.0
비타민B1	0.001	0.0002	0.2
비타민B2	0.001	0.0002	0.2
나이아신	0.001	0.0002	0.2
비타민B6	0.001	0.0002	0.2
과일향	0.700	0.1400	140.0
자몽종자추출물	0.030	0.0060	6.0
정제수	80.666	16.1332	16133.2
계	100.000	20.0000	20000.0

실용이용 가능성

<23> 본 발명에서 사용한 헴철-폴리펩타이드 복합체의 높은 용해도는 pH 중성 부근의 십이지장부터 시작되는 철분의 흡수효율을 높여주므로 좋은 빈혈치료제로 사용될 수 있을 뿐 아니라 식품 첨가물로서도 높은 효용성을 갖는다. 또한, 보다 나은 흡수효율을 위해서 액체 형태의 헴철-폴리펩타이드 복합체를 얻을 수 있게 되어 제조 공정상의 비용감소와 더불어 현재 유통되어지는 캡슐이나 정제형태의 철분제를 대체하는 액체철분제가 될 수 있을 것이며, 이를 바탕으로 일반 식음료에 안정적으로 철분을 첨가할 수 있게 되어 다양한 식음료에 건강기능성을 보장할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

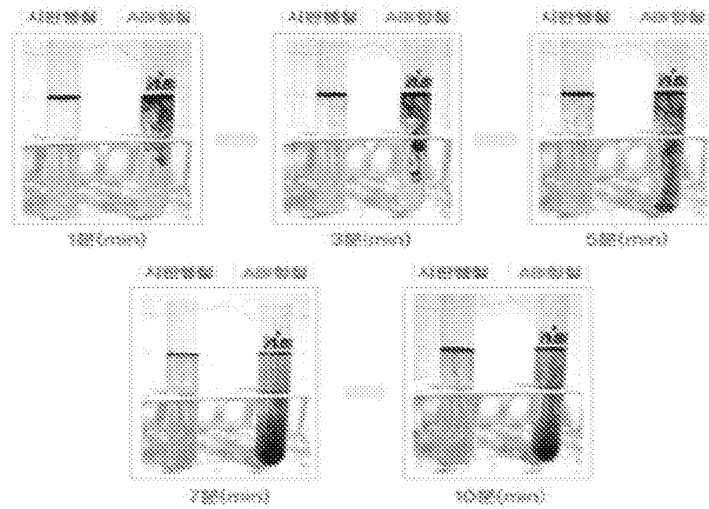
<24> 도 1은 시판 헴철 (일본 이도제미칼 제품)과 본 발명의 제조방법에 사용되었던 헴철-폴리펩타이드 복합체의 용해도를 비교한 도면이다.

<25> 도 2는 본 발명의 제조방법에 사용되어지는 원료인 분말상의 헴철-폴리펩타이드 복합체의 각 pH 용액에서의 용해도를 보여주는 도면으로서, A는 pH 4.0 수용액에 용해된 헴철-폴리펩타이드를, B는 증류수에 용해된 헴철-폴리펩타이드를, 그리고 C는 pH 9.5 수용액에 용해된 헴철-폴리펩타이드를 나타낸다.

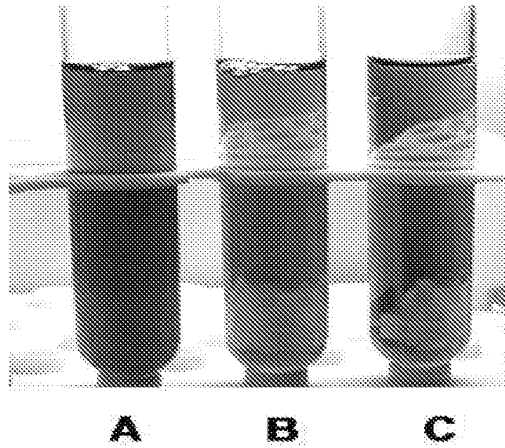
공개특허 10-2009-0110423

도면

도면1



도면2



Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	44146330
Application Number:	15913090
International Application Number:	
Confirmation Number:	9878
Title of Invention:	METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES
First Named Inventor/Applicant Name:	Rachel Fraser
Customer Number:	26191
Filer:	Heather L. Flanagan/Karissa Robinson
Filer Authorized By:	Heather L. Flanagan
Attorney Docket Number:	38767-0015008
Receipt Date:	28-OCT-2021
Filing Date:	06-MAR-2018
Time Stamp:	12:29:26
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	no				
File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Information Disclosure Statement (IDS) Form (SB08)	IDS.pdf	334625 9bf9d34935a74ac316585967e10db2d52560f6af	no	4
Warnings:					

Information:					
This is not an USPTO supplied IDS fillable form					
2	Foreign Reference	KR1020090110423.pdf	2066403 ed7c17a477da4c099232b2968db2a0fae5dbee07	no	6
Warnings:					
Information:					
Total Files Size (in bytes):			2401028		
This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503. <u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u> If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application. <u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u> If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course. <u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u> If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.					



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

NOTICE OF ALLOWANCE AND FEE(S) DUE

26191 7590 11/04/2021
FISH & RICHARDSON P.C. (TC)
PO BOX 1022
MINNEAPOLIS, MN 55440-1022

EXAMINER

GWARTNEY, ELIZABETH A

ART UNIT PAPER NUMBER

1759

DATE MAILED: 11/04/2021

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
15/913,090	03/06/2018	Rachel Fraser	38767-0015008	9878

TITLE OF INVENTION: METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES

APPLN. TYPE	ENTITY STATUS	ISSUE FEE DUE	PUBLICATION FEE DUE	PREV. PAID ISSUE FEE	TOTAL FEE(S) DUE	DATE DUE
nonprovisional	UNDISCOUNTED	\$1200	\$0.00	\$0.00	\$1200	02/04/2022

THE APPLICATION IDENTIFIED ABOVE HAS BEEN EXAMINED AND IS ALLOWED FOR ISSUANCE AS A PATENT. PROSECUTION ON THE MERITS IS CLOSED. THIS NOTICE OF ALLOWANCE IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS. THIS APPLICATION IS SUBJECT TO WITHDRAWAL FROM ISSUE AT THE INITIATIVE OF THE OFFICE OR UPON PETITION BY THE APPLICANT. SEE 37 CFR 1.313 AND MPEP 1308.

THE ISSUE FEE AND PUBLICATION FEE (IF REQUIRED) MUST BE PAID WITHIN THREE MONTHS FROM THE MAILING DATE OF THIS NOTICE OR THIS APPLICATION SHALL BE REGARDED AS ABANDONED. THIS STATUTORY PERIOD CANNOT BE EXTENDED. SEE 35 U.S.C. 151. THE ISSUE FEE DUE INDICATED ABOVE DOES NOT REFLECT A CREDIT FOR ANY PREVIOUSLY PAID ISSUE FEE IN THIS APPLICATION. IF AN ISSUE FEE HAS PREVIOUSLY BEEN PAID IN THIS APPLICATION (AS SHOWN ABOVE), THE RETURN OF PART B OF THIS FORM WILL BE CONSIDERED A REQUEST TO REAPPLY THE PREVIOUSLY PAID ISSUE FEE TOWARD THE ISSUE FEE NOW DUE.

HOW TO REPLY TO THIS NOTICE:

I. Review the ENTITY STATUS shown above. If the ENTITY STATUS is shown as SMALL or MICRO, verify whether entitlement to that entity status still applies.

If the ENTITY STATUS is the same as shown above, pay the TOTAL FEE(S) DUE shown above.

If the ENTITY STATUS is changed from that shown above, on PART B - FEE(S) TRANSMITTAL, complete section number 5 titled "Change in Entity Status (from status indicated above)".

For purposes of this notice, small entity fees are 1/2 the amount of undiscounted fees, and micro entity fees are 1/2 the amount of small entity fees.

II. PART B - FEE(S) TRANSMITTAL, or its equivalent, must be completed and returned to the United States Patent and Trademark Office (USPTO) with your ISSUE FEE and PUBLICATION FEE (if required). If you are charging the fee(s) to your deposit account, section "4b" of Part B - Fee(s) Transmittal should be completed and an extra copy of the form should be submitted. If an equivalent of Part B is filed, a request to reapply a previously paid issue fee must be clearly made, and delays in processing may occur due to the difficulty in recognizing the paper as an equivalent of Part B.

III. All communications regarding this application must give the application number. Please direct all communications prior to issuance to Mail Stop ISSUE FEE unless advised to the contrary.

IMPORTANT REMINDER: Maintenance fees are due in utility patents issuing on applications filed on or after Dec. 12, 1980. It is patentee's responsibility to ensure timely payment of maintenance fees when due. More information is available at www.uspto.gov/PatentMaintenanceFees.

PART B - FEE(S) TRANSMITTAL

Complete and send this form, together with applicable fee(s), by mail or fax, or via EFS-Web.

By mail, send to: Mail Stop ISSUE FEE
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

By fax, send to: (571)-273-2885

INSTRUCTIONS: This form should be used for transmitting the ISSUE FEE and PUBLICATION FEE (if required). Blocks 1 through 5 should be completed where appropriate. All further correspondence including the Patent, advance orders and notification of maintenance fees will be mailed to the current correspondence address as indicated unless corrected below or directed otherwise in Block 1, by (a) specifying a new correspondence address; and/or (b) indicating a separate "FEE ADDRESS" for maintenance fee notifications.

CURRENT CORRESPONDENCE ADDRESS (Note: Use Block 1 for any change of address)

26191 7590 11/04/2021
FISH & RICHARDSON P.C. (TC)
PO BOX 1022
MINNEAPOLIS, MN 55440-1022

Note: A certificate of mailing can only be used for domestic mailings of the Fee(s) Transmittal. This certificate cannot be used for any other accompanying papers. Each additional paper, such as an assignment or formal drawing, must have its own certificate of mailing or transmission.

Certificate of Mailing or Transmission

I hereby certify that this Fee(s) Transmittal is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage for first class mail in an envelope addressed to the Mail Stop ISSUE FEE address above, or being transmitted to the USPTO via EFS-Web or by facsimile to (571) 273-2885, on the date below.

(Typed or printed name)
(Signature)
(Date)

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
15/913,090	03/06/2018	Rachel Fraser	38767-0015008	9878

TITLE OF INVENTION: METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES

APPLN. TYPE	ENTITY STATUS	ISSUE FEE DUE	PUBLICATION FEE DUE	PREV. PAID ISSUE FEE	TOTAL FEE(S) DUE	DATE DUE
nonprovisional	UNDISCOUNTED	\$1200	\$0.00	\$0.00	\$1200	02/04/2022

EXAMINER	ART UNIT	CLASS-SUBCLASS
GWARTNEY, ELIZABETH A	1759	426-533000

1. Change of correspondence address or indication of "Fee Address" (37 CFR 1.363).

☐ Change of correspondence address (or Change of Correspondence Address form PTO/SB/122) attached.☐ "Fee Address" indication (or "Fee Address" Indication form PTO/SB/47; Rev 03-09 or more recent) attached. **Use of a Customer Number is required.**

2. For printing on the patent front page, list

(1) The names of up to 3 registered patent attorneys or agents OR, alternatively,

1 _____

(2) The name of a single firm (having as a member a registered attorney or agent) and the names of up to 2 registered patent attorneys or agents. If no name is listed, no name will be printed.

2 _____

3 _____

3. ASSIGNEE NAME AND RESIDENCE DATA TO BE PRINTED ON THE PATENT (print or type)

PLEASE NOTE: Unless an assignee is identified below, no assignee data will appear on the patent. If an assignee is identified below, the document must have been previously recorded, or filed for recordation, as set forth in 37 CFR 3.11 and 37 CFR 3.81(a). Completion of this form is NOT a substitute for filing an assignment.

(A) NAME OF ASSIGNEE

(B) RESIDENCE: (CITY and STATE OR COUNTRY)

Please check the appropriate assignee category or categories (will not be printed on the patent) : ☐ Individual ☐ Corporation or other private group entity ☐ Government4a. Fees submitted: ☐ Issue Fee ☐ Publication Fee (if required) ☐ Advance Order - # of Copies _____

4b. Method of Payment: (Please first reapply any previously paid fee shown above)

☐ Electronic Payment via EFS-Web ☐ Enclosed check ☐ Non-electronic payment by credit card (Attach form PTO-2038)☐ The Director is hereby authorized to charge the required fee(s), any deficiency, or credit any overpayment to Deposit Account No. _____

5. Change in Entity Status (from status indicated above)

☐ Applicant certifying micro entity status. See 37 CFR 1.29☐ Applicant asserting small entity status. See 37 CFR 1.27☐ Applicant changing to regular undiscounted fee status.

NOTE: Absent a valid certification of Micro Entity Status (see forms PTO/SB/15A and 15B), issue fee payment in the micro entity amount will not be accepted at the risk of application abandonment.

NOTE: If the application was previously under micro entity status, checking this box will be taken to be a notification of loss of entitlement to micro entity status.

NOTE: Checking this box will be taken to be a notification of loss of entitlement to small or micro entity status, as applicable.

NOTE: This form must be signed in accordance with 37 CFR 1.31 and 1.33. See 37 CFR 1.4 for signature requirements and certifications.

Authorized Signature _____

Date _____

Typed or printed name _____

Registration No. _____



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
15/913,090	03/06/2018	Rachel Fraser	38767-0015008	9878
26191	7590	11/04/2021	EXAMINER	
FISH & RICHARDSON P.C. (TC)			GWARTNEY, ELIZABETH A	
PO BOX 1022			ART UNIT	
MINNEAPOLIS, MN 55440-1022			PAPER NUMBER	
			1759	
DATE MAILED: 11/04/2021				

Determination of Patent Term Adjustment under 35 U.S.C. 154 (b) (Applications filed on or after May 29, 2000)

The Office has discontinued providing a Patent Term Adjustment (PTA) calculation with the Notice of Allowance.

Section 1(h)(2) of the AIA Technical Corrections Act amended 35 U.S.C. 154(b)(3)(B)(i) to eliminate the requirement that the Office provide a patent term adjustment determination with the notice of allowance. See Revisions to Patent Term Adjustment, 78 Fed. Reg. 19416, 19417 (Apr. 1, 2013). Therefore, the Office is no longer providing an initial patent term adjustment determination with the notice of allowance. The Office will continue to provide a patent term adjustment determination with the Issue Notification Letter that is mailed to applicant approximately three weeks prior to the issue date of the patent, and will include the patent term adjustment on the patent. Any request for reconsideration of the patent term adjustment determination (or reinstatement of patent term adjustment) should follow the process outlined in 37 CFR 1.705.

Any questions regarding the Patent Term Extension or Adjustment determination should be directed to the Office of Patent Legal Administration at (571)-272-7702. Questions relating to issue and publication fee payments should be directed to the Customer Service Center of the Office of Patent Publication at 1-(888)-786-0101 or (571)-272-4200.

OMB Clearance and PRA Burden Statement for PTOL-85 Part B

The Paperwork Reduction Act (PRA) of 1995 requires Federal agencies to obtain Office of Management and Budget approval before requesting most types of information from the public. When OMB approves an agency request to collect information from the public, OMB (i) provides a valid OMB Control Number and expiration date for the agency to display on the instrument that will be used to collect the information and (ii) requires the agency to inform the public about the OMB Control Number's legal significance in accordance with 5 CFR 1320.5(b).

The information collected by PTOL-85 Part B is required by 37 CFR 1.311. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 30 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450. Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b) (2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether disclosure of these records is required by the Freedom of Information Act.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspection or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

<i>Notice of Allowability</i>	Application No. 15/913,090	Applicant(s) Fraser et al.	
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759	AIA (FITF) Status No

-- The MAILING DATE of this communication appears on the cover sheet with the correspondence address--

All claims being allowable, PROSECUTION ON THE MERITS IS (OR REMAINS) CLOSED in this application. If not included herewith (or previously mailed), a Notice of Allowance (PTOL-85) or other appropriate communication will be mailed in due course. **THIS NOTICE OF ALLOWABILITY IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS.** This application is subject to withdrawal from issue at the initiative of the Office or upon petition by the applicant. See 37 CFR 1.313 and MPEP 1308.

1. ☒ This communication is responsive to RCE filed 5 May 2021.
☐ A declaration(s)/affidavit(s) under **37 CFR 1.130(b)** was/were filed on ____.
2. ☐ An election was made by the applicant in response to a restriction requirement set forth during the interview on ____; the restriction requirement and election have been incorporated into this action.
3. ☒ The allowed claim(s) is/are 31-37 and 40-54. As a result of the allowed claim(s), you may be eligible to benefit from the **Patent Prosecution Highway** program at a participating intellectual property office for the corresponding application. For more information, please see http://www.uspto.gov/patents/init_events/pph/index.jsp or send an inquiry to PPHfeedback@uspto.gov.
4. ☐ Acknowledgment is made of a claim for foreign priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or (f).
Certified copies:
 a) ☐ All b) ☐ Some* c) ☐ None of the:
 1. ☐ Certified copies of the priority documents have been received.
 2. ☐ Certified copies of the priority documents have been received in Application No. ____.
 3. ☐ Copies of the certified copies of the priority documents have been received in this national stage application from the International Bureau (PCT Rule 17.2(a)).
 * Certified copies not received: ____.

Applicant has THREE MONTHS FROM THE "MAILING DATE" of this communication to file a reply complying with the requirements noted below. Failure to timely comply will result in ABANDONMENT of this application.
THIS THREE-MONTH PERIOD IS NOT EXTENDABLE.

5. ☐ CORRECTED DRAWINGS (as "replacement sheets") must be submitted.
☐ including changes required by the attached Examiner's Amendment / Comment or in the Office action of Paper No./Mail Date ____.
Identifying indicia such as the application number (see 37 CFR 1.84(c)) should be written on the drawings in the front (not the back) of each sheet. Replacement sheet(s) should be labeled as such in the header according to 37 CFR 1.121(d).
6. ☐ DEPOSIT OF and/or INFORMATION about the deposit of BIOLOGICAL MATERIAL must be submitted. Note the attached Examiner's comment regarding REQUIREMENT FOR THE DEPOSIT OF BIOLOGICAL MATERIAL.

Attachment(s)

1. ☐ Notice of References Cited (PTO-892) 2. ☒ Information Disclosure Statements (PTO/SB/08), Paper No./Mail Date ____. 3. ☐ Examiner's Comment Regarding Requirement for Deposit of Biological Material ____. 4. ☐ Interview Summary (PTO-413), Paper No./Mail Date _____.	5. ☐ Examiner's Amendment/Comment 6. ☒ Examiner's Statement of Reasons for Allowance 7. ☐ Other _____.
--	--

	/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1759
--	---

Application/Control Number: 15/913,090
Art Unit: 1759

Page 2

Notice of Allowability

Notice of Pre-AIA or AIA Status

1. The present application is being examined under the pre-AIA first to invent provisions.

Continued Examination Under 37 CFR 1.114

2. A request for continued examination under 37 CFR 1.114, including the fee set forth in 37 CFR 1.17(e), was filed in this application after allowance or after an Office action under *Ex Parte Quayle*, 25 USPQ 74, 453 O.G. 213 (Comm'r Pat. 1935). Since this application is eligible for continued examination under 37 CFR 1.114, and the fee set forth in 37 CFR 1.17(e) has been timely paid, prosecution in this application has been reopened pursuant to 37 CFR 1.114. Applicants' submission filed on 5 May 2021 has been entered.

3. **Claims 31-37 and 40-54 are allowed.**

Reasons for Allowance

4. The following is an examiner's statement of reasons for allowance:

The Reasons for Allowance recited in the Notice of Allowability mailed 27 April 2021 are maintained.

Any comments considered necessary by applicant must be submitted no later than the payment of the issue fee and, to avoid processing delays, should preferably accompany the issue fee. Such submissions should be clearly labeled "Comments on Statement of Reasons for Allowance."

Conclusion

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to ELIZABETH A GWARTNEY whose telephone number is (571)270-3874. The examiner can normally be reached M-F: 8 a.m. - 4 p.m..

Application/Control Number: 15/913,090
Art Unit: 1759

Page 3

Examiner interviews are available via telephone, in-person, and video conferencing using a USPTO supplied web-based collaboration tool. To schedule an interview, applicant is encouraged to use the USPTO Automated Interview Request (AIR) at <http://www.uspto.gov/interviewpractice>.

If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Donald (Larry) Tarazano can be reached on 571-272-1515. The fax phone number for the organization where this application or proceeding is assigned is 571-273-8300.

Information regarding the status of published or unpublished applications may be obtained from Patent Center. Unpublished application information in Patent Center is available to registered users. To file and manage patent submissions in Patent Center, visit: <https://patentcenter.uspto.gov>. Visit <https://www.uspto.gov/patents/apply/patent-center> for more information about Patent Center and <https://www.uspto.gov/patents/docx> for information about filing in DOCX format. For additional questions, contact the Electronic Business Center (EBC) at 866-217-9197 (toll-free). If you would like assistance from a USPTO Customer Service Representative, call 800-786-9199 (IN USA OR CANADA) or 571-272-1000.

ELIZABETH A. GWARTNEY
Primary Examiner
Art Unit 1759

/ELIZABETH GWARTNEY/
Primary Examiner, Art Unit 1759

Search Notes 	Application/Control No. 15/913,090	Applicant(s)/Patent Under Reexamination Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759

CPC - Searched*		
Symbol	Date	Examiner
A23J3/227	05/06/2020	EG
A23J3/227	02/02/2021	EG
A23J3/227	10/23/2021	EG

CPC Combination Sets - Searched*		
Symbol	Date	Examiner

US Classification - Searched*			
Class	Subclass	Date	Examiner

* See search history printout included with this form or the SEARCH NOTES box below to determine the scope of the search.

Search Notes		
Search Notes	Date	Examiner
Inventor search completed	05/05/2020	EG
Review of prosecution history for US App 14797006 and 15913018	05/05/2020	EG
A23J3/227 (text limited by heme)	05/06/2020	EG
A23J3/227 (text limited by heme)	02/02/2021	EG
Google/Google Scholar search - heme containing protein or hemoglobin from bacteria, algae and fungus	04/19/2021	EG
A23J3/227 (text limited by heme)	10/23/2021	EG
Google search - heme and meat flavor	10/23/2021	EG

--	--

<i>Search Notes</i> 	Application/Control No. 15/913,090	Applicant(s)/Patent Under Reexamination Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759

Interference Search			
US Class/CPC Symbol	US Subclass/CPC Group	Date	Examiner
A23J3	227	04/21/2021	EG
A23L13	426	04/21/2021	EG

--	--

Issue Classification 	Application/Control No. 15/913,090	Applicant(s)/Patent Under Reexamination Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759

CPC						
Symbol					Type	Version
A23L	/	13	/	426	F	2016-08-01
A23D	/	7	/	0053	I	2013-01-01
A23D	/	7	/	0056	I	2013-01-01
A23L	/	2	/	66	I	2013-01-01
A23J	/	3	/	227	I	2013-01-01
A23L	/	29	/	238	I	2016-08-01
A23L	/	7	/	109	I	2016-08-01
A23L	/	27	/	10	I	2016-08-01
A23L	/	5	/	41	I	2016-08-01
A23L	/	33	/	185	I	2016-08-01
A23J	/	3	/	14	I	2013-01-01
A23L	/	27	/	26	I	2016-08-01
A23L	/	27	/	00	I	2016-08-01
A23L	/	13	/	424	I	2016-08-01
A23L	/	27	/	20	I	2016-08-01
A23L	/	13	/	42	I	2016-08-01

CPC Combination Sets						
Symbol				Type	Set	Ranking
A23V	/	2002	/	00	A	1
A23V	/	2200	/	15	A	1

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	23	
/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1796	23 October 2021	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	1

U.S. Patent and Trademark Office

Part of Paper No.: 20211023

Issue Classification 	Application/Control No. 15/913,090	Applicant(s)/Patent Under Reexamination Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759

INTERNATIONAL CLASSIFICATION			
CLAIMED			
A23L	/	13	/ 00

NON-CLAIMED			
/	/	/	/

US ORIGINAL CLASSIFICATION	
CLASS	SUBCLASS

CROSS REFERENCES(S)						
CLASS	SUBCLASS (ONE SUBCLASS PER BLOCK)					

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	23	
/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1796	23 October 2021	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	1

Issue Classification 	Application/Control No. 15/913,090	Applicant(s)/Patent Under Reexamination Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759

☐ Claims renumbered in the same order as presented by applicant
 ☐ CPA
 ☐ T.D.
 ☐ R.1.47

CLAIMS

Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original
-	1	-	10	-	19	-	28	7	37	14	46	23	55		
-	2	-	11	-	20	-	29	-	38	15	47				
-	3	-	12	-	21	-	30	-	39	16	48				
-	4	-	13	-	22	1	31	8	40	17	49				
-	5	-	14	-	23	2	32	9	41	18	50				
-	6	-	15	-	24	3	33	10	42	19	51				
-	7	-	16	-	25	4	34	11	43	20	52				
-	8	-	17	-	26	5	35	12	44	21	53				
-	9	-	18	-	27	6	36	13	45	22	54				

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	23	
/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1796	23 October 2021	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	1

Receipt date: 09/29/2021

Doc code: IDS

Doc description: Information Disclosure Statement (IDS) Filed

PTO/SB/08a (02-18)

Approved for use through 11/30/2020. OMB 0651-0031

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number		15913090
	Filing Date		2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser	
	Art Unit	1796	
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney	
	Attorney Docket Number	338767-0015008	

U.S.PATENTS						
Examiner Initial*	Cite No	Patent Number	Kind Code ¹	Issue Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
	1					

If you wish to add additional U.S. Patent citation information please click the Add button.

U.S.PATENT APPLICATION PUBLICATIONS						
Examiner Initial*	Cite No	Publication Number	Kind Code ¹	Publication Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
/E.G./	1	20210289824		2021-09-23	Brown et al.	

If you wish to add additional U.S. Published Application citation information please click the Add button.

FOREIGN PATENT DOCUMENTS								
Examiner Initial*	Cite No	Foreign Document Number ³	Country Code ²	Kind Code ⁴	Publication Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages,Columns,Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁵
/E.G./	1	JP 2010200627	JP		2010-09-16	HOUSE FOODS CORP		☐
/E.G./	2	JP 2017509349	JP		2017-04-06	IMPOSSIBLE FOODS INC.	English Abstract	☒

If you wish to add additional Foreign Patent Document citation information please click the Add button

NON-PATENT LITERATURE DOCUMENTS								
---------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--

Receipt date: 09/29/2021

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number		15913090
	Filing Date		2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser	
	Art Unit	1796	
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney	
	Attorney Docket Number	338767-0015008	

Examiner Initials*	Cite No	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc), date, pages(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁵
/E.G./	1	Extended European Search Report for International Application No. EP 21161324.5, dated September 22, 2021, 12 pages	☐
/E.G./	2	KOLODYAZNAYA, "Pishchevaya khimiya [Food chemistry]," St. Petersburg, SPBGAKHPT Publ. 1999, Translation, 4 pages, St. Petersburg, Russia	☒
/E.G./	3	LISITSIN et al., "Analogues of meat products with functional properties", All about meat, 2007, Translation, 6 pages, Russia	☒

If you wish to add additional non-patent literature document citation information please click the Add button

EXAMINER SIGNATURE

Examiner Signature	/ELIZABETH GWARTNEY/	Date Considered	10/23/2021
--------------------	----------------------	-----------------	------------

*EXAMINER: Initial if reference considered, whether or not citation is in conformance with MPEP 609. Draw line through a citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.

¹ See Kind Codes of USPTO Patent Documents at www.USPTO.GOV or MPEP 901.04. ² Enter office that issued the document, by the two-letter code (WIPO Standard ST.3). ³ For Japanese patent documents, the indication of the year of the reign of the Emperor must precede the serial number of the patent document. ⁴ Kind of document by the appropriate symbols as indicated on the document under WIPO Standard ST.16 if possible. ⁵ Applicant is to place a check mark here if English language translation is attached.

Receipt date: 09/29/2021 /E.G./

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number	15913090
	Filing Date	2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser
	Art Unit	1796
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney
	Attorney Docket Number	338767-0015008

CERTIFICATION STATEMENT

Please see 37 CFR 1.97 and 1.98 to make the appropriate selection(s):

☐ That each item of information contained in the information disclosure statement was first cited in any communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application not more than three months prior to the filing of the information disclosure statement. See 37 CFR 1.97(e)(1).

OR

☐ That no item of information contained in the information disclosure statement was cited in a communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application, and, to the knowledge of the person signing the certification after making reasonable inquiry, no item of information contained in the information disclosure statement was known to any individual designated in 37 CFR 1.56(c) more than three months prior to the filing of the information disclosure statement. See 37 CFR 1.97(e)(2).

☐ See attached certification statement.

☐ The fee set forth in 37 CFR 1.17 (p) has been submitted herewith.

☒ A certification statement is not submitted herewith.

SIGNATURE

A signature of the applicant or representative is required in accordance with CFR 1.33, 10.18. Please see CFR 1.4(d) for the form of the signature.

Signature	/Heather L. Flanagan/	Date (YYYY-MM-DD)	2021-09-27
Name/Print	Heather L. Flanagan	Registration Number	54,101

This collection of information is required by 37 CFR 1.97 and 1.98. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 1 hour to complete, including gathering, preparing and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

Receipt date: 09/29/2021

/E.G./

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether the Freedom of Information Act requires disclosure of these records.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspections or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

Receipt date: 05/05/2021

Sheet 1 of 2

Substitute Disclosure Form Information Disclosure Statement by Applicant (Use several sheets if necessary) (37 CFR §1.98(b))	U.S. Department of Commerce Patent and Trademark Office	Attorney Docket No. 38767-0015008	Application No. 15/913,090
	Applicant Impossible Foods Inc.		
	Filing Date March 6, 2018	Group Art Unit 1796	

U.S. Patent Documents							
Examiner Initial	Desig. ID	Document Number	Publication Date	Patentee	Filing Date If Appropriate	Class	Subclass
/E.G./	1.	2021/0037851	2/11/2021	Fraser et al			
/E.G./	2.	2021/0051976	2/25/2021	Fraser et al.			
/E.G./	3.	2021/0051977	2/25/2021	Vrljic et al.			

Foreign Patent Documents or Published Foreign Patent Applications							
Examiner Initial	Desig. ID	Document Number	Publication Date	Country or Patent Office	Translation	Class	Subclass
/E.G./	4.	WO 2005/019165	3/3/2005	WO			
/E.G./	5.	WO 2009/007424	1/15/2009	WO			
/E.G./	6.	WO 2012/075088	6/7/2012	WO			

Other Documents (include Author, Title, Date, and Place of Publication)		
Examiner Initial	Desig. ID	Document
/E.G./	7.	Becana et al., "Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules," New Phytologist, 2010, 188:960-976
/E.G./	8.	Butler et al., "A haemoprotein from the lipid of peanuts," Nature, March 1965, pages 1319-1321
/E.G./	9.	De La Parra "Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips," Journal of Agricultural and Food Chemistry, May 16, 2007, 55(10):4177-4183
/E.G./	10.	Dharmadhikari, "Yeast Autolysis," Vineyard and Vintage View, retrieved on November 27, 2020, retrieved from URL < https://www.extension.iastate.edu/wine/yeast-autolysis >, 6 pages
/E.G./	11.	EP Opposition "Response to Summons," in Appln. No. 14737766.7, dated, November 19, 2020, 9 pages
/E.G./	12.	EP Opposition "Third-Party Observation," in Appln. No. 14737766.7, dated, January 18, 2021, 5 pages
/E.G./	13.	EP Opposition, "Supplemental responsive declaration of Dr. Jorge Ruiz-Carrascal," Exhibit D103 in European Appln. No. 1737766.7, dated November 11, 2020, 7 pages
/E.G./	14.	Fridman et al., "Isolation and Characterization of Soybean Cytochrome c," Archives of biochemistry and biophysics, February 1968, 126:299-304
/E.G./	15.	Haandel et al., "Characterization of Different Commercial Soybean Peroxidase Preparations and Use of the Enzyme for N-Demethylation of Methyl N-Methylantranilate To Produce the Food Flavor Methylantranilate," J. Agric. Food Chem, 2000, 48: 1949-1954
/E.G./	16.	Kerler et al., "Basic chemistry and process conditions for reaction flavours with particular focus on Maillard-type reactions," Food Flavor Tech., 2010, 3:3.2-3.3
/E.G./	17.	Martins et al., " Meat flavor generation in complex maillard model systems," American Chem. Soc., 2010, 71-83

Examiner Signature /ELIZABETH GWARTNEY/	Date Considered 10/23/2021
EXAMINER: Initials citation considered. Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.	

Substitute Disclosure Form

Receipt date: 05/05/2021

Sheet 2 of 2

Substitute Disclosure Form U.S. Department of Commerce Patent and Trademark Office Information Disclosure Statement by Applicant (Use several sheets if necessary) (37 CFR §1.98(b))	Attorney Docket No. 38767-0015008	Application No. 15/913,090
	Applicant Impossible Foods Inc.	
	Filing Date March 6, 2018	Group Art Unit 1796

Other Documents (include Author, Title, Date, and Place of Publication)		
Examiner Initial	Desig. ID	Document
/E.G./	18.	Swiderski et al., "Spent Brewer's Yeast Autolysates as a New and Valuable Component of Functional Food and Dietary Supplements," J. Food Process Technol, 2015, 6:12
/E.G./	19.	Zhao et al., "Degradation of RNA during the autolysis of Saccharomyces cerevisiae produces predominantly ribonucleotides," J. Ind. Microbiol Biotechnol, August 10, 2005, 32:415-423

Examiner Signature /ELIZABETH GWARTNEY/	Date Considered 10/23/2021
EXAMINER: Initials citation considered. Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.	

Substitute Disclosure Form

Receipt date: 05/05/2021

Attorney Docket No.: 38767-0015008

/E.G./

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Named Inventor :	Rachel Fraser	Art Unit :	1796
Application No. :	15/913,090	Examiner :	Elizabeth A.
Filed :	March 6, 2018		Gwartney
		Conf. No. :	9878
Title :	METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES		

MAIL STOP RCE

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT

Please consider the documents listed on the disclosure form submitted with this statement. Copies of the documents are being submitted with this statement to the extent required under 37 C.F.R. § 1.98(a)(2).

This statement is being filed with a Request for Continued Examination. No fee is required.

Apply any necessary charges or credits applicable under 37 C.F.R. § 1.17(p) to deposit account 06-1050, referencing the above attorney docket number.

Please contact the undersigned if there are any questions regarding this statement.

Respectfully submitted,

Date: May 5, 2021

/Molly R. Kelley, Reg. No. 76,691/
Molly R. Kelley
Reg. No. 76,691

Customer Number 26191
Fish & Richardson P.C.
Telephone: +1 (612) 337-2519
Facsimile: (612) 288-9696

62549534.doc

Receipt date: 10/28/2021

Doc code: IDS

Doc description: Information Disclosure Statement (IDS) Filed

PTO/SB/08a (02-18)

Approved for use through 11/30/2020. OMB 0651-0031

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number		15913090
	Filing Date		2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser	
	Art Unit	1796	
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney	
	Attorney Docket Number	38767-0015008	

U.S. PATENTS								
Examiner Initial*	Cite No	Patent Number	Kind Code ¹	Issue Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages, Columns, Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear		
	1							
If you wish to add additional U.S. Patent citation information please click the Add button.								
U.S. PATENT APPLICATION PUBLICATIONS								
Examiner Initial*	Cite No	Publication Number	Kind Code ¹	Publication Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages, Columns, Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear		
	1							
If you wish to add additional U.S. Published Application citation information please click the Add button.								
FOREIGN PATENT DOCUMENTS								
Examiner Initial*	Cite No	Foreign Document Number ³	Country Code ²	Kind Code ⁴	Publication Date	Name of Patentee or Applicant of cited Document	Pages, Columns, Lines where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁵
/E.G./	1	KR 1020090110423	KR		2009-10-22	NAT UNIV CHONBUK IND COOP		☒
If you wish to add additional Foreign Patent Document citation information please click the Add button								
NON-PATENT LITERATURE DOCUMENTS								
Examiner Initials*	Cite No	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc), date, pages(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.						T ⁵

Receipt date: 10/28/2021

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT (Not for submission under 37 CFR 1.99)	Application Number		15913090
	Filing Date		2018-03-06
	First Named Inventor	Rachel Fraser	
	Art Unit	1796	
	Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney	
	Attorney Docket Number	38767-0015008	

	1		☐
--	---	--	--------------------------

If you wish to add additional non-patent literature document citation information please click the Add button

EXAMINER SIGNATURE

Examiner Signature	/ELIZABETH GWARTNEY/	Date Considered	11/01/2021
--------------------	----------------------	-----------------	------------

*EXAMINER: Initial if reference considered, whether or not citation is in conformance with MPEP 609. Draw line through a citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.

¹ See Kind Codes of USPTO Patent Documents at www.USPTO.GOV or MPEP 901.04. ² Enter office that issued the document, by the two-letter code (WIPO Standard ST.3). ³ For Japanese patent documents, the indication of the year of the reign of the Emperor must precede the serial number of the patent document. ⁴ Kind of document by the appropriate symbols as indicated on the document under WIPO Standard ST.16 if possible. ⁵ Applicant is to place a check mark here if English language translation is attached.

Receipt date: 10/28/2021 /E.G./

**INFORMATION DISCLOSURE
STATEMENT BY APPLICANT**
(Not for submission under 37 CFR 1.99)

Application Number	15913090
Filing Date	2018-03-06
First Named Inventor	Rachel Fraser
Art Unit	1796
Examiner Name	Elizabeth A. Gwartney
Attorney Docket Number	38767-0015008

CERTIFICATION STATEMENT

Please see 37 CFR 1.97 and 1.98 to make the appropriate selection(s):

☐ That each item of information contained in the information disclosure statement was first cited in any communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application not more than three months prior to the filing of the information disclosure statement. See 37 CFR 1.97(e)(1).

OR

☐ That no item of information contained in the information disclosure statement was cited in a communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application, and, to the knowledge of the person signing the certification after making reasonable inquiry, no item of information contained in the information disclosure statement was known to any individual designated in 37 CFR 1.56(c) more than three months prior to the filing of the information disclosure statement. See 37 CFR 1.97(e)(2).

☐ See attached certification statement.

☐ The fee set forth in 37 CFR 1.17 (p) has been submitted herewith.

☒ A certification statement is not submitted herewith.

SIGNATURE

A signature of the applicant or representative is required in accordance with CFR 1.33, 10.18. Please see CFR 1.4(d) for the form of the signature.

Signature	/Heather L. Flanagan/	Date (YYYY-MM-DD)	2021-10-28
Name/Print	Heather L. Flanagan	Registration Number	54,101

This collection of information is required by 37 CFR 1.97 and 1.98. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 1 hour to complete, including gathering, preparing and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

Receipt date: 10/28/2021

/E.G./

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether the Freedom of Information Act requires disclosure of these records.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspections or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

EAST Search History

EAST Search History (Prior Art)

Ref #	Hits	Search Query	DBs	Default Operator	Plurals	Time Stamp
L1	75	A23J3/227.cpc. AND heme	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2021/10/23 19:18
L2	36	"2013010042"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2021/10/23 19:18
L3	32	"201161572205"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2021/10/23 19:26
S1	1	"15913090"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2020/05/05 12:26
S2	9	"20120093994"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2020/05/06 10:51
S3	9	"20120093994"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2020/05/06 12:27
S4	46	A23J3/227.cpc. AND heme	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2020/05/06 14:40
S7	8	"2019079135"	US-PGPUB; USPAT; USOCR; FPRS; EPO; JPO; DERWENT; IBM_TDB	OR	OFF	2021/04/21 15:39

EAST Search History (Interference)

Ref #	Hits	Search Query	DBs	Default Operator	Plurals	Time Stamp
S5	576	A23L13/426.cpc.	US-PGPUB; USPAT	OR	OFF	2021/04/21 14:11
S6	480	A23J3/227.cpc.	US-PGPUB; USPAT	OR	OFF	2021/04/21 14:14

10/23/2021 7:29:34 PM

C:\Users\egwartney\Documents\EAST\Workspaces\15913090.wsp



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
15/913,090	03/06/2018	Rachel Fraser	38767-0015008	9878
26191 7590 11/10/2021 FISH & RICHARDSON P.C. (TC) PO BOX 1022 MINNEAPOLIS, MN 55440-1022			EXAMINER GWARTNEY, ELIZABETH A	
			ART UNIT 1759	PAPER NUMBER
			NOTIFICATION DATE 11/10/2021	DELIVERY MODE ELECTRONIC

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

The time period for reply, if any, is set in the attached communication.

Notice of the Office communication was sent electronically on above-indicated "Notification Date" to the following e-mail address(es):

PATDOCTC@fr.com

Corrected Notice of Allowability	Application No. 15/913,090	Applicant(s) Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759
		AIA (FITF) Status No

-- The MAILING DATE of this communication appears on the cover sheet with the correspondence address--

All claims being allowable, PROSECUTION ON THE MERITS IS (OR REMAINS) CLOSED in this application. If not included herewith (or previously mailed), a Notice of Allowance (PTOL-85) or other appropriate communication will be mailed in due course. **THIS NOTICE OF ALLOWABILITY IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS.** This application is subject to withdrawal from issue at the initiative of the Office or upon petition by the applicant. See 37 CFR 1.313 and MPEP 1308.

1. ☒ This communication is responsive to RCE filed 5 may 2021.
☐ A declaration(s)/affidavit(s) under **37 CFR 1.130(b)** was/were filed on _____.
2. ☐ An election was made by the applicant in response to a restriction requirement set forth during the interview on _____; the restriction requirement and election have been incorporated into this action.
3. ☒ The allowed claim(s) is/are 31-37 and 40-55. As a result of the allowed claim(s), you may be eligible to benefit from the **Patent Prosecution Highway** program at a participating intellectual property office for the corresponding application. For more information, please see http://www.uspto.gov/patents/init_events/pph/index.jsp or send an inquiry to PPHfeedback@uspto.gov.
4. ☐ Acknowledgment is made of a claim for foreign priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or (f).

Certified copies:

a) ☐ All b) ☐ Some* c) ☐ None of the:

 1. ☐ Certified copies of the priority documents have been received.
 2. ☐ Certified copies of the priority documents have been received in Application No. _____.
 3. ☐ Copies of the certified copies of the priority documents have been received in this national stage application from the International Bureau (PCT Rule 17.2(a)).

* Certified copies not received: _____.

Applicant has THREE MONTHS FROM THE "MAILING DATE" of this communication to file a reply complying with the requirements noted below. Failure to timely comply will result in ABANDONMENT of this application.
THIS THREE-MONTH PERIOD IS NOT EXTENDABLE.

5. ☐ CORRECTED DRAWINGS (as "replacement sheets") must be submitted.
☐ including changes required by the attached Examiner's Amendment / Comment or in the Office action of Paper No./Mail Date _____.

Identifying indicia such as the application number (see 37 CFR 1.84(c)) should be written on the drawings in the front (not the back) of each sheet. Replacement sheet(s) should be labeled as such in the header according to 37 CFR 1.121(d).
6. ☐ DEPOSIT OF and/or INFORMATION about the deposit of BIOLOGICAL MATERIAL must be submitted. Note the attached Examiner's comment regarding REQUIREMENT FOR THE DEPOSIT OF BIOLOGICAL MATERIAL.

Attachment(s)

1. ☐ Notice of References Cited (PTO-892) 2. ☐ Information Disclosure Statements (PTO/SB/08), Paper No./Mail Date _____. 3. ☐ Examiner's Comment Regarding Requirement for Deposit of Biological Material _____. 4. ☐ Interview Summary (PTO-413), Paper No./Mail Date _____.	5. ☐ Examiner's Amendment/Comment 6. ☐ Examiner's Statement of Reasons for Allowance 7. ☐ Other _____.
---	---

	/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1759
--	---

Issue Classification 	Application/Control No. 15/913,090	Applicant(s)/Patent Under Reexamination Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759

CPC						
Symbol					Type	Version
A23L	/	13	/	426	F	2016-08-01
A23D	/	7	/	0053	I	2013-01-01
A23D	/	7	/	0056	I	2013-01-01
A23L	/	2	/	66	I	2013-01-01
A23J	/	3	/	227	I	2013-01-01
A23L	/	29	/	238	I	2016-08-01
A23L	/	7	/	109	I	2016-08-01
A23L	/	27	/	10	I	2016-08-01
A23L	/	5	/	41	I	2016-08-01
A23L	/	33	/	185	I	2016-08-01
A23J	/	3	/	14	I	2013-01-01
A23L	/	27	/	26	I	2016-08-01
A23L	/	27	/	00	I	2016-08-01
A23L	/	13	/	424	I	2016-08-01
A23L	/	27	/	20	I	2016-08-01
A23L	/	13	/	42	I	2016-08-01

CPC Combination Sets						
Symbol				Type	Set	Ranking
A23V	/	2002	/	00	A	1
A23V	/	2200	/	15	A	1

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	23	
/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1796	05 November 2021	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	1

U.S. Patent and Trademark Office

Part of Paper No.: 20211105

<i>Issue Classification</i> 	Application/Control No. 15/913,090	Applicant(s)/Patent Under Reexamination Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759

INTERNATIONAL CLASSIFICATION			
CLAIMED			
A23L	/	13	/ 00
NON-CLAIMED			
/		/	

US ORIGINAL CLASSIFICATION	
CLASS	SUBCLASS

CROSS REFERENCES(S)						
CLASS	SUBCLASS (ONE SUBCLASS PER BLOCK)					

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	23	
/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1796	05 November 2021	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	1

Issue Classification 	Application/Control No. 15/913,090	Applicant(s)/Patent Under Reexamination Fraser et al.
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759

☐ Claims renumbered in the same order as presented by applicant ☐ CPA ☐ T.D. ☐ R.1.47															
CLAIMS															
Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original
-	1	-	10	-	19	-	28	7	37	14	46	23	55		
-	2	-	11	-	20	-	29	-	38	15	47				
-	3	-	12	-	21	-	30	-	39	16	48				
-	4	-	13	-	22	1	31	8	40	17	49				
-	5	-	14	-	23	2	32	9	41	18	50				
-	6	-	15	-	24	3	33	10	42	19	51				
-	7	-	16	-	25	4	34	11	43	20	52				
-	8	-	17	-	26	5	35	12	44	21	53				
-	9	-	18	-	27	6	36	13	45	22	54				

NONE (Assistant Examiner)		Total Claims Allowed: 23	
/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1796 (Primary Examiner)		05 November 2021 (Date)	
		O.G. Print Claim(s) 1	O.G. Print Figure 1

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 2

Attorney Docket 38767-0015008

AMENDMENTS TO THE CLAIMS

This listing of claims replaces all prior versions and listings of claims in the application.

Listing of Claims

1-30. (Cancelled)

31. (Currently Amended) A meat-like food product produced by a method comprising:

providing one or more plant proteins; and

combining, with the one or more plant proteins:

a composition comprising a heme-containing protein, wherein the composition comprises at least 60% of the heme-containing protein on a dry weight basis;

a compound selected from glucose, ribose, fructose, lactose, xylose, arabinose, glucose-6-phosphate, maltose, and galactose, and mixtures of two or more thereof; and

a compound selected from cysteine, cystine, thiamine, methionine, and mixtures of two or more thereof in [[to]] a concentration of at least 1.5 mM;

wherein the meat-like food product is free of animal heme-containing protein;

wherein cooking the meat-like food product results in the production of at least two volatile compounds which have a meat-associated aroma; and

wherein the meat-like food product is in a form selected from the group consisting of a hotdog, a burger, ground meat, a sausage, a steak, a filet, a roast, a meatball, a meatloaf, or bacon.

32. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein the one or more plant proteins comprise a textured vegetable protein.

33. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 32, wherein the textured vegetable protein is textured soy protein.

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 3

Attorney Docket 38767-0015008

34. (Currently Amended) The meat-like food product of claim 31, wherein the ~~source of~~ composition comprising the heme-containing protein comprises at least 70% of the heme-containing protein on a dry weight basis.

35. (Currently Amended) The meat-like food product of claim 31, wherein the ~~source of~~ composition comprising the heme-containing protein comprises at least 80% of the heme-containing protein on a dry weight basis.

36. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein the heme-containing protein is a globin.

37. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein the heme-containing protein comprises an amino acid sequence having at least 80% sequence identity to a polypeptide set forth in SEQ ID NOs. 1-26.

38. (Cancelled)

39. (Cancelled)

40. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein the cysteine is added to a concentration of about 0.8 mM to about 10 mM.

41. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein the thiamine is added to a concentration of about 0.1 mM to about 2 mM.

42. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, further comprising combining, with the one or more plant proteins, one or more of inosine, inosine monophosphate (IMP), guanosine, guanosine monophosphate (GMP), and adenosine monophosphate (AMP).

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 4

Attorney Docket 38767-0015008

43. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, further comprising combining with the one more plant proteins, one or more of beta-carotene, alpha-tocopherol, caffeic acid, propyl gallate, and epigallocatechin gallate.

44. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, further comprising combining with the one more plant proteins, one or more of a vegetable oil, an algal oil, sunflower oil, corn oil, soybean oil, palm fruit oil, palm kernel oil, safflower oil, flaxseed oil, rice bran oil, cottonseed oil, olive oil, canola oil, flaxseed oil, coconut oil, and mango oil.

45. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, further comprising combining with the one more plant proteins, one or more of acetic acid, lactic acid, glycolic acid, citric acid, succinic acid, tartaric acid, caprylic acid, capric acid, lauric acid, myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, alpha linolenic acid, gamma linolenic acid, arachidic acid, arachidonic acid, behenic acid, and erucic acid.

46. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein cooking comprises heating the meat-like food product at 150°C for about 3 to about 5 minutes.

47. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein the meat-like food product has a pink to red color before cooking to indicate a raw or uncooked state.

48. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein at least a portion of the meat-like food product, upon cooking, transitions in color from a pink to red color in a raw or uncooked state to a lighter pink to brown color in a partially cooked to fully cooked state.

49. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein cooking the meat-like food product results in the production of at least five volatile compounds selected from the group consisting of (1-ethyl-1-propenyl)-benzene, (E)-2-decenal, (E)-2-heptenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-nonenal, (E)-2-octen-1-ol, (E)-2-octenal, (E)-2-tridecen-1-ol, (E)-3-penten-2-one,

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 5

Attorney Docket 38767-0015008

(E)-4-octene, (E)-5-decene, (E,E)-3,5-octadien-2-one, (Z)-2-decenal, (Z)-2-heptenal, (Z)-3-decen-1-ol, acetate, [(methylsulfonyl)methyl]-benzene, 1-(ethylthio)-2-(methylthio)-buta-1,3-diene, 1-(methylthio)-propane, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-cis-benzene, 1,10-undecadiene, 1,3,5-cycloheptatriene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-benzene, 1,3-diisopropoxy-1,3-dimethyl-1,3-disilacyclobutane, 1,3-dimethyl-benzene, 1-decen-3-one, 1-heptanol, 1-heptyl-1,2,3,4-tetrahydro-4-methyl-naphthalene, 1-hexanol, 1-hydroxy-2-propanone, 1-nonanol, 1-octanol, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-one, 1-octene, 1-pentanol, 1-penten-3-one, 1-undecanol, 2,2,4,6,6-pentamethyl-heptane, 2,3,4-trimethyl-pentane, 2,3-butanedione, 2,3-dihydro-5-methyl-furan, 2,3-dimethyl-pyrazine, 2,4-decadienal, 2,4-dimethyl-1-heptene, 2,5-dimethyl-pyrazine, 2-acetetyl-1-propene, 2-acetyl-propen-2-ol, 2-acetylthiazole, 2-butanone, 2-butenal, 2-butyl-1-decene, 2-decanone, 2-decenal, 2-ethyl-5-methyl-pyrazine, 2-ethylacrolein, 2-ethyl-furan, 2-heptanone, 2-heptenal, 2-hexyl furan, 2-methyl-1(H)-pyrrole, 2-methyl-1-heptene, 2-methyl-1-penten-1-one, 2-methyl-3-(methylthio) furan, 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-5-(methylthio)-furan, 2-methyl-butanal, 2-methyl-cyclopentanone, 2-methyl-furan, 2-methyl-heptane, 2-methyl-pentanal, 2-methyl-propanal, 2-methyl-thiazole, 2-n-octylfuran, 2-nonanone, 2-nonen-4-one, 2-octanone, 2-octenal, 2-pentanone, 2-pentyl-furan, 2-pentyl-thiophene, 2-phenylpropenal, 2-propenal, 2-propenoic acid, methyl ester, 2-thiophenecarboxaldehyde, 2-tridecen-1-ol, 2-undecanone, 2-undecenal, 3-(methylthio)-propanenitrile, 3-(phenylmethyl)-2,5-piperazinedione, 3,3'-dithiobis-2-methyl-furan, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, 3,5-di-tert-butylbenzoic acid, 3-decen-2-one, 3-ethylcyclopentanone, 3-ethyl-pentane, 3-methyl-2-butenal, 3-methyl-2-thiophenecarboxaldehyde, 3-methyl-3-buten-2-one, 3-methyl-butanal, 3-methyl-furan, 3-methylheptyl acetate, 3-methyl-pentanal, 3-pentyl-furan, 3-phenyl-furan, 3-thiophenecarboxaldehyde, 3-thiophenemethanol, 4,7-dimethyl-undecane, 4-chloro-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, 4-ethoxy-benzoic acid, ethyl ester, 4-ethyl-2-methyl-pyrrole, 4-ethyl-benzaldehyde, 4-methyl-2-heptanone, 4-methyl-5-thiazoleethanol, 4-methylthiazole, 4-nitrophenyl 2-thiophenecarboxylic acid ester, 4-penten-2-one, 4-quinolinecarboxaldehyde, 5-(2-chloroethyl)-4-methylthiazole, 5-ethenyl-4-methyl-thiazole, 5-ethyldihydro-2(3H)-furanone, 5-formyl-4-methylthiazole, 5-methyl-1-undecene, 6-methyl-2-heptanone, 7-methyl-(E)-5-undecene, 9-octadecenal, acetaldehyde, acetic acid, acetone, acetonitrile, acetophenone, acetyl valeryl, aminophenylacetylene, benzaldehyde, benzene, benzoic acid, benzyl alcohol, bis(2-

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 6

Attorney Docket 38767-0015008

methyl-4,5-dihydro-3-furyl) disulfide, butanal, butanone, butyrolactone, carbon disulfide, decanal, dihydro-3-(2H)-thiophenone, dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone, dimethyl selenone, dimethyl sulfide, dimethyl trisulfide, dodecanal, ethanol, ethyl acetate, formic acid, heptyl ester, furan, furfural, heptanal, hexanoic acid, isopropyl alcohol, isothiazole, isothiocyanato-methane, m-aminophenylacetylene, methacrolein, methanethiol, methional, methyl (methylthio)methyl disulfide, methyl isopropyl disulphide, methyl thiolacetate, methyl vinyl ketone, methyl-pyrazine, methyl-thiirane, nonanal, octanal, octane, oxalic acid, diallyl ester, oxalic acid, isobutyl pentyl ester, p-cresol, p-dithiane-2,5-diol, pentanal, pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-hydroxy-, isobutyl ester, phenol, phenylacetaldehyde, propanal, propyl-cyclopropane, p-xylene, pyrazine, pyrrole, styrene, thiazole, thiocyanic acid, methyl ester, thiophene, toluene, trans-2-(2-pentenyl)furan, and tridecane.

50. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein cooking the meat-like food product results in the production of at least ten volatile compounds selected from the group consisting of (1-ethyl-1-propenyl)-benzene, (E)-2-decenal, (E)-2-heptenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-nonenal, (E)-2-octen-1-ol, (E)-2-octenal, (E)-2-tridecen-1-ol, (E)-3-penten-2-one, (E)-4-octene, (E)-5-decene, (E,E)-3,5-octadien-2-one, (Z)-2-decenal, (Z)-2-heptenal, (Z)-3-decen-1-ol, acetate, [(methylsulfonyl)methyl]-benzene, 1-(ethylthio)-2-(methylthio)-buta-1,3-diene, 1-(methylthio)-propane, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-cis-benzene, 1,10-undecadiene, 1,3,5-cycloheptatriene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-benzene, 1,3-diisopropoxy-1,3-dimethyl-1,3-disilacyclobutane, 1,3-dimethyl-benzene, 1-decen-3-one, 1-heptanol, 1-heptyl-1,2,3,4-tetrahydro-4-methyl-naphthalene, 1-hexanol, 1-hydroxy-2-propanone, 1-nonanol, 1-octanol, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-one, 1-octene, 1-pentanol, 1-penten-3-one, 1-undecanol, 2,2,4,6,6-pentamethyl-heptane, 2,3,4-trimethyl-pentane, 2,3-butanedione, 2,3-dihydro-5-methyl-furan, 2,3-dimethyl-pyrazine, 2,4-decadienal, 2,4-dimethyl-1-heptene, 2,5-dimethyl-pyrazine, 2-acetatyl-1-propene, 2-acetylpropen-2-ol, 2-acetylthiazole, 2-butanone, 2-butenal, 2-butyl-1-decene, 2-decanone, 2-decenal, 2-ethyl-5-methyl-pyrazine, 2-ethylacrolein, 2-ethyl-furan, 2-heptanone, 2-heptenal, 2-hexyl furan, 2-methyl-1(H)-pyrrole, 2-methyl-1-heptene, 2-methyl-1-penten-1-one, 2-methyl-3-(methylthio) furan, 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-5-(methylthio)-furan, 2-methyl-butanal, 2-methyl-cyclopentanone, 2-methyl-furan, 2-methyl-heptane, 2-methyl-pentanal, 2-methyl-

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 7

Attorney Docket 38767-0015008

propanal, 2-methyl-thiazole, 2-n-octylfuran, 2-nonanone, 2-nonen-4-one, 2-octanone, 2-octenal, 2-pentanone, 2-pentyl-furan, 2-pentyl-thiophene, 2-phenylpropenal, 2-propenal, 2-propenoic acid, methyl ester, 2-thiophenecarboxaldehyde, 2-tridecen-1-ol, 2-undecanone, 2-undecenal, 3-(methylthio)-propanenitrile, 3-(phenylmethyl)-2,5-piperazinedione, 3,3'-dithiobis-2-methyl-furan, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, 3,5-di-tert-butylbenzoic acid, 3-decen-2-one, 3-ethylcyclopentanone, 3-ethyl-pentane, 3-methyl-2-butenal, 3-methyl-2-thiophenecarboxaldehyde, 3-methyl-3-buten-2-one, 3-methyl-butanal, 3-methyl-furan, 3-methylheptyl acetate, 3-methyl-pentanal, 3-pentyl-furan, 3-phenyl-furan, 3-thiophenecarboxaldehyde, 3-thiophenemethanol, 4,7-dimethyl-undecane, 4-chloro-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, 4-ethoxy-benzoic acid, ethyl ester, 4-ethyl-2-methyl-pyrrole, 4-ethyl-benzaldehyde, 4-methyl-2-heptanone, 4-methyl-5-thiazoleethanol, 4-methylthiazole, 4-nitrophenyl 2-thiophenecarboxylic acid ester, 4-penten-2-one, 4-quinolinecarboxaldehyde, 5-(2-chloroethyl)-4-methylthiazole, 5-ethenyl-4-methyl-thiazole, 5-ethyldihydro-2(3H)-furanone, 5-formyl-4-methylthiazole, 5-methyl-1-undecene, 6-methyl-2-heptanone, 7-methyl-(E)-5-undecene, 9-octadecenal, acetaldehyde, acetic acid, acetone, acetonitrile, acetophenone, acetyl valeryl, aminophenylacetylene, benzaldehyde, benzene, benzoic acid, benzyl alcohol, bis(2-methyl-4,5-dihydro-3-furyl) disulfide, butanal, butanone, butyrolactone, carbon disulfide, decanal, dihydro-3-(2H)-thiophenone, dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone, dimethyl selenone, dimethyl sulfide, dimethyl trisulfide, dodecanal, ethanol, ethyl acetate, formic acid, heptyl ester, furan, furfural, heptanal, hexanoic acid, isopropyl alcohol, isothiazole, isothiocyanato-methane, m-aminophenylacetylene, methacrolein, methanethiol, methional, methyl (methylthio)methyl disulfide, methyl isopropyl disulphide, methyl thiolacetate, methyl vinyl ketone, methyl-pyrazine, methyl-thiirane, nonanal, octanal, octane, oxalic acid, diallyl ester, oxalic acid, isobutyl pentyl ester, p-cresol, p-dithiane-2,5-diol, pentanal, pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-hydroxy-, isobutyl ester, phenol, phenylacetaldehyde, propanal, propyl-cyclopropane, p-xylene, pyrazine, pyrrole, styrene, thiazole, thiocyanic acid, methyl ester, thiophene, toluene, trans-2-(2-pentenyl)furan, and tridecane.

51. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein cooking the meat-like food product results in the production of at least twenty volatile compounds selected

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 8

Attorney Docket 38767-0015008

from the group consisting of (1-ethyl-1-propenyl)-benzene, (E)-2-decenal, (E)-2-heptenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-nonenal, (E)-2-octen-1-ol, (E)-2-octenal, (E)-2-tridecen-1-ol, (E)-3-penten-2-one, (E)-4-octene, (E)-5-decene, (E,E)-3,5-octadien-2-one, (Z)-2-decenal, (Z)-2-heptenal, (Z)-3-decen-1-ol, acetate, [(methylsulfonyl)methyl]-benzene, 1-(ethylthio)-2-(methylthio)-buta-1,3-diene, 1-(methylthio)-propane, 1,1'-(1,2-cyclobutanediyl)bis-cis-benzene, 1,10-undecadiene, 1,3,5-cycloheptatriene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-benzene, 1,3-diisopropoxy-1,3-dimethyl-1,3-disilacyclobutane, 1,3-dimethyl-benzene, 1-decen-3-one, 1-heptanol, 1-heptyl-1,2,3,4-tetrahydro-4-methyl-naphthalene, 1-hexanol, 1-hydroxy-2-propanone, 1-nonanol, 1-octanol, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-one, 1-octene, 1-pentanol, 1-penten-3-one, 1-undecanol, 2,2,4,6,6-pentamethyl-heptane, 2,3,4-trimethyl-pentane, 2,3-butanedione, 2,3-dihydro-5-methyl-furan, 2,3-dimethyl-pyrazine, 2,4-decadienal, 2,4-dimethyl-1-heptene, 2,5-dimethyl-pyrazine, 2-acetyl-1-propene, 2-acetyl-propen-2-ol, 2-acetylthiazole, 2-butanone, 2-butenal, 2-butyl-1-decene, 2-decanone, 2-decenal, 2-ethyl-5-methyl-pyrazine, 2-ethylacrolein, 2-ethyl-furan, 2-heptanone, 2-heptenal, 2-hexyl furan, 2-methyl-1(H)-pyrrole, 2-methyl-1-heptene, 2-methyl-1-penten-1-one, 2-methyl-3-(methylthio) furan, 2-methyl-3-furanthiol, 2-methyl-5-(methylthio)-furan, 2-methyl-butanal, 2-methyl-cyclopentanone, 2-methyl-furan, 2-methyl-heptane, 2-methyl-pentanal, 2-methyl-propanal, 2-methyl-thiazole, 2-n-octylfuran, 2-nonanone, 2-nonen-4-one, 2-octanone, 2-octenal, 2-pentanone, 2-pentyl-furan, 2-pentyl-thiophene, 2-phenylpropenal, 2-propenal, 2-propenoic acid, methyl ester, 2-thiophenecarboxaldehyde, 2-tridecen-1-ol, 2-undecanone, 2-undecenal, 3-(methylthio)-propanenitrile, 3-(phenylmethyl)-2,5-piperazinedione, 3,3'-dithiobis-2-methyl-furan, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, 3,5-di-tert-butylbenzoic acid, 3-decen-2-one, 3-ethylcyclopentanone, 3-ethyl-pentane, 3-methyl-2-butenal, 3-methyl-2-thiophenecarboxaldehyde, 3-methyl-3-buten-2-one, 3-methyl-butanal, 3-methyl-furan, 3-methylheptyl acetate, 3-methyl-pentanal, 3-pentyl-furan, 3-phenyl-furan, 3-thiophenecarboxaldehyde, 3-thiophenemethanol, 4,7-dimethyl-undecane, 4-chloro-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol, 4-ethoxy-benzoic acid, ethyl ester, 4-ethyl-2-methyl-pyrrole, 4-ethyl-benzaldehyde, 4-methyl-2-heptanone, 4-methyl-5-thiazoleethanol, 4-methylthiazole, 4-nitrophenyl 2-thiophenecarboxylic acid ester, 4-penten-2-one, 4-quinolinecarboxaldehyde, 5-(2-chloroethyl)-4-methylthiazole, 5-ethenyl-4-methyl-thiazole, 5-ethyldihydro-2(3H)-furanone, 5-formyl-4-methylthiazole, 5-methyl-1-undecene, 6-methyl-2-heptanone, 7-methyl-(E)-5-

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 9

Attorney Docket 38767-0015008

undecene, 9-octadecenal, acetaldehyde, acetic acid, acetone, acetonitrile, acetophenone, acetyl valeryl, aminophenylacetylene, benzaldehyde, benzene, benzoic acid, benzyl alcohol, bis(2-methyl-4,5-dihydro-3-furyl) disulfide, butanal, butanone, butyrolactone, carbon disulfide, decanal, dihydro-3-(2H)-thiophenone, dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone, dimethyl selenone, dimethyl sulfide, dimethyl trisulfide, dodecanal, ethanol, ethyl acetate, formic acid, heptyl ester, furan, furfural, heptanal, hexanoic acid, isopropyl alcohol, isothiazole, isothiocyanato-methane, m-aminophenylacetylene, methacrolein, methanethiol, methional, methyl (methylthio)methyl disulfide, methyl isopropyl disulphide, methyl thiolacetate, methyl vinyl ketone, methyl-pyrazine, methyl-thiirane, nonanal, octanal, octane, oxalic acid, diallyl ester, oxalic acid, isobutyl pentyl ester, p-cresol, p-dithiane-2,5-diol, pentanal, pentanoic acid, 2,2,4-trimethyl-3-hydroxy-, isobutyl ester, phenol, phenylacetaldehyde, propanal, propyl-cyclopropane, p-xylene, pyrazine, pyrrole, styrene, thiazole, thiocyanic acid, methyl ester, thiophene, toluene, trans-2-(2-pentenyl)furan, and tridecane.

52. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein the at least two volatile compounds are selected from 2-methyl-furan, bis(2-methyl-3-furyl)disulfide, 2-pentyl- furan, 3,3'-dithiobis-2-methyl-furan, 2,5-dimethyl-pyrazine, 2-methyl-3-furanthiol, dihydro-3- (2H)-thiophenone, 5-methyl-2-thiophenecarboxaldehyde, 3-methyl-2-thiophenecarboxaldehyde, 2-methyl-thiazole, dimethyl sulfide, decanal, 5-ethyldihydro-2(3H)-furanone, dihydro-5-pentyl- 2(3H)-furanone, 2-octanone, 3,5-octadien-2-one, p-cresol, and hexanoic acid.

53. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 31, wherein the at least two volatile compounds are 2-methyl-furan and bis(2-methyl-3-furyl)disulfide.

54. (Previously Presented) A meat-like food product produced by a method comprising:
providing one or more plant proteins; and
combining, with the one or more plant proteins:
a heme-containing protein;

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 10

Attorney Docket 38767-0015008

one or more of glucose, ribose, fructose, lactose, xylose, arabinose,
glucose-6-phosphate, maltose, and galactose; and
one or more of cysteine, cystine, thiamine, and methionine;
wherein the meat-like food product is free of animal heme-containing protein;
wherein cooking the meat-like food product results in the production of at least two
volatile compounds which have a meat-associated aroma; and
wherein the meat-like food product is in a form selected from the group consisting of a
hotdog, a burger, ground meat, a sausage, a steak, a filet, a roast, a meatball, a meatloaf, or
bacon.

55. (Previously Presented) The meat-like food product of claim 54, wherein the meat-like
food product is free of animal products.

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 11

Attorney Docket 38767-0015008

REMARKS

Claims 31-37 and 40-55 are pending, with claims 31 and 54 being independent. Claims 31, 34, and 35 have been amended to correct minor errors. No new matter has been introduced.

Applicant asks that all claims be allowed in view of the amendments to the claims. No fees are believed to be due. Please apply any necessary charges or credits to Deposit Account 06-1050, referencing the above attorney docket number.

Respectfully submitted,

Date: December 3, 2021

/Heather L. Flanagan/

Heather L. Flanagan, Reg. No. 54,101

Customer Number 26191
Fish & Richardson P.C.
Telephone: +1 512-226-8156
Facsimile: (877) 769-7945

100561931.doc

Electronic Patent Application Fee Transmittal				
Application Number:		15913090		
Filing Date:		06-Mar-2018		
Title of Invention:		METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES		
First Named Inventor/Applicant Name:		Rachel Fraser		
Filer:		Heather L. Flanagan/Emily Palmer		
Attorney Docket Number:		38767-0015008		
Filed as Large Entity				
Filing Fees for Utility under 35 USC 111(a)				
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
UTILITY APPL ISSUE FEE	1501	1	1200	1200

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Extension-of-Time:				
Miscellaneous:				
Total in USD (\$)				1200

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	44433045
Application Number:	15913090
International Application Number:	
Confirmation Number:	9878
Title of Invention:	METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES
First Named Inventor/Applicant Name:	Rachel Fraser
Customer Number:	26191
Filer:	Heather L. Flanagan/Emily Palmer
Filer Authorized By:	Heather L. Flanagan
Attorney Docket Number:	38767-0015008
Receipt Date:	03-DEC-2021
Filing Date:	06-MAR-2018
Time Stamp:	16:37:54
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	DA
Payment was successfully received in RAM	\$ 1200
RAM confirmation Number	E2021B3G38331924
Deposit Account	
Authorized User	
The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:	

File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Issue Fee Payment (PTO-85B)	IssueFee.pdf	252320	no	3
			83c179dabe62060634b72bc667d3b4edf4d7ccf9		
Warnings:					
Information:					
2		312Amendment.pdf	98414	yes	11
			6a072101febbca57df91d1039829852df232e37d		
	Multipart Description/PDF files in .zip description				
	Document Description		Start	End	
	Amendment after Notice of Allowance (Rule 312)		1	1	
	Claims		2	10	
	Applicant Arguments/Remarks Made in an Amendment		11	11	
Warnings:					
Information:					
3	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	37889	no	2
			77e182d09542054ca0105a5fd7a0378cf4180fc1		
Warnings:					
Information:					
Total Files Size (in bytes):			388623		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111

If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371

If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office

If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Attorney's Docket No.: 38767-0015008

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Named Inventor :	Rachel Fraser	Art Unit :	1796
Application No. :	15/913,090	Examiner :	Elizabeth A. Gwartney
Filed :	March 6, 2018	Confirmation No. :	9878
Notice of Allowance Date: November 4, 2021			
Title :	METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES		

MAIL STOP ISSUE FEE

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

REPLY TO NOTICE OF ALLOWANCE

In response to the Notice of Allowance dated November 4, 2021, enclosed is a completed Part B - Fee(s) Transmittal.

The issue fee is being paid with this reply on the Electronic Filing System. Apply those fees and any other necessary charges or credits to Deposit Account 06-1050, referencing the above attorney docket number.

COMMENTS ON EXAMINER'S REASONS FOR ALLOWANCE

It is recognized that in accordance with M.P.E.P. § 1302.14, the Examiner's reasons for allowance need not set forth all of the details as to why the claims are allowed. In the above-referenced application, it is not conceded that the Examiner's stated reasons for allowance are the only reasons for which the claims are allowable. The Examiner's reasons for allowance indicate that particular claim elements are not disclosed or suggested by the prior art of record, yet the claims may be patentable for other reasons as well, including the inventive combination of all of the recited claim elements. It is not conceded that the specific limitations identified by the Examiner are necessary to distinguish the art of record or to satisfy the requirements of 35 U.S.C. § 112. Moreover, the Examiner does not assert, and it would not be conceded, that the Examiner's reasons have any bearing on the patentability of claims in any other applications directed to the disclosed subject matter.

First Named Inventor : Rachel Fraser
Application No. : 15/913,090
Filed : March 6, 2018
Page : 2 of 2

Attorney Docket: 38767-0015008

In addition, each dependent claim stands on its own and may be allowable on its own merits. In particular, each dependent claim may be allowable on the basis of a combination of some of the features recited in the dependent claim and its base claim(s), which combination of features may not include all of the limitations identified in the Examiner's reasons for allowance.

Respectfully submitted,

Date: December 3, 2021

/Heather L. Flanagan/

Heather L. Flanagan, Reg. No. 54,101

Customer Number 26191
Fish & Richardson P.C.
Telephone: +1 512-226-8156
Facsimile: (877) 769-7945

100547240.doc

PART B - FEE(S) TRANSMITTAL

Complete and send this form, together with applicable fee(s), by mail or fax, or via EFS-Web

By mail, send to: Mail Stop ISSUE FEE
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22314-1450

By fax, send to: (571) 273-2885

INSTRUCTIONS: This form should be used for transmitting the ISSUE FEE and PUBLICATION FEE (if required). Blocks 1 through 5 should be completed where appropriate. All further correspondence including the Patent, advance orders and notification of maintenance fees will be mailed to the current correspondence address as indicated unless corrected below or directed otherwise in Block 1, by (a) specifying a new correspondence address; and/or (b) indicating a separate "FEE ADDRESS" for maintenance fee notifications.

CURRENT CORRESPONDENCE ADDRESS (Note: Use Block 1 for any change of address)

26191 7590 11/04/2021

FISH & RICHARDSON P.C.
P.O. BOX 1022
MINNEAPOLIS, MN 55440-1022

Note: A certificate of mailing can only be used for domestic mailings of the Fee(s) Transmittal. This certificate cannot be used for any other accompanying papers. Each additional paper, such as an assignment or formal drawing, must have its own certificate of mailing or transmission.

Certificate of Mailing or Transmission

I hereby certify that this Fee(s) Transmittal is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage for first class mail in an envelope addressed to the Mail Stop ISSUE FEE address above, or being transmitted to the USPTO via EFS-Web or by facsimile to (571) 273-2885, on the date below.

(Typed or printed name)

(Signature)

(Date)

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
15/913,090	03/06/2018	Rachel Fraser	38767-0015008	9878

TITLE OF INVENTION: METHODS AND COMPOSITIONS FOR AFFECTING THE FLAVOR AND AROMA PROFILE OF CONSUMABLES

APPLN. TYPE	ENTITY STATUS	ISSUE FEE DUE	PUBLICATION FEE DUE	PREV. PAID ISSUE FEE	TOTAL FEE(S) DUE	DATE DUE
nonprovisional	LARGE	\$1200	\$0	\$0	\$1200	02/04/2022

EXAMINER	ART UNIT	CLASS-SUBCLASS
----------	----------	----------------

GWARTNEY, ELIZABETH A.

1796

426-533000

1. Change of correspondence address or indication of "Fee Address" (37 CFR 1.363).

- ☐ Change of correspondence address (or Change of Correspondence Address form PTO/SB/122) attached.
- ☐ "Fee Address" indication (or "Fee Address" Indication form PTO/SB/47; Rev 03-09 or more recent) attached. **Use of a Customer Number is required.**

2. For printing on the patent front page, list

- (1) The names of up to 3 registered patent attorneys or agents OR, alternatively, 1 Fish & Richardson P.C.
- (2) The name of a single firm (having as a member a registered attorney or agent) and the names of up to 2 registered patent attorneys or agents. If no name is listed, no name will be printed. 2 _____
- 3 _____

3. ASSIGNEE NAME AND RESIDENCE DATA TO BE PRINTED ON THE PATENT (print or type)

PLEASE NOTE: Unless an assignee is identified below, no assignee data will appear on the patent. If an assignee is identified below, the document must have been previously recorded, or filed for recordation, as set forth in 37 CFR 3.11 and 37 CFR 3.81(a). Completion of this form is NOT a substitute for filing an assignment.

(A) NAME OF ASSIGNEE

Impossible Foods Inc.

(B) RESIDENCE: (CITY and STATE OR COUNTRY)

Redwood City, CA

Please check the appropriate assignee category or categories (will not be printed on the patent): ☐ Individual ☒ Corporation or other private group entity ☐ Government4a. Fees Submitted: ☒ Issue Fee ☐ Publication Fee (if required) ☐ Advance Order - # of Copies

4b. Method of Payment (Please first reapply any previously paid fee shown above):

☒ Electronic Payment via EFS-Web ☐ Enclosed check ☐ Non-electronic payment by credit card (Attach form PTO-2038)☒ The Director is hereby authorized to charge the required fee(s), any deficiency, or credit any overpayment, to Deposit Account No. 06-1050

5. Change of Entity Status (from status indicated above)

☐ Applicant certifying micro entity status. See 37 CFR 1.29☐ Applicant asserting small entity status. See 37 CFR 1.27.☐ Applicant changing to regular undiscounted fee status.

NOTE: Absent a valid Certification of Micro Entity Status (see forms PTO/SB/15A and 15B), issue fee payment in the micro entity amount will not be accepted at the risk of application abandonment.

NOTE: If the application was previously under micro entity status, checking this box will be taken as a notification of loss of entitlement to micro entity status.

NOTE: Checking this box will be taken as a notification of loss of entitlement to small or micro entity status, as applicable.

NOTE: This form must be signed in accordance with 37 CFR 1.31 and 1.33. See 37 CFR 1.4 for signature requirements and certifications.

Authorized Signature /Heather L. Flanagan/Date December 3, 2021Typed or printed name Heather L. FlanaganRegistration No. 54,101

PTOL-85 Part B (08-18). Approved for use through 1/31/2020

OMB 0651-0033

U.S. Patent and Trademark Office, U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

100547252.doc



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
15/913,090	03/06/2018	Rachel Fraser	38767-0015008	9878
26191 7590 12/13/2021 FISH & RICHARDSON P.C. (TC) PO BOX 1022 MINNEAPOLIS, MN 55440-1022			EXAMINER GWARTNEY, ELIZABETH A	
			ART UNIT	PAPER NUMBER
			1759	
			NOTIFICATION DATE	DELIVERY MODE
			12/13/2021	ELECTRONIC

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

The time period for reply, if any, is set in the attached communication.

Notice of the Office communication was sent electronically on above-indicated "Notification Date" to the following e-mail address(es):

PATDOCTC@fr.com

Response to Rule 312 Communication	Application No. 15/913,090	Applicant(s) Fraser et al.	
	Examiner ELIZABETH A GWARTNEY	Art Unit 1759	AIA (FITF) Status No
-- The MAILING DATE of this communication appears on the cover sheet with the correspondence address -- 1. ☒ The amendment filed on <u>07 December 2021</u> under 37 CFR 1.312 has been considered, and has been: a) ☒ entered. b) ☐ entered as directed to matters of form not affecting the scope of the invention. c) ☐ disapproved because the amendment was filed after the payment of the issue fee. Any amendment filed after the date the issue fee is paid must be accompanied by a petition under 37 CFR 1.313(c)(1) and the required fee to withdraw the application from issue. d) ☐ disapproved. See explanation below. e) ☐ entered in part. See explanation below. _____			
		/ELIZABETH GWARTNEY/ Primary Examiner, Art Unit 1759	

Receipt date: 05/08/2019

Sheet 1 of 2

Substitute Disclosure Form Information Disclosure Statement by Applicant (Use several sheets if necessary) (37 CFR §1.98(b))	U.S. Department of Commerce Patent and Trademark Office	Attorney Docket No. 38767-0015008	Application No. 15/913,090
	Applicant Impossible Foods Inc.		
	Filing Date March 6, 2018	Group Art Unit 1791	

U.S. Patent Documents							
Examiner Initial	Desig. ID	Document Number	Publication Date	Patentee	Class	Subclass	Filing Date If Appropriate
	1.	9700067	7/11/2017	Fraser			
	2.	10039306	8/7/2018	Vrljic et al.			
	3.	10172380	1/8/2019	Varadan et al.			
	4.	10172381	1/8/2019	Vrljic et al.			
	5.	20080026128	1/31/2008	Yamaguchi			
	6.	20140220217	8/7/2014	Brown et al.			
	7.	20150289541	10/15/2015	Brown et al.			
	8.	20160305361	~~10/29/2015~~	~~Holz-Schietinger et al.~~		10/2016	Akita
	9.	20170172169	6/22/2017	Grzanich			
	10.	20170188612	9/29/2016	Varadan et al.			
	11.	20180168209	6/21/2018	Fraser et al.			
	12.	20190116855	4/25/2019	Vrljic et al.			

Change(s) applied
to document,
/M.H.F./
11/11/2021

Foreign Patent Documents or Published Foreign Patent Applications								
Examiner Initial	Desig. ID	Document Number	Publication Date	Country or Patent Office	Class	Subclass	Translation	
							Yes	No
	13.	JP 2010-523125	7/15/2010	JAPAN			English Abstract	
	14.	JP 2013-192528	9/3/2013	JAPAN			English Abstract	
	15.	WO 2010/110493	10/4/2012	WIPO			English Abstract	

Other Documents (include Author, Title, Date, and Place of Publication)		
Examiner Initial	Desig. ID	Document
	16.	EPO Opposition, "Proprietor's observations and amendments under Rule 79(1) EPC," February 27, 2019, 50 pages
	17.	Fountoulakis and Lahm, "Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins", J. Chromatogr A, 826: 109-134, 1998
	18.	Konermann et al., "Acid-induced denaturation of myoglobin studied by time-resolved electrospray ionization mass spectrometry", Biochemistry, 1997, vol. 36, pages 6448-6454
	19.	MacMunn, "An address on some of the applications of the spectroscope to medicine", The British Medical Journal, January 3, 1891, pages 3-9

Examiner Signature /ELIZABETH GWARTNEY/	Date Considered 05/06/2020
EXAMINER: Initials citation considered. Draw line through citation if not in conformance and not considered. Include copy of this form with next communication to applicant.	

Substitute Disclosure Form

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /E.G./

Motif Exhibit 1150, Page 1596 of 1599



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPLICATION NO.	ISSUE DATE	PATENT NO.	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
15/913,090	01/18/2022	11224241	38767-0015008	9878

26191 7590 12/28/2021
FISH & RICHARDSON P.C. (TC)
PO BOX 1022
MINNEAPOLIS, MN 55440-1022

ISSUE NOTIFICATION

The projected patent number and issue date are specified above.

Determination of Patent Term Adjustment under 35 U.S.C. 154 (b) (application filed on or after May 29, 2000)

The Patent Term Adjustment is 279 day(s). Any patent to issue from the above-identified application will include an indication of the adjustment on the front page.

If a Continued Prosecution Application (CPA) was filed in the above-identified application, the filing date that determines Patent Term Adjustment is the filing date of the most recent CPA.

Applicant will be able to obtain more detailed information by accessing the Patent Application Information Retrieval (PAIR) WEB site (<http://pair.uspto.gov>).

Any questions regarding the Patent Term Extension or Adjustment determination should be directed to the Office of Patent Legal Administration at (571)-272-7702. Questions relating to issue and publication fee payments should be directed to the Application Assistance Unit (AAU) of the Office of Data Management (ODM) at (571)-272-4200.

INVENTOR(s) (Please see PAIR WEB site <http://pair.uspto.gov> for additional inventors):

Rachel Fraser, San Francisco, CA;
Patrick O'Reilly Brown, Stanford, CA;
Jessica Karr, San Francisco, CA;
Celeste Holz-Schietinger, East Palo Alto, CA;
Elysia Cohn, Sunnyvale, CA;

APPLICANT(s) (Please see PAIR WEB site <http://pair.uspto.gov> for additional applicants):

Impossible Foods Inc., Redwood City, CA;

The United States represents the largest, most dynamic marketplace in the world and is an unparalleled location for business investment, innovation, and commercialization of new technologies. The USA offers tremendous resources and advantages for those who invest and manufacture goods here. Through SelectUSA, our nation works to encourage and facilitate business investment. To learn more about why the USA is the best country in the world to develop technology, manufacture products, and grow your business, visit SelectUSA.gov.

AO 120 (Rev. 08/10)

TO: Mail Stop 8 Director of the U.S. Patent and Trademark Office P.O. Box 1450 Alexandria, VA 22313-1450	REPORT ON THE FILING OR DETERMINATION OF AN ACTION REGARDING A PATENT OR TRADEMARK
--	---

In Compliance with 35 U.S.C. § 290 and/or 15 U.S.C. § 1116 you are hereby advised that a court action has been
filed in the U.S. District Court _____ for the District of Delaware _____ on the following
☐ Trademarks or ☒ Patents. (☐ the patent action involves 35 U.S.C. § 292.);

DOCKET NO. 22-cv-00311-CFC	DATE FILED 3/9/2022	U.S. DISTRICT COURT for the District of Delaware
PLAINTIFF IMPOSSIBLE FOODS INC.		DEFENDANT MOTIF FOODWORKS, INC.
PATENT OR TRADEMARK NO.	DATE OF PATENT OR TRADEMARK	HOLDER OF PATENT OR TRADEMARK
1 10,863,761	12/15/2020	IMPOSSIBLE FOODS INC.
2		
3		
4		
5		

In the above—entitled case, the following patent(s)/ trademark(s) have been included:

DATE INCLUDED 7/25/2022	INCLUDED BY ☒ Amendment ☐ Answer ☐ Cross Bill ☐ Other Pleading	
PATENT OR TRADEMARK NO.	DATE OF PATENT OR TRADEMARK	HOLDER OF PATENT OR TRADEMARK
1 9,943,096	4/17/2018	IMPOSSIBLE FOODS INC.
2 10,039,306	8/7/2018	IMPOSSIBLE FOODS INC.
3 11,013,250	5/25/2021	IMPOSSIBLE FOODS INC.
4 11,224,241	1/18/2022	IMPOSSIBLE FOODS INC.
5		

In the above—entitled case, the following decision has been rendered or judgement issued:

DECISION/JUDGEMENT

CLERK	(BY) DEPUTY CLERK	DATE
-------	-------------------	------

Copy 1—Upon initiation of action, mail this copy to Director Copy 3—Upon termination of action, mail this copy to Director
Copy 2—Upon filing document adding patent(s), mail this copy to Director Copy 4—Case file copy

AO 120 (Rev. 08/10)

Mail Stop 8 TO: Director of the U.S. Patent and Trademark Office P.O. Box 1450 Alexandria, VA 22313-1450	REPORT ON THE FILING OR DETERMINATION OF AN ACTION REGARDING A PATENT OR TRADEMARK
---	---

In Compliance with 35 U.S.C. § 290 and/or 15 U.S.C. § 1116 you are hereby advised that a court action has been
filed in the U.S. District Court _____ for the District of Delaware _____ on the following

☐ Trademarks or ☒ Patents. (☐ the patent action involves 35 U.S.C. § 292.);

DOCKET NO. 22-cv-00311-CFC	DATE FILED 3/9/2022	U.S. DISTRICT COURT for the District of Delaware
PLAINTIFF IMPOSSIBLE FOODS INC.		DEFENDANT MOTIF FOODWORKS, INC.
PATENT OR TRADEMARK NO.	DATE OF PATENT OR TRADEMARK	HOLDER OF PATENT OR TRADEMARK
1 10,863,761	12/15/2020	IMPOSSIBLE FOODS INC.
2		
3		
4		
5		

In the above—entitled case, the following patent(s)/ trademark(s) have been included:

DATE INCLUDED	INCLUDED BY ☒ Amendment ☐ Answer ☐ Cross Bill ☐ Other Pleading	
PATENT OR TRADEMARK NO.	DATE OF PATENT OR TRADEMARK	HOLDER OF PATENT OR TRADEMARK
1 9,943,096	4/17/2018	IMPOSSIBLE FOODS INC. (included by amendment on 7/25/22)
2 10,039,306	8/7/2018	IMPOSSIBLE FOODS INC. (included by amendment on 7/25/22)
3 11,013,250	5/25/2021	IMPOSSIBLE FOODS INC. (included by amendment on 7/25/22)
4 11,224,241	1/18/2022	IMPOSSIBLE FOODS INC. (included by amendment on 7/25/22)
5 See Exhibit A		

In the above—entitled case, the following decision has been rendered or judgement issued:

DECISION/JUDGEMENT

CLERK	(BY) DEPUTY CLERK	DATE
-------	-------------------	------

Copy 1—Upon initiation of action, mail this copy to Director Copy 3—Upon termination of action, mail this copy to Director
Copy 2—Upon filing document adding patent(s), mail this copy to Director Copy 4—Case file copy