



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126113** (13) **U**
(51) МПК (2018.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 9/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 12299	(72) Винахідник(и): Данилова Олена Іванівна (UA), Решта Сентябрини Петрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.12.2017	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.06.2018	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.06.2018, Бюл.№ 11	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БЕТАГЛЮКАНІВ ІЗ КЛІТИННИХ СТІНОК МІКРООРГАНІЗМІВ

(57) Реферат:

Спосіб одержання бетаглюканів з клітинних стінок мікроорганізмів включає приготування суспензії дріжджів, обробку суспензії хімічним реагентом, руйнування біополімерів власними ферментами дріжджів, ферментативний гідроліз, відділення гідролізованої маси і сушіння цільового продукту. Суспензію дріжджів обробляють хлоридом натрію. Після руйнування біополімерів ендogenous ферменти дріжджів інактивують і здійснюють ферментативний гідроліз. При цьому спочатку в суспензію вводять екзогенні ферменти целовіридин та протосубтилін і витримують протягом 90-180 хвилин при температурі 44-46 °С, і відокремлюють твердий осад. Після цього твердий осад суспендують. В суспензію вводять ферментний препарат маназу або мультиензимний препарат з маназою активністю і витримують протягом 90-270 хвилин при 50-60 °С. Отриманий осад відокремлюють від супернатанту і піддають сушінню. Целовіридин вносять в суспензію в кількості 0,1-1,0 мас. % відносно до сухих дріжджів, а протосубтилін в кількості 0,4-2,0 мас. % відносно до сухих дріжджів. Маназу або мультиензимний препарат з маназою активністю вводять в суспензію в кількості 0,02-1,0 мас. %.

UA 126113 U

Корисна модель належить до галузі харчової промисловості, зокрема до технології одержання структурного β -глюкану із клітинних стінок мікроорганізмів, який призначений для профілактики імунного стану здоров'я людини. Корисна модель може бути використана в харчовій промисловості, біотехнології, медицині.

Відомий спосіб виділення β -глюкану з дріжджів у вигляді "цілих" частинок глюкану чи β -глюканових сфер (U.S. Patent 7566704 Int. Cl. A61K 31/715, A61K 47/00, C07H 1/00 Very high molecular weight β -glucans / Jamas S., Patchen M.L., Ostroff G. R., Easson D.D. - 11/333765; Biopolymer Engineering, Inc (US), Filing Date 17.01.2006; Public. Date 02.11.2006. - P. 19), який полягає у витримуванні клітин дріжджів у цитрат-фосфатному буфері при рН 5,5-7,5. Далі клітинну масу обробляють розчином NaOH (концентрація 0,1-10 г) при температурі 80-100 °С протягом трьох годин. Цю операцію повторюють двічі. Отриману суспензію витримують при кімнатній температурі 16 годин. Для очищення отриманого продукту додатково використовують ферменти. Отриманий продукт являє собою порошок, частинки якого мають сферичну форму (діаметр 2-4 мкм). Цей спосіб тривалий, а одержуваний відповідно до нього препарат (3-глюкану має низький ступінь чистоти (вміст полісахариду до 85 %, причому до його складу входять хітин і глікоген до 10 %), вміст білка 1 %, вихід 10-15 % від сухої маси дріжджів). Для отримання цільового продукту високого ступеня чистоти, потрібні значні витрати часу і матеріальних ресурсів, зокрема використання доволі агресивних хімічних реагентів (гідроксиду натрію), попереднє витримування у цитрат-фосфатному буфері з рН 5,5. обробка ферментами кілька разів і фракціонування отриманих продуктів реакції.

Відомий спосіб одержання структурного β -глюкану із клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що включає руйнування клітинних оболонок із використанням НВЧ-опромінення і подальше очищення цільового продукту (патент України № 116750). При цьому свіжі пресовані хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae* обробляють 6 %-им розчином натрію гідроксиду, отриману суспензію піддають обробці НВЧ-променями в надвисокочастотному електричному полі з частотою 2,45 ГГц протягом 120-360 с, після чого центрифугуванням відокремлюють осад, який обробляють 3 %-им розчином етанової кислоти, при співвідношенні тверда фаза: розчин 1: (1-3) і температурі 75 °С, отриманий осад відокремлюють від супернатанту і сушать етиловим спиртом. Суспензію обробляють НВЧ-променями циклічно з наступною періодичністю: 30 с, обробка, 30 с пауза, або 18 с обробка, 42 с пауза, або 42 с обробка, 18с пауза. Використання цього достатньо простого підходу дозволяє отримувати препарат з великим виходом, проте в цьому випадку доводиться значною мірою поступатися ступенем його чистоти. Крім того, треба чітко дотримуватися циклічності обробки і мати відповідну НВЧ-апаратуру. Треба відмітити, що загальний вміст вуглеводів достатньо високий - 88-94 %, але у препараті наявна значна кількість мананів.

Найбільш близьким за технічною суттю до запропонованого способу є спосіб одержання харчового біологічно активного продукту переробки дріжджів (патент РФ 2244438 МПК А23J 1/18, С12N 1/18, С12N 1/16), що включає промивання та позбавлення гіркоти дріжджів за допомогою гідрокарбонату натрію, витримування 11-16 годин при температурі 45-60 °С для здійснення автолізу, випарювання і сушіння. Автоліз здійснюють при співвідношенні тверда маса: рідина 1:1 при рН 5 з додаванням ферментного препарату амілоризину П10х у кількості 0,2 % до маси дріжджів і витримують з перемішуванням 5-6 годин. Далі здійснюють сепарування, непрогідролізовані клітинні стінки видаляють, а як цільовий продукт використовують гідролізат, який згущують за допомогою вакуум-випарної установки до масової частки сухих речовин 73-75 % і висушують в розпилюючому режимі до вмісту вологи 5-6 %. Готовий препарат містить 3-3,5 % амінного азоту, може бути використаний як БАД.

Цей спосіб вибрано за прототип.

Прототип і спосіб, що заявляється, мають наступні спільні ознаки:

суспендування клітин дріжджів, позбавлення гіркоти, промивання;

руйнування клітинних оболонок за допомогою ферментних препаратів;

очищення цільового продукту, сушіння.

Але отриманий таким чином продукт має невисокий ступінь чистоти, тобто, отримується вуглеводно-протеїновий комплекс, у складі якого є манани, глюкани, хітин та залишки білкових компонентів. Крім цього, внаслідок ферментативного гідролізу амілоризином П10х, основною складовою якого є α -амілаза (α -1,4-глюкан-4-глюкангідролаза), що каталізує гідроліз крохмалю до мальтози і декстрину з різною молекулярною масою, а також ендо- і екзопротеази, що каталізують розщеплення високомолекулярних білків до пептидів і амінокислот, отримані препарати мають невизначений склад і різну, дуже часто не дуже високу молекулярну масу. Крім цього, додатково для позбавлення гіркоти використовують гідрокарбонат натрію, а нуклеїнові кислоти видаляють разом із залишками клітинних оболонок сепаруванням. Між тим,

саме твердий залишок (залишки клітинних оболонок) містить бетаглюкани, які є цінними компонентами, зокрема можуть бути використані як імуномодулятори, антиканцерогени, антибактеріальні засоби (Adams D.S., Journal of Leukocyte Biology, 1997), а пропонуються використання препарату з меншою молекулярною масою, але розчинного у воді.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб одержання бетаглюкану із клітинних стінок дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, в якому крім автолізу клітинних стінок екзоферментами при температурі, завдяки використанню ферментних препаратів целовіридину Г20х та протосубтиліну Г3х чи амілосубтиліну Г3х, можливо більш повно виділити маноглюкановий комплекс клітинних стінок та значною мірою позбутися протеїнової складової, а обробка ферментним препаратом маназою або ферментними препаратами, що її містять (Sunzyme, Laminex BG, VILZIM тощо), забезпечує отримання чистого продукту, в якому практично відсутні манани і досягається спрощення способу при зменшенні витрат. Серед перелічених мультиферментних комплексів слід віддавати перевагу тим, що містять більше манази і майже не містять бетаглюканази, тому Sunzyme, що має ксиланазу, целюлазу і маназну активності найбільш придатний для поставлених цілей, якщо не використовувати чистий препарат манази. Така обробка дозволить отримати β -1,3/1,6-глюкани із підвищеним вмістом основної складової та достатньою молекулярною вагою для найбільш повного прояву антиоксидантних та пребіотичних властивостей.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі отримання бетаглюканів із клітинних стінок мікроорганізмів, що включає приготування суспензії дріжджів, обробку суспензії хімічним реагентом, руйнування біополімерів власними ферментами дріжджів, ферментативний гідроліз, відділення гідролізованої маси і сушіння цільового продукту, згідно з корисною моделлю, суспензію дріжджів обробляють хлоридом натрію, а після руйнування біополімерів ендogenous ферменти дріжджів інактивують і здійснюють ферментативний гідроліз, при цьому спочатку в суспензію вводять екзогенні ферменти целовіридин та протосубтилін і витримують протягом 90-180 хвилин при температурі 44-46 °C і відокремлюють твердий осад, після цього твердий осад суспендують, в суспензію вводять ферментний препарат маназу або мультиензимний препарат з маназною активністю і витримують протягом 90-270 хвилин при 50-60 °C, отриманий осад відокремлюють від супернатанту і піддають сушінню. Целовіридин вносять в суспензію в кількості 0,1-1,0 мас. % відносно до сухих дріжджів, а протосубтилін в кількості 0,4-2,0 мас. % відносно до сухих дріжджів, маназу або мультиензимний препарат з маназною активністю вводять в суспензію в кількості 0,02-1,0 мас. %.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягненням заявленого технічного результату можна пояснити наступним.

На початку ферментативного гідролізу при використанні препаратів целовіридин і протосубтилін під дією ферментів карбогідраз, зокрема, бетаглюканази, джерелом яких є ферментний препарат целовіридин, що каталізує гідроліз основного полімеру клітинної стінки дріжджів бетаглюкану, а також завдяки наявності ферментів протеїнази і пептидази, джерелом яких є ферментний препарат протосубтилін чи амілосубтилін, що містить нейтральну амілазу, слаболужну і нейтральну протеазу, глюконазу та ін. ферменти, і каталізують гідроліз по пептидних зв'язках білково-бетаглюканового, білково-мананового і білково-хітинового полімерів в супернатант переходять продукти ферментативного гідролізу. Таким чином, супернатант складається з розщеплених білкових комплексів і, відповідно, розчинних часток бетаглюкану, манану і хітину, а також компонентів вивільненої цитоплазми клітин дріжджів - як результат руйнування полімерів їх стінок. Процес гідролізу на першій стадії призводить до отримання суміші, що містить продукти гідролізу бетаглюкану, білки цитоплазми клітин дріжджів, що вивільнилися, білки, що утворилися в результаті ферментативного гідролізу по пептидних зв'язках білково-бетаглюканового, білково-мананового і білково-хітинового полімерів, а також тих, що звільнилися з білкових комплексів бетаглюканів, мананів і хітину. Далі під дією ендоманази манопротеїновий комплекс піддається розщепленню, при цьому манани та інші полісахариди, окрім бетаглюкану, перетворюються на водорозчинні сполуки і можуть бути відокремлені від нерозчинного у воді бетаглюкану відомими прийомами, зокрема центрифугуванням. За таких умов бетаглюкан не розщеплюється і залишається нерозчинним у воді. В осаді після центрифугування залишаються концентровані препарати бетаглюканів, які піддавали подальшому аналізу і з'ясували, що вміст основного компонента збільшився майже вдвічі і містив 75-87 % суми бета-1, 6-глюкана і бета-1, 3-глюкана. Всі отримані після ферментативного гідролізу препарати глюканів давали негативну реакцію з йодом, що вказує на відсутність в них домішок глікогену.

Обробка водної суспензії клітин дріжджів здійснювалася шляхом додавання до водної суспензії клітин дріжджів ферментних препаратів целовіридину Г20х і протосубтилін 3х-П-120 чи

амілосубтиліну Г3х і витримки впродовж 90-180 хв, природному рН 5,8-6,0 і постійному перемішуванні. Зруйновані дріжджові клітини, що містили фрагменти клітинних стінок, центрифугували при 6000 об/год. Осад, що являє собою манано-глюкановий комплекс, з'єднаний з білковими компонентами, промивали фосфатним буфером і водою і готували суспензію з масовою часткою 5 %.

Суспензію клітинних стінок дріжджів об'ємом 500 см³ доводили до значення рН 4,0-5,5, вносили 0,1-0,15 г ферментного препарату ендомананази (із розрахунку 0,02-1,0 мас. % до початкової кількості сухих дріжджів) і впродовж 90-270 хв при температурі 50-60 °С здійснювали ферментативний гідроліз полісахаридів, що формують зовнішній шар клітинної стінки.

Суспензію концентрованих препаратів (3-глюканів центрифугували, осад кілька разів промивали 0,1 н. фосфатним буфером і водою, а потім висушували.

Збільшення чистоти отриманих препаратів досягається за рахунок використання мультіензимного впливу препаратів гідролаз.

Крім цього, використанні гідролази за підібраних параметрів дозволяють скоротити час отримання препаратів із достатньо високою молекулярною масою.

Технічним результатом даного способу є:

отримання чистого препарату бетаглюкану, в якому вміст основного компонента сягає 85-93 %;

спрощення процесу шляхом використання невисоких температур і неагресивних реагентів; зменшення часу проведення процесу і енерговитрат.

Спрощення досягається за рахунок:

можливості одночасного використання двох ферментних препаратів після термічного автолізу сприяє швидкому відділенню фрагментів клітинних стінок від інших складових клітини;

використання манази сприяє збереженню бетаглюканового комплексу, оскільки гідролітичному розщепленню піддається тільки манановий комплекс із залишками протеїнів, який формує зовнішній шар клітинної стінки.

Спосіб здійснюється в наступному порядку.

1. Підготовка та початковий лізис клітин дріжджів.

Спочатку передбачається приготування водної суспензії клітин дріжджів, денуклеїнізації за допомогою хлориду натрію з масовою часткою NaCl у розчині 0,5-2,0 %, витримування при температурі 50 °С 20-30 хв при постійному перемішуванні, під час якого відбувається початкова руйнація клітинних стінок під впливом власних ферментів дріжджів, інактивація ендогенних ферментів клітин дріжджів здійснюється шляхом термічної обробки при температурі 85-95 °С впродовж 15-20 хвилин. Отримана суміш має рН 5,8-6,0. Далі її охолоджують до температури 54-56 °С і здійснюють ферментативний гідроліз полімерів клітин дріжджів екзогенними ферментами.

2. Ферментативний гідроліз.

Ферментативний гідроліз здійснюють в дві стадії. На першій під дією целовіридину Г20х і протосубтиліну 3х-П-120 (або амілосубтиліну Г3х), здійснюють остаточну руйнацію і розщеплення клітинної стінки. Целовіридин Г20х і протосубтилін П3х додають до суспензії і витримують при температурі 44-46 °С впродовж 90-180 хв, природному рН 5,8-6,0. Протосубтилін П3х каталізує гідроліз білків цитоплазми клітини і частково клітинних стінок (мано-протеїнового комплексу). Целовіридин додають у кількості 10,0 од. на 1 г сухих дріжджів (1,0 мас. % до сухих дріжджів при активності в препараті целовіридину 1000 од. бета-ГКС на 1 г препарату) як джерело суміші екзобетаглюканази і ендобетаглюканази, що каталізують ферментативний гідроліз бетаглюкану. Протосубтилін використовують з розрахунку 5,0 од. на 1 г сухих дріжджів як джерело протеїнази і пептидази (0,4 мас. % до сухих дріжджів при активності ферментів в препараті протосубтиліну 260-270 од. на 1 г препарату), що каталізує гідроліз по пептидних зв'язках білково-бетаглюканового, білково-мананового і білково-хітинового комплексів клітинних стінок. Можна використати целовіридин і амілосубтилін Г3х з активністю 600 од. на 1 г препарату, який є джерелом ксіланази, β-глюконази, целюлази, протеази і дозволяє розщеплювати не тільки вуглеводні зв'язки але й глюкотеїдні, що забезпечує більш повну деградацію клітин.

Здійснюють центрифугування для відділення мано-протеїн-глюканового комплексу від розчинних компонентів, промивають його водою або буферним розчином. Отриманий продукт містить 78-85 % вуглеводної і 15-20 % азотистої складових. Аналіз продуктів гідролізу показав наявність глюкози і манози у співвідношенні (2,3-1,2): 1, що є характерним для мано-

глюканового комплексу дріжджів. Крім цього, були виявлені структурні одиниці, характерні для хітин-глюканового комплексу.

3. Виділення і очищення бетаглюкану.

Здійснюють суспендування манано-протеїн-глюканового комплексу у воді або буфері з pH 5,5. До суспензії об'ємом 500 см³ вносять 0,1 г грибного ферментного препарату манази або мультиензимного препарату з маназою активністю (із розрахунку 0,02 мас. % до початкової кількості сухих дріжджів) і впродовж 90-270 хв здійснюють ферментативний гідроліз полісахаридів, що формують зовнішній шар клітинної стінки. Суспензію центрифугують при 7000-9000 об./хв, 15-20 хв при кімнатній температурі для відділення осаду від супернатанту. Осад висушують за допомогою етилового спирту, ефіру або у розпилювальній сушарці. Отриманий препарат являє собою дрібний порошок світлого кольору. Вихід препарату складає 10,2-12,8 % від сухої маси дріжджів.

Для підтвердження належності препаратів до категорії бетаглюканів використовували метод поляриметрії (визначення питомої оптичного обертання) і ферментативні методи.

Величини питомої оптичного обертання зразків знаходяться в інтервалі 8,5°-8,9° і відповідають літературним даними ([α]_{20D} глюкану дріжджів 8,7°). Полісахариди дають негативну реакцію з йодом, що вказує на відсутність в них домішок глікогену. Гідроліз препарату здійснюється за допомогою ферментних препаратів з β- (1 → 3) та β- (1 → 6)-глюканазою активністю, а під дією α-амілази, яка розщеплює глікоген і крохмаль, утворення водорозчинних вуглеводів - продуктів гідролізу глюканів - виявлено не було.

Як джерело клітинних стінок можливо використовувати різні види дріжджів, зокрема *Saccharomyces delbruekii*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces microellipsodes*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces polysporus*, *Candida albicans*, *Candida cloacae*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Hansenula wingei*, *Hansenula ami*, *Hansenula henrici* and, *Hansenula americana*.

Приклади, які пояснюють здійснення способу.

Приклад 1. Готують водну суспензію з 100 г сухих пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і 200 см³ води. Для денуклеїзації додають 1,0 г хлориду натрію, суміш ретельно перемішують 30 хв при температурі 50 °С. Для інактивації ендогенних ферментів клітин дріжджів приготувану суспензію нагрівають до температури 95 °С і витримують 15 хв, після чого суміш охолоджують до температури 54 °С. Додають ферментні препарати: целовіридин і протосубтилін у кількості 0,1 г (0,1 мас. %) і 0,4 г (0,4 мас. %) відповідно. Ферментативний гідроліз на першій стадії проводять при pH 5,8 впродовж 140 хв при температурі 44 °С при постійному перемішуванні.

Після завершення першої стадії ферментативного гідролізу суспензію, оброблену ферментами на першій стадії, охолоджують до температури 44 °С, центрифугують і здійснюють другу стадію ферментативного гідролізу. Твердий залишок після центрифугування суспендують у воді об'ємом 100 см³, доводять значення pH до 5,0, вносять 0,02 г (0,02 мас. %) грибного ферментного препарату манази і витримують 90 хв при температурі 50 °С. Суспензію центрифугують при 7000 об./хв 15 хв при кімнатній температурі для відділення осаду від супернатанту. Осад висушують за допомогою етилового спирту і ефіру. Отриманий препарат являє собою дрібний порошок світлого кольору. Вихід препарату складає 10,2 % від сухої маси дріжджів.

Приклад 2. Клітини дріжджів *S. cerevisiae*, вирощені на середовищі, що містить розчин мінеральних солей, меласу та гідролізат рослинної сировини, як джерело цукрів, відмивають від залишків поживного середовища. 100 г дріжджової біомаси суспендують у фосфатному буфері з pH 5,5 при співвідношенні дріжджі: буферний розчин 1:1. Для денуклеїзації додають 0,5 г хлориду натрію, суміш ретельно перемішують 30 хв при температурі 50 °С. Далі суміш нагрівають до температури 95 °С і витримують 15 хв, після чого охолоджують до температури 44 °С і вносять ферментні препарати: 1,0 мас. % целовіридин Г20х і 2,0 мас. % амілосубтилін Г3х, витримують протягом 120 хвилин. Суміш, що містить фрагменти клітинних стінок, центрифугують при 6000 об./хв 20 хв, осад промивають фосфатним буфером і водою і готують суспензію промитих клітинних стінок з масовою часткою 5 %. Суспензію клітинних стінок дріжджів об'ємом 100 см³ доводять до значення pH 5,5, вносять 0,02 мас. % грибного ферментного препарату манази і при температурі 52 °С впродовж 120 хв здійснюють ферментативний гідроліз полісахаридів, що формують зовнішній шар клітинної стінки.

Суспензію центрифугують при 8000 об./хв впродовж 20 хв, осад кілька разів промивають 0,1 н. фосфатним буфером і водою, а потім висушують. Готовий продукт містить 88 % бетаглюкану з виходом 11 % від ваги початкової дріжджової біомаси.

Приклад 3. Здійснюють аналогічно прикладу 1, але замість грибної ендоманази використовують ферментний препарат Sunzyme.

Приклад 4. Здійснюють аналогічно прикладу 1, але замість грибної ендоманази використовують ферментний препарат Laminex BG.

5 Приклад 5. Здійснюють аналогічно прикладу 2, але замість грибної ендоманази використовують ферментний препарат PuraBrite™ EC 3.2.1.78, із маназною активністю 500 од/г (Genencor International, США). Температуру підіймають до 60 °C і pH 8,0. Час обробки 180 хв. Після закінчення процесу твердий залишок кілька разів промивають водою, центрифугують, висушують. Отримують препарат світлого кольору, що містить 82 % бетаглюкану з виходом
10 10,5 % від початкової маси сухих дріжджів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 1. Спосіб одержання бетаглюканів з клітинних стінок мікроорганізмів, що включає приготування суспензії дріжджів, обробку суспензії хімічним реагентом, руйнування біополімерів власними ферментами дріжджів, ферментативний гідроліз, відділення гідролізованої маси і сушіння цільового продукту, який **відрізняється** тим, що суспензію дріжджів обробляють хлоридом натрію, а після руйнування біополімерів ендogenous ферменти дріжджів інактивують і здійснюють ферментативний гідроліз, при цьому спочатку в суспензію вводять екзогенні ферменти
20 целовіридин та протосубтилін і витримують протягом 90-180 хвилин при температурі 44-46 °C, і відокремлюють твердий осад, після цього твердий осад суспендують, в суспензію вводять ферментний препарат маназу або мультиензимний препарат з маназною активністю і витримують протягом 90-270 хвилин при 50-60 °C, отриманий осад відокремлюють від супернатанту і піддають сушінню.

25 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що целовіридин вносять в суспензію в кількості 0,1-1,0 мас. % відносно до сухих дріжджів, а протосубтилін в кількості 0,4-2,0 мас. % відносно до сухих дріжджів.

30 3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що маназу або мультиензимний препарат з маназною активністю вводять у суспензію в кількості 0,02-1,0 мас. %.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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