

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

WO 2010/058616 A1

PCT

(43) 国際公開日
2010年5月27日(27.05.2010)

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/16 (2006.01) A23L 1/28 (2006.01)
A23L 1/221 (2006.01) A23L 1/39 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/059206
- (22) 国際出願日: 2009年5月19日(19.05.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-294642 2008年11月18日(18.11.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): アサヒビール株式会社(ASAHI BREWERIES, LTD.) [JP/JP]; 〒1308602 東京都墨田区吾妻橋1-23-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてののみ): 澁谷 一郎 (SHIBUYA Ichiro) [JP/JP]; 〒3020106 茨城県守谷市緑1丁目1番21 アサヒビール株式会社食品技術研究所内 Ibaraki (JP). 岡野 宏章 (OKANO Hiroaki) [JP/JP]; 〒3020106 茨城県守谷市緑1丁目1番21 アサヒビール株式会社食品技術研究所内 Ibaraki (JP). 金岡 禧友 (KANAOKA Yoshitomo) [JP/JP]; 〒3020106 茨城県

守谷市緑1丁目1番21 アサヒビール株式会社 食品技術研究所内 Ibaraki (JP).

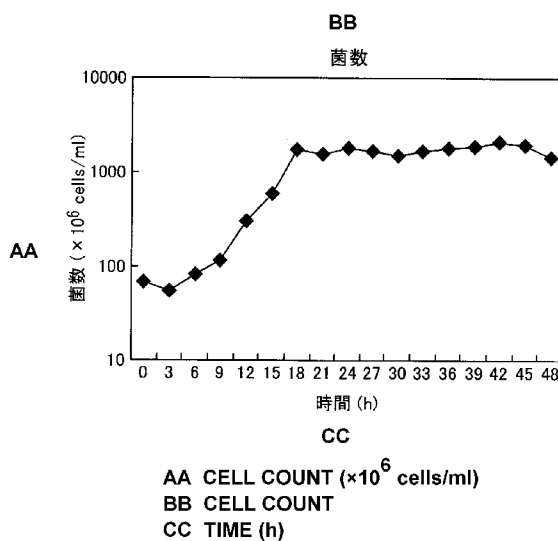
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, 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.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF GLUTAMIC ACID-RICH YEAST

(54) 発明の名称: グルタミン酸高含有酵母の製造方法

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a method for producing a yeast containing glutamic acid at a high concentration. Specifically disclosed is a method for culturing a yeast, in which a yeast that is in a stationary growth phase is cultured in a liquid culture medium having a pH value of not lower than 7.5 and lower than 11. By adjusting the pH value of the liquid culture medium for the yeast that is in a stationary growth phase to any value falling within the range of not lower than 7.5 and lower than 11 and subsequently further culturing the yeast in the liquid culture medium, it becomes possible to produce a yeast containing glutamic acid at a high concentration. In the method, *Saccharomyces cerevisiae* or *Candida utilis* can be used as the yeast. Therefore, by using the yeast containing glutamic acid at a high concentration produced by the method or an extract of the yeast, it becomes possible to provide a flavor additive composition, a food or a beverage containing glutamic acid at a high concentration.

(57) 要約: 本発明は、グルタミン酸を高濃度に含有する酵母の製造方法を提供する。本発明の酵母の培養方法においては、増殖の定常期にある酵母を、液体培地のpHが7.5以上11未満である条

件下で液体培養する。増殖の定常期にある酵母の液体培地のpHを7.5以上11未満に調整後、さらに培養することにより、グルタミン酸高含有の酵母を製造することができる。本発明においては、前記酵母がサッカロマイセス・セレビシエ、キャンディダ・ユティリスとすることができるので、本発明の方法により得られるグルタミン酸高含有酵母、及びこれから抽出されたエキスをを用いることで、グルタミン酸高含有の調味料組成物、及び飲食品を提供することができる。

WO 2010/058616 A1

WO 2010/058616 A1



CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, 添付公開書類:
TG).

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： グルタミン酸高含有酵母の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、グルタミン酸高含有酵母の製造方法、グルタミン酸高含有酵母、グルタミン酸高含有酵母エキス、及びグルタミン酸高含有酵母エキス含有飲食品に関する。

背景技術

[0002] 現在、日本をはじめ欧米などの先進国を筆頭に、世界中で添加物を使用しない自然かつ健康志向の天然調味料が望まれている。そのような中、酵母エキス業界では核酸などの「旨味」を増強した高付加価値エキスの開発が行なわれているが、核酸と並び「旨味」の代表であるグルタミン酸などのアミノ酸についても開発が進んでいる。

グルタミン酸は、従来からグルタミン酸ナトリウムが化学調味料などとして普及しているが、近年は、グルタミン酸を天然に含有する酵母を培養して得られた培養物やエキスなどを飲食品に用いることが好まれている。

[0003] 例えば、特許文献1には、酵母抽出物を有効成分とする甘味改善剤が記載され、該酵母抽出物が、5'-イノシン酸ナトリウム及び／または5'-アデニル酸ナトリウム、5'-グアニル酸ナトリウム、5'-ウリジル酸ナトリウム及び5'-シチジル酸ナトリウムを各々1～15%、及びグルタミン酸ナトリウムを1～20%含有している。

また、特許文献2には、乾燥菌体1g当たり15mg以上の遊離グルタミンを含有する酵母を消化する工程を含んでなる、細胞内遊離グルタミン由来のグルタミン酸をエキス固形分に対して少なくとも3%含む酵母エキスの製造方法が記載されている。

また、特許文献3には、酵母を消化、或いは分解した酵母エキスであり、1マイクロメートルの孔径を有する濾過膜を透過させ、その透過部をゲル濾過に供し、分画された流出液中の220nmにおける吸光光度法で検出され

たペプチド類において、分子量10000以上となるものの比率が、全検出されたペプチド類の総量に対し、10%以上となる事を特徴とする酵母エキスが記載されている。

また、特許文献4には、L-グルタミン酸（Na塩として）を13重量%以上含有することを特徴とするグルタミン酸高含有酵母エキスが記載されている。

また、特許文献5には、遊離アミノ酸の含有量が25重量%以上であり、かつ核酸系呈味性成分の合計含有量が2重量%以上であることを特徴とする酵母エキスが記載されている。

また、特許文献6には、核酸系呈味物質、グルタミン酸類、カリウム及び乳酸、乳酸ナトリウム又は乳酸カリウムを含有し、モル比が核酸系呈味物質：グルタミン酸類＝1：2～40でありかつ（核酸系呈味物質＋グルタミン酸類）：カリウム：（乳酸、乳酸ナトリウム又は乳酸カリウム）＝1：5～80：10～80であることを特徴とする調味料組成物が記載されている。

また、特許文献7には、グルタミン酸拮抗生育阻害剤に耐性を有し、菌体内にグルタミン酸を蓄積する酵母が記載されている。

また、特許文献8には、細胞膜の構造・機能を障害する薬剤ナスタチンに耐性を有し、菌体内にL-グルタミン酸を530mg/l以上蓄積する能力を有するヤロウィア・リポリティカ酵母を用いることを特徴とする酵母エキスの製造方法が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第3088709号公報

特許文献2：特開2002-171961号公報

特許文献3：特開2005-102549号公報

特許文献4：特開2006-129835号公報

特許文献5：特開2007-49989号公報

特許文献6：特開平5-227911号公報

特許文献7：特開平9－294581号公報

特許文献8：特許第3896606号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、従来の方法では、酸加水分解（HVP）処理など分解処理を行なう必要がある等、操作が煩雑になる場合が多かった。また、現在市販されている酵母エキスの遊離グルタミン酸含有量は10%前後のものが多く、よりグルタミン酸を高濃度に含有する酵母エキスの製造方法が望まれている。

特許文献1については、グルタミン酸ナトリウムを1～20%含有した酵母抽出物と記載されているが、実際に使用しているものはグルタミン酸ナトリウム5.0%含有した市販品であって、それ以上のものについては何も言及されていない。

また、特許文献2については、遺伝子組み換えで行なっており、操作が煩雑であり、かつ食品としての安全性、嗜好性等に劣る。

また、特許文献3については、グルタミン酸ナトリウム（ソーダ）を固形分当たり10%以上含有と記載してあるが、実施例については何らそれへの言及がない。

また、特許文献4については、酵素処理をするなど操作が煩雑である。

また、特許文献5については、酵素を使用するなど操作が煩雑であるのに加え、乾燥粉末当たりのグルタミン酸は13%程度である。

また、特許文献6については、グルタミン酸を外添したものにすぎない。

また、特許文献7については、乾燥菌体重量当たりのグルタミン酸含有量は低い。

また、特許文献8については、親株に薬剤耐性付与を行なうなど、操作が煩雑である。

[0006] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、グルタミン酸、特に遊離グルタミン酸を従来よりも高濃度に含有するグルタミン酸高含有酵母の製

造方法、グルタミン酸高含有酵母、グルタミン酸高含有酵母エキス、およびグルタミン酸含有飲食品を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意研究を行った結果、増殖の定常期にある酵母の培養中に培養液を特定のpHに上昇（アルカリ性域にシフト）させることにより酵母中のグルタミン酸含有量、特に遊離グルタミン酸含有量が増加することを見出した。そして、この酵母を用いて酵母エキスを製造することにより、グルタミン酸含有量の高い酵母エキスを製造することができることを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下の構成を採用する。

[0008] (1) 増殖の定常期にある酵母を、液体培地のpHが7.5以上11未満である条件下で液体培養する工程を含む、酵母の培養方法。

(2) 前記の液体培養する工程が、

酵母の増殖が定常期に入った後に液体培地のpHを7.5以上11未満に調整する工程；及び

当該酵母を当該pHの範囲内において更に培養する工程；を含む、前記(1)に記載の酵母の培養方法。

(3) 前記の液体培地のpHを7.5以上11未満に調整する工程が、

前記液体培地にアルカリ物質を添加する工程である、前記(2)に記載の培養方法。

(4) 前記の液体培養する工程において、培養酵母の一部を回収し、当該酵母内の遊離グルタミン酸含有量の測定を断続的に行う、前記(1)に記載の培養方法。

(5) 前記酵母がサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、又はキャンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) である前記(1)～(4)の何れか一つに記載の、酵母の培養方法。

(6) 前記(1)～(5)の何れか一つに記載の培養方法で培養した酵母

を回収する工程を含む、酵母の製造方法。

(7) 前記(1)～(5)の何れか一つに記載の酵母の培養方法によって得られた、又は前記(6)に記載の製造方法によって得られた酵母。

(8) 遊離グルタミン酸含有量が、乾燥酵母菌体当たり2.3～10.0重量%である、前記(7)に記載の酵母。

(9) 前記遊離グルタミン酸含有量が、乾燥酵母菌体当たり、4.0～10.0重量%である、前記(8)に記載の酵母。

(10) 前記(7)に記載の酵母から抽出された酵母エキス。

(11) 前記酵母エキス中の遊離グルタミン酸含有量が、乾燥重量当たり7～30重量%である、前記(10)に記載の酵母エキス。

(12) 前記酵母エキス中の遊離グルタミン酸含有量が、乾燥重量当たり20～30重量%である、前記(11)に記載の酵母エキス。

(13) 遊離グルタミン酸含有量が、乾燥重量当たり20～30重量%である、酵母エキス。

(14) 遊離グルタミン酸含有量が、乾燥酵母菌体当たり4.0～10.0重量%である、酵母。

(15) 前記(10)～(13)の何れか一つに記載の酵母エキスを含有する、調味料組成物。

(16) 前記(7)～(9)、又は(14)の何れか一つに記載の酵母、前記(10)～(13)の何れか一つに記載の酵母エキス、又は前記(15)に記載の調味料組成物を含有する、飲食品。

発明の効果

[0009] 本発明のグルタミン酸高含有酵母の製造方法によれば、増殖の定常期にある酵母の液体培地のpHをアルカリにシフトするだけで簡便にグルタミン酸含有量、特に遊離グルタミン酸含有量が顕著に増加したグルタミン酸高含有酵母を製造することができる。

[0010] 本発明のグルタミン酸高含有酵母から抽出作業を行なうことにより、グルタミン酸、特に遊離グルタミン酸を高濃度で含むグルタミン酸高含有酵母エ

キスが得られる。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1] 図1は、実施例2において、培養時間に対する菌数の増加曲線を示す。
- [図2] 図2は、実施例2において、培養時間に対する乾燥酵母菌体重量の増加曲線を示す。
- [図3] 図3は、実施例2において、培養時間に対する液体培地のpHの変化を示す。

発明を実施するための形態

- [0012] 本発明の酵母の培養方法は、増殖の定常期にある酵母を、液体培地のpHが7.5以上11未満である条件下で、液体培養する工程を含むことを特徴とする。この培養方法を行うことで、グルタミン酸高含有酵母を得ることが可能になる。

以下に、本発明の実施形態について詳細に説明する。

- [0013] 酵母としては、単細胞性の真菌類であればよく、具体的には、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属菌、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属菌、ピキア (*Pichia*) 属菌、キャンディダ (*Candida*) 属菌、クリベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属菌、ウィリオプシス (*Williopsis*) 属菌、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属菌、ガラクトマイセス (*Galactomyces*) 属菌、トルラスポラ (*Torulaspora*) 属菌、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属菌、ヤロウィア (*Yarrowia*) 属菌、ジゴサッカロマイセス (*Zygosaccharomyces*) 属菌などが挙げられる。

これらの中でも、可食性であることから、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、キャンディダ・リポリティカ (*Candida lipolytica*)、キャンディダ・ユティリス (*Candida utilis*)、キャンディダ・サケ (*Candida sake*)、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cere*

v i s i a e) などが好ましく、より好ましくは汎用されているサッカロマイセス・セレビシエ、キャンディダ・ユティリスである。

[0014] 本発明を実施するには、上記の酵母を炭素源、窒素源及び無機塩等を含む液体培地で定常期まで培養した後、増殖の定常期にある酵母の液体培地のpHが7.5以上11未満である条件下で、液体培養すればよい。

これら菌株の培地組成としては、特に限定されるものではなく、定法において利用されるものを用いることができる。例えば、炭素源として通常の微生物の培養に利用されるグルコース、蔗糖、酢酸、エタノール、糖蜜および亜硫酸パルプ廃液等からなる群より選ばれる1種または2種以上が用いられ、窒素源としては、尿素、アンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムもしくはリン酸アンモニウム等の無機塩、およびコーンスティプリカー(CSL)、カゼイン、酵母エキスもしくはペプトン等の含窒素有機物等からなる群より選ばれる1種または2種以上が使用される。更に、リン酸成分、カリウム成分、マグネシウム成分を培地に添加してもよく、これらとしては、過リン酸石灰、リン安、塩化カリウム、水酸化カリウム、硫酸マグネシウム、塩酸マグネシウム等の通常の工業用原料でよい。その他、亜鉛、銅、マンガン、鉄イオン等の無機塩を使用してもよい。その他、ビタミン、核酸関連物質等を添加しても良い。

[0015] 培養形式としては、回分培養、流加培養または連続培養のいずれでもよいが、工業的には流加培養または連続培養が採用される。

[0016] 対数増殖期の培養条件又はpH調整前の培養条件は、一般的な酵母の培養条件に従えばよく、例えば温度は20～40℃、好ましくは25～35℃がよく、pHは3.5～7.5、特に4.0～6.0が望ましい。また、好気的条件であることが好ましい。

また、通気・攪拌を行いながら培養することが好ましい。通気の量と攪拌の条件は、培養の容量と時間、菌の初発濃度を考慮して、適宜決定することができる。例えば、通気は0.2～2 V. V. M. (Volume per volume per minutes)程度、攪拌は50～800 rpm程度で

行なうことができる。

- [0017] 増殖の定常期にある酵母を液体培地のpHが7.5以上11未満である条件下で、液体培養する方法は、特に限定されるものではない。pHを調整する方法の例としては、培養した酵母が定常期に入ったときに、液体培地のpHを7.5以上11未満に調整する方法、液体培地にアルカリ物質を添加してpHを調整する方法、及び、培地中に予め尿素などを加えておいて、培養時間を経るに連れて自然にpHが7.5以上11未満になるようにして、液体培地をアルカリシフトする方法を挙げることができる。

培地に添加するアルカリ物質の量は、pHが上記範囲になる限り限定されるものではないが、培地を希釈しすぎず、その後の培養におけるグルタミン酸産生に悪影響を与えない観点から、培地に対して5%以下とすることが望ましい。例えば尿素の場合の量としては、特に限定されるものではなく、培養する酵母の菌体濃度にもよるが、培地に対して0.5～5%程度が好ましい。

- [0018] 培養した酵母が定常期に入ったときに、液体培地のpHを7.5以上11未満に調整する方法は、特に限定されるものではなく、例えばアルカリ物質を適宜添加し、液体培地のpHを7.5以上11未満、好ましくは7.5以上10以下に調整すればよい。

pH調整は、定常期であればいつ行なってもよいが、定常期に入った直後に行なうことが好ましい。酵母内の遊離グルタミン酸濃度を十分に高めることが可能である上に、全工程終了時までには要する時間を短縮することができるためである。対数増殖期にある酵母の液体培地のpHを7.5以上11未満にすると、酵母の増殖が抑制され、酵母の遊離グルタミン酸含有量が増加しないため好ましくない。

また、培養中の酵母が対数増殖期から定常期に移行する際、対数増殖の状態から徐々に定常状態に移行し、その後、完全に定常状態に入るが、対数増殖期から完全に定常状態に至る間の徐々に完全な定常状態に向かう時期も本発明の定常期に含まれる。

[0019] アルカリ物質としては、特に限定されるものではなく、例えば以下の成分が挙げられる。

NH_4OH （アンモニア水）、アンモニアガス、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等の無機アルカリ、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ性塩基、尿素等の有機アルカリ等。

上記のうち、アンモニア水、アンモニアガス、尿素が好ましい。

[0020] 定常期にある酵母を、pHが7.5以上11未満の液体培地において培養する場合における温度、その他の条件は、一般的な酵母の培養条件に従えばよく、例えば温度は20～40℃、好ましくは25～35℃である。培養時間は、pH調整後直後～24時間が好ましく、1～15時間がより好ましく、3～12時間がさらに好ましく、3～6時間が特に好ましい。

[0021] なお、pHが7.5以上11未満にシフトした後の酵母内の遊離グルタミン酸含有量は、培養時間の経過とともに増大し、ピークに達した後、減少する傾向がある。また、これは培養する酵母の菌体濃度やpH、温度等の条件に依存する。これは、アルカリ条件下で過度に長時間培養すると、酵母へのアルカリの影響が大きくなりすぎるためと推察される。よって、本発明においては、培養条件ごと、特にアルカリシフト後のpHごとに最適な培養時間を適宜選択することができるが、pHシフト後に、培養酵母の一部を回収し、酵母内の遊離グルタミン酸含有量の測定を断続的に、好ましくは、一定時間毎に行う。

[0022] つまり、ピーク時に培養を終了し酵母を回収することにより、遊離グルタミン酸含有量が、乾燥酵母菌体重量当たり2.3重量%～10.0重量%という、遊離グルタミン酸含有量が非常に高い酵母を得ることができることが確認されている。より好ましい条件下で培養、製造した場合には、乾燥酵母菌体重量当たり、4.0重量%～10.0重量%の範囲で、遊離グルタミン酸を含有する酵母を得ることができる。また、ピーク時の酵母を用いて酵母エキスを調製することにより、遊離グルタミン酸含有量が乾燥重量当たり20重量%～30重量%と、従来にはない程、非常に高いグルタミン酸高含有

酵母エキスを得ることができることが確認されている。

[0023] このように、本発明の製造方法により、遊離グルタミン酸含有量の高い酵母を培養することができ、適宜、これを回収することで、遊離グルタミン酸含有量の非常に高い酵母を製造することができる。従って、得られた酵母から遊離グルタミン酸含有量の高い酵母エキスを調製することができる。なお、本発明の酵母及び酵母エキス等が、遊離グルタミン酸のみならず、総グルタミン酸含有量も高いことは言うまでもない。

[0024] 例えば、特許文献 1 等には、グルタミン酸ナトリウム（分子量約 169）換算で 20 重量%の酵母エキスが記載されているが、これは、グルタミン酸（分子量約 147）含有量としては、17 重量%程度に過ぎない。この点からも、本発明の製造方法により得られる酵母が、従来になくグルタミン酸含有量の高い酵母であることが明らかである。

[0025] 本発明において、「乾燥酵母菌体当たりの遊離グルタミン酸含有量」とは、酵母菌体を乾燥させて得られる固形分中に含まれる遊離グルタミン酸の割合（重量%）を意味する。また、「酵母エキスの乾燥重量当たりの遊離グルタミン酸含有量」とは、酵母エキスを乾燥させて得られる固形分中に含まれる遊離グルタミン酸の割合（重量%）を意味する。

[0026] 酵母菌体中、又は酵母エキス中の遊離グルタミン酸含有量の測定方法は、例えば、王子計測機器社製 BF-5 のバイオセンサーを用いればよい。この装置は、グルタミン酸に特異的に反応する酵素電極を用いて溶液中のグルタミン酸を定量する装置であって、本酵素電極はタンパク質やペプチド中のグルタミン酸とは反応しない。よって、このような装置を用いることにより、遊離のグルタミン酸のみを選択的に定量することが可能である。

なお、遊離グルタミン酸含有量は、日本電子社製アミノ酸自動分析装置 JLC-500/V 型や、（米国）ウォータース社製 *Acquity* UPLC 装置などを用いて測定することも可能であるが、特に限定されるものではない。

[0027] 本発明の方法により、グルタミン酸、特に遊離グルタミン酸を菌体内に豊

富に含有する酵母を製造することができる。このようにして得られた本発明のグルタミン酸高含有酵母は、遊離グルタミン酸を、乾燥酵母菌体中に2.3重量%以上、好ましくは2.3～7.4重量%、より好ましくは4.0～7.4重量%含むことができる。

このため、該酵母から酵母エキスを抽出し製造することにより、良好な呈味成分である遊離グルタミン酸を豊富に含む酵母エキスを簡便に得ることができる。

[0028] 本発明の方法により製造されたグルタミン酸高含有酵母は、遊離アミノ酸含有量が高く、かつ、遊離グルタミン酸含有量が高い。例えば、本発明のグルタミン酸高含有酵母を用いて調製することにより、酵母菌体由来の遊離グルタミン酸を、酵母エキス中に乾燥重量当たり7重量%以上、好ましくは7～30重量%、より好ましくは12～30重量%、更に好ましくは20～30重量%含む酵母エキスを得ることができる。

このため、本発明によって得られる酵母エキスは非常に呈味性が高く、飲食品等に用いることで、味に深みがあり、コクのある飲食品が製造できる。

[0029] また、本発明は液体培地のアルカリシフトのみの簡単な工程でグルタミン酸高含有酵母を製造することが可能である。また、前述したように、培地は特に特殊なものを使用する必要はなく、アンモニア等、安価な原材料で製造することが可能である。

[0030] 本発明の方法により、高濃度のグルタミン酸を酵母菌体内に含有するグルタミン酸高含有酵母が得られるが、グルタミン酸高含有酵母からグルタミン酸を含有する分画物を得てもよい。

グルタミン酸高含有酵母からグルタミン酸を含有する分画物を分画する方法としては、通常行われている方法であればいずれの方法でもよい。

[0031] また、上記方法により培養したグルタミン酸高含有酵母からグルタミン酸高含有酵母エキスを製造することができる。グルタミン酸高含有酵母エキスを製造する方法としては、通常行われている方法であればいずれの方法であってもよく、例えば、自己消化法、酵素分解法、酸分解法、アルカリ抽出法

、熱水抽出法などが採用される。なお、一般的に、熱水抽出法のみによって得られる酵母エキス中のグルタミン酸は、自己消化法等の酵素反応法によって得られる酵母エキスとは異なり、ほぼ全量が遊離グルタミン酸であると考えられる。

[0032] 本発明のグルタミン酸高含有酵母は遊離グルタミン酸が多く、このため、単に熱水処理によってのみから酵母エキスを抽出しても、呈味が良好な酵母エキスができる。

従来、遊離グルタミン酸等の呈味性アミノ酸の含有量を高めるために、植物性又は動物性のタンパク質を用いて、酸やアルカリ等を用いた加水分解処理が行われることが一般的であった。しかしながら、タンパク質の加水分解処理物は、発ガン性の疑いのあるMCP（クロロプロパノール類）を含む、という問題がある。

これに対して、本発明の方法により製造された高グルタミン酸含有酵母は、そもそも遊離グルタミン酸含有量が高いため、該酵母を熱水抽出方法等により抽出した後、酸やアルカリ等による分解処理や酵素処理を行わずとも、遊離グルタミン酸含有量が十分に高い酵母エキスを調製することができる。すなわち、本発明の高グルタミン酸含有酵母を用いることにより、呈味性と安全性の両方に優れた酵母エキスを、簡便に製造することができる。

[0033] 更に、本発明のグルタミン酸高含有酵母エキスを粉末状にすることで、グルタミン酸高含有酵母エキス粉末が得られ、酵母菌を適宜選択することにより、遊離グルタミン酸を7～30重量%含む酵母エキス粉末が得られる。

[0034] また、上記方法により培養したグルタミン酸高含有酵母から乾燥酵母菌体を調製してもよい。乾燥酵母菌体を調製する方法としては、通常行われている方法であればいずれの方法であってもよいが、工業的には、凍結乾燥法、スプレードライ法、ドラムドライ法などが採用される。

[0035] また、本発明のグルタミン酸高含有酵母、該酵母の乾燥酵母菌体、該酵母から調製される酵母エキス、及び該酵母エキス粉末は、調味料組成物としてもよい。なお、該調味料組成物は、本発明の酵母エキス等のみからなるもの

であってもよく、本発明の酵母エキス等の他に、安定化剤、保存剤等の他の成分を含有していてもよい。該調味料組成物は、他の調味料組成物と同様に、様々な飲食品に適宜用いることができる。

[0036] さらに本発明は、上記の方法により得られたグルタミン酸高含有酵母、該グルタミン酸高含有酵母から抽出されたグルタミン酸高含有酵母エキスを含有する飲食品に関するものである。本発明のグルタミン酸高含有酵母等を含有させることにより、グルタミン酸を高濃度に含む飲食品を効率的に製造することができる。

[0037] これらの飲食品としては、通常乾燥酵母、酵母エキス、及びこれらを含む調味料組成物を添加しうる飲食品であれば何れでもよいが、例えばアルコール飲料、清涼飲料、発酵食品、調味料、スープ類、パン類、菓子類等を挙げることができる。

[0038] 本発明の飲食品を製造するには、飲食品の製造工程において、上記グルタミン酸高含有酵母から得られる調製物、グルタミン酸高含有酵母の分画物を添加してもよい。その他、原料としてグルタミン酸高含有酵母をそのまま用いてもよい。

実施例 1

[0039] 次に、実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0040] 以下の＜1＞～＜8＞に示す方法により、酵母（*Saccharomyces cerevisiae* AB9846株）を培養し、酵母培養液からエキス抽出およびグルタミン酸分析を行なった。

[0041] ＜1＞ 前培養

以下の組成からなる培地を、容量350mL（2Lバッフル付き三角フラスコ）で2本作製した。

（培地組成）

糖蜜	8%
尿素	0.6%

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.16% (硫酸アンモニウム) $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
0.08% (リン酸水素2アンモニウム)

[0042] (作製方法)

(1) 糖蜜 (糖度36%) 167mLをミリQ水にて750mLにメスアップ後、2Lバッフル付き三角フラスコに350mLずつ分注した。

(2) オートクレーブ処理 (121°C、15min) を行なった。

(3) 使用時に糖蜜のみの培地に無菌的に窒素成分混液 (×100) を1/50量添加 (各7mL) した。

[0043] (培養条件)

培養温度 30°C
振とう 160rpm (ロータリー)
培養時間 24h
(植菌量 300mL)

[0044] <2> 本培養

以下の組成からなる培地を、容量2000mL (流加終了時3Lの設定) 作製した。

(培地組成)

塩化アンモニウム 0.18% (流加終了時3L換算) 5.3g
 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.04% (リン酸水素2アンモニウム、流加終了換算)
1.2g

[0045] 続いて、以下の条件で培養を行なった。

(培養条件)

培養温度 30°C
通気 3L/min
攪拌 600rpm
pH制御 下限制御pH5.0 (10%アンモニア水にて)、上限制御なし
消泡剤 アデカネート原液

流加培地 糖蜜（糖度 36%）、容量 800 mL（1 L メジウム瓶にて、最終 8%）

[0046] <3> pHシフト

次に、培養した酵母が定常期に入った直後に、 NH_4OH 水（10%）にて培養液の pH をアルカリ性域にシフト（以下、pHシフトという。）させて（設定 pH 7～11）、更に酵母を培養した。本培養開始後 48 時間で終了した。

[0047] <4> 集菌方法

（1）酵母を本培養した培養液を 50 mL プラスチック遠心チューブ（ファルコン 2070）へ移し、遠心分離（3,000 g、20°C、5 min、HP—26）を行なった。

（2）上清を捨て、ペレットをミリQ水 20 mL に懸濁し、遠心分離（3,000 g、20°C、5 min、HP—26）を行なった。これを 2 回繰り返した。

（3）上清を捨て、ペレットをミリQ水 20 mL に懸濁した。

[0048] <5> 酵母乾燥菌体重量の測定

あらかじめ秤量しておいたアルミ皿（直径 5 cm）に、酵母懸濁液 2 mL とり、105°C にて 4 時間乾燥させた。

乾燥後の重量（酵母乾燥後重量）を測定し、以下の式（1）により固形分の重量（乾燥酵母菌体重量、単位 g/L）を算出した。

$$\text{酵母乾燥後重量} - \text{アルミ皿重量} = \text{乾燥酵母菌体重量} \quad \cdots (1)$$

[0049] <6> 熱水抽出法によるエキス溶液の調製

（1）残りの酵母懸濁液（約 18 mL）を遠心分離（3,000 g、20°C、5 min、HP—26）した。

（2）残りの懸濁液 1.5 mL をエッペンドルフチューブに移して、チューブをブロックヒーターに移し、80°C にて 30 分加熱した（エキス化）。または、温浴中 100°C にて 10 分間過熱してもよい（エキス化）。

（3）その後、遠心分離（6,000 g、4°C、5 min）にて上清液（エ

キス溶液)を分離した。

[0050] < 7 > 遊離グルタミン酸含有量の測定方法

エキス溶液 300 μ l 中の遊離グルタミン酸を、バイオセンサーを用いて定量した。バイオセンサーを用いた測定方法により、エキス溶液中の遊離のグルタミン酸のみを選択的に定量することができる。具体的には、測定は、該エキス溶液の希釈液（5倍希釈が適当）に対して王子計測機器BF—5を用いて行ない、検量線には1 mMおよび5 mM標準溶液を用いた。

pH 7.00、7.50、8.00、9.00、11.00にシフトさせた結果を表1に示す。また、pH 8.00～9.00において、pHを0.25ずつ変化させた結果を表2に、pH 9.00～10.00において、pHを0.25ずつ変化させた結果を表3に示す。表2に示した菌数データ及び乾燥酵母菌体重量データからも明らかであるように、増殖が定常期に入った後にpHシフトした。

[0051] [表1]

設定pH		乾燥酵母菌体重量 (g/L)	グルタミン酸含有量 (乾燥酵母菌体中の重量%)
	植菌直後	1.3	1.6
7.0	pHシフト前	34.5	2.8
	pHシフト後6時間後	36.6	2.6
7.5	pHシフト前	35.8	2.4
	pHシフト後6時間後	35.2	2.7
8.0	pHシフト前	34.4	2.4
	pHシフト後6時間後	33.0	2.8
9.0	pHシフト前	38.3	2.2
	pHシフト後6時間後	36.7	5.3
11.0	pHシフト前	37.4	2.2
	pHシフト後6時間後	17.7	0.0

[0052]

[表2]

設定pH		菌数 (x10 ⁶ cells/ml)	乾燥酵母菌体重量 (g/L)	グルタミン酸含有量 (乾燥酵母菌体中の重量%)
8.00	植菌直後	76	1.3	2.5
	pHシフト前	2,160	29.5	1.7
	pHシフト後3時間後	2,420	29.4	2.5
8.25	植菌直後	79	1.0	2.3
	pHシフト前	1,980	30.9	2.3
	pHシフト後3時間後	2,140	30.3	3.4
8.50	植菌直後	80	0.6	2.0
	pHシフト前	2,460	30.2	2.0
	pHシフト後3時間後	2,220	30.2	3.6
8.75	植菌直後	88	1.0	3.1
	pHシフト前	2,180	32.2	1.9
	pHシフト後3時間後	2,740	32.4	4.1
9.00	植菌直後	70	1.2	2.4
	pHシフト前	2,500	32.3	1.8
	pHシフト後3時間後	2,360	30.7	4.0

[0053]

[表3]

設定pH		乾燥酵母菌体重量 (g/L)	グルタミン酸含有量 (乾燥酵母菌体中の重量%)
9.00	植菌直後	1.2	1.3
	pHシフト前	36.7	2.3
	pHシフト後6時間後	35.1	5.7
9.25	植菌直後	1.0	1.8
	pHシフト前	35.0	2.2
	pHシフト後6時間後	32.4	5.1
9.50	植菌直後	1.1	1.3
	pHシフト前	35.4	2.9
	pHシフト後6時間後	34.2	3.7
9.75	植菌直後	1.3	1.3
	pHシフト前	36.8	1.9
	pHシフト後6時間後	31.7	2.6
10.00	植菌直後	1.1	1.2
	pHシフト前	37.6	2.0
	pHシフト後6時間後	33.1	2.3

[0054] 表1に示したように、乾燥酵母菌体中の遊離グルタミン酸含有量（重量％）は、pHシフト前とpHシフト後6時間後では、設定がpH7.5以上11.0未満において増加することが確認された。特に、設定pH9.0では、pHシフトにより2.2重量％から5.3重量％と2倍以上に増加し、顕著な遊離グルタミン酸含有量増加効果が確認された。

特に、設定pH（pHシフト後のpH）が8.00～9.00においては、表2に示したように、設定pHが高いほど、pHシフトによる乾燥酵母菌体中の遊離グルタミン酸含有量（重量％）の増加量が大きいことが確認された。

一方、表3に示したように、設定pH9.00～10.00においては、pHシフトによる乾燥酵母菌体中の遊離グルタミン酸含有量（重量％）の増加は、設定pHが低いほど、顕著であることが確認された。特に、設定pH9.00では、pHシフトによりグルタミン酸含有量が2.3重量％から5.7重量％に増加した。また、表には示していないが、設定pH9.00に

において、pHシフト後3時間後では、乾燥酵母菌体中の遊離グルタミン酸含有量が4.6重量%であった。

[0055] また、これらの酵母のうち、設定pHが7.5以上11.0未満のpHシフト後の酵母を用いて調製された酵母エキスでは、pHシフト前の酵母を用いて調製された酵母エキスと比較して、乾燥重量当たりのグルタミン酸含有量（重量%）が増大しており、本発明の製造方法により製造された酵母を用いて酵母エキスを調製することにより、グルタミン酸含有量が高い酵母エキスが得られることが確認された。例えば、表1に記載の設定pHが9.00の酵母においては、pHシフト前の酵母から調製された酵母エキスでは、乾燥重量当たりのグルタミン酸含有量が、pHシフト後6時間培養した酵母から調製された酵母エキスでは22.4重量%であった。また、同じく設定pHが9.00の酵母（表3参照）においては、乾燥重量当たりのグルタミン酸含有量が、pHシフト後3時間培養した酵母から調製された酵母エキスでは19.4重量%、pHシフト後6時間培養した酵母から調製された酵母エキスでは25.5重量%であった。さらに、設定pHが9.25の酵母（表3参照）においても、乾燥重量当たりのグルタミン酸含有量が、pHシフト後6時間培養した酵母から調製された酵母エキスでは21.3重量%であった。

以上の結果から、定常期後に7.5以上11未満にpH調整してさらに培養を行なうことによって、酵母中のグルタミン酸が増加することが示された。特に、pH調整後3～6時間におけるグルタミン酸含有量が高かった。

実施例 2

[0056] 実施例1の<1>と同様に前培養を行い、その後、以下の条件で本培養を行なった。

定常期後にpHシフトするのではなく、予め本培養の培地に尿素を加えておき、自然にpHがシフトする条件で、グルタミン酸高含有酵母を得た。

[0057] まず、以下の組成からなる培地を、容量2000mL（流加終了時3Lの設定）作製した。

(培地組成)

塩化アンモニウム 0.18% (流加終了時 3 L 換算) 5.3 g

(NH_4)₂HP O_4 0.04% (リン酸水素 2 アンモニウム、流加終了換算)
1.2 g

尿素 1% (流加終了時 3 L 換算) 30 g

[0058] その他の条件は実施例 1 と同様に行なった。図 1 は、培養時間に対する菌数の増加曲線を示す。図 2 は、培養時間に対する乾燥酵母菌体重量の増加曲線を示す。図 3 は、培養時間に対する培養液の pH の変化を示す。

図 1 に示すように、菌数 ($\times 10^6 \text{ cells/ml}$) の増加は、培養 18 時間後には定常状態に達し、増殖の定常期に入ったことが確認された。また、乾燥酵母菌体重量 (g/L) も培養後 24 時間後にはほぼ定常状態になっており、増殖の定常期であることが確認された。培養液の pH を測定したところ、図 3 に示すように、増殖の定常期に入った後に、pH がアルカリ (7.5 以上 11 未満) にシフトした。結果を表 4 に示す。

[0059]

[表4]

経過時間	pH	菌数 ($\times 10^6$ cells/ml)	乾燥酵母菌体重量 (g/L)	グルタミン酸含有量 (乾燥酵母菌体中の重量%)
0	5.3	69	1.3	1.7
3	5.4	56	1.3	2.0
6	5.4	83	2.1	2.6
9	5.3	118	3.2	2.5
12	5.2	310	6.4	2.8
15	5.1	600	12.0	2.9
18	5.1	1,750	19.3	3.1
21	5.1	1,540	28.8	2.7
24	5.9	1,840	32.7	2.6
27	7.9	1,700	36.9	3.8
30	8.4	1,510	35.1	5.8
33	8.6	1,660	34.3	6.0
36	8.6	1,830	33.5	6.5
39	8.6	1,870	34.3	6.7
42	8.6	2,080	33.7	7.2
45	8.7	1,940	34.5	7.3
48	8.7	1,470	32.4	7.4

[0060] 表4に示すように、乾燥酵母菌体重量当たりのグルタミン酸含有量は、pH上昇前は2.6重量%であったのに比べ、pH上昇時は7.4重量%になり、2.8倍に増加した。

実施例 3

[0061] 前培養、本培養の条件を下記の条件とした他は実施例1と同様にして酵母

培養液からエキス抽出およびグルタミン酸分析を行った。

[0062] (培地組成)

前培養液 150 ml

実施例1の前培養と同様の方法で得られた前培養液から上澄みを取り除き、酵母濃度を15～20%に濃縮したものを前培養液として用いた。

水 2000 ml

H₂SO₄ (97%) 1.33 ml

糖蜜 (糖度36%) 6.7 ml

(NH₄)₂HPO₄ 0.06%

[0063] (培養条件)

培養温度 32℃

pH 0～15.5時間：無調整

攪拌 600 rpm

続いて、以下の条件で培養を行った。

15.5時間以降：アンモニア水でpHシフト

攪拌 600 rpm

流加培地 糖蜜 (糖度36%) 870 ml

NH₄OH (10%) 100～200 ml

リン酸 (85%) 5～20 (g)

酵母を培養して15.5時間後にNH₄OH水にてpHシフトを行い、更に培養を続けた。得られた結果を表5に示す。

[0064] [表5]

設定pH		乾燥酵母菌体重量 (g/L)	グルタミン酸含有量 (乾燥酵母菌体中の重量%)
9.0	植菌直後	15.2	2.3
	pHシフト前	65.3	3.0
	pHシフト後6時間後	63.3	9.0

[0065] 表5に示したように、乾燥酵母菌体中の遊離グルタミン酸含有量（重量％）は、pHシフト前とpHシフト後6時間後では、設定がpH9.0の場合において増加することが確認された。グルタミン酸含有量9.0重量％は酵母エキス中のグルタミン酸含有量に換算すると約25％となる。

実施例1と比較すると培地の組成が異なっており、いずれの培地組成であってもpH依存的にグルタミン酸の含有量を増加させることが可能になることが確認された。

実施例 4

[0066] 続いて、菌株に酵母（*Candida utilis* JCM1462株）を用い、実施例1と同様の方法で培養し、酵母培養液からエキス抽出およびグルタミン酸分析を行なった。結果を表6に示す。

[0067] [表6]

設定pH		乾燥酵母菌体重量 (g/L)	グルタミン酸含有量 (乾燥酵母菌体中の重量%)
9.0	植菌直後	3.8	1.7
	pHシフト前	44.6	2.2
	pHシフト後	46.1	2.6

[0068] 以上の結果から、酵母（*Candida utilis* JCM1462株）においても、定常期後にpHシフトを行なうことによって、酵母中のグルタミン酸含有量が有意に増加することが示された。

実施例 5

[0069] 次に、pHシフト後の培養時間を3時間とした以外は実施例1と同様にして調製した酵母（設定pH9.0）から調製された酵母エキスの、乾燥重量当たりの遊離グルタミン酸含有量および総遊離アミノ酸含有量を測定した。なお、遊離グルタミン酸等の遊離アミノ酸の測定は、ウォーターズ社製Acquity UPLC分析装置を用いて、アキュタグウルトラ（AccQ-Tag Ultra）ラベル化法により行った。測定結果を表7に示す。なお、表7中、「グルタミン酸含有量」は、酵母エキスの乾燥重量当たりの遊離グ

ルタミン酸含有量を意味し、「総アミノ酸含有量」は、酵母エキスの乾燥重量当たりの遊離アミノ酸の総含有量を意味する。

[0070] [表7]

	シフト前	シフト後3時間後
グルタミン酸含有量 (エキス中の重量%)	6.9	26
総アミノ酸含有量 (エキス中の重量%)	11.4	43

[0071] 表7に示すように、pHシフトの前後で遊離グルタミン酸含有量は6.9重量%から26重量%と約3.7倍に増大していた。一方、総遊離アミノ酸含有量は11.4重量%から43重量%に増大していた。

実施例 6

[0072] 続いて、実施例1と同様にして調製した酵母（pH9.0）から製造した酵母エキスと、市販の酵母エキス（比較例1～8）について、エキス乾燥重量当たりの遊離グルタミン酸含有量及び総遊離アミノ酸含有量を測定し、比較した。なお、遊離グルタミン酸等の遊離アミノ酸の測定は、実施例5と同様にして行った。測定の結果得られた、各酵母エキスの乾燥重量当たりの遊離グルタミン酸含有量（重量%）及び総遊離アミノ酸含有量（重量%）を表8に示す。なお、表8中、「グルタミン酸含有量」は、酵母エキスの乾燥重量当たりの遊離グルタミン酸含有量を意味し、「総アミノ酸含有量」は、酵母エキスの乾燥重量当たりの遊離アミノ酸の総含有量を意味する。

[0073]

[表8]

試料	実施例5	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5	比較例6	比較例7	比較例8
エキス中の含有量		A社製品	B社製品	C社製品	D社製品	E社製品	F社製品	G社製品	H社製品
グルタミン酸(重量%)	29.1	5.6	0.1	8.0	3.4	3.2	0.5	9.5	9.5
総アミノ酸(重量%)	60.2	8.6	5.6	11.1	8.8	9.9	3.6	21.0	17.0

[0074] 以上の結果から、本発明の酵母エキスの遊離グルタミン酸含有量は29.1重量%と非常に高いことが示された。このように、遊離グルタミン酸を約30重量%と非常に高濃度で含有している酵母エキスは、従来にはないもので

ある。この結果から、本発明の酵母エキ스가調味料として好適であることが示唆された。

実施例 7

[0075] 更に、実施例 1 と同様にして調整した酵母（pH 9.0）から製造した酵母エキスを粉末状にした酵母エキス粉末（*Saccharomyces cerevisiae* AB9846 株由来、グルタミン酸含有量 23 重量%）を用い、みそ汁とコンソメスープを作製した。みそ汁、コンソメスープに対する酵母エキスの配合量は 0.2% である。

比較例として、ミーストパウダー N（アサヒフードアンドヘルス株式会社製）（グルタミン酸含有量 4 重量%）を用い、同様にみそ汁とコンソメスープを作製し、以下の方法で官能評価を行なった。

[0076] （評価方法）

専門パネラー 10 名によるブラインド 2 点比較により、比較官能検査を実施した。2 対比較テストとして、t 検定を行なった。

[0077] （評価基準）

塩味（減塩効果）、旨味、コクの 3 項目について、基準のみそ汁または基準となるコンソメスープを 0 とし、以下のように 5 段階で評価した。

「強い」 = +2、

「やや強い」 = +1、

「どちらでもない」 = 0、

「やや弱い」 = -1、

「弱い」 = -2。

みそ汁の結果を表 9 に示し、コンソメスープの結果を表 10 に示す。

[0078]

[表9]

試料	項目	パネル										平均値	標準偏差
		パネラーA	パネラーB	パネラーC	パネラーD	パネラーE	パネラーF	パネラーG	パネラーH	パネラーI	パネラーJ		
実施例	塩味	-1	1	1	-1	-1	1	0	0	0	1	0.10	0.88
	うま味	0	0	1	2	-1	0	1	1	1	-1	0.40	0.97
	コク	0	2	0	1	0	0	1	2	1	1	0.80	0.79
ミースト パウダーN (比較例)	塩味	0	0	1	-2	0	-1	0	0	-1	0	-0.30	0.82
	うま味	1	0	0	1	-1	-1	1	0	-1	0	0.00	0.82
	コク	1	2	0	0	-1	0	0	0	0	0	0.20	0.79

対をなすデータのt検定
塩味 p= 0.11
うま味 p= 0.11
コク p= 0.03*

[表10]

試料	項目	パネル										平均値	標準偏差
		パネルA	パネルB	パネルC	パネルD	パネルE	パネルF	パネルG	パネルH	パネルI	パネルJ		
実施例	塩味	1	1	1	1	0	-1	1	0	0	1	0.50	0.71
	うま味	1	0	1	2	1	-1	2	2	0	1	0.90	0.99
	コク	1	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0.50	0.71
ミーストパウダーN (比較例)	塩味	0	-1	0	-1	1	1	0	0	1	-1	0.00	0.82
	うま味	1	-1	0	-1	0	1	1	0	0	-1	0.00	0.82
	コク	1	-1	1	1	1	1	0	0	1	-1	0.40	0.84

対をなすデータの検定

塩味	p=	0.15
うま味	p=	0.03*
コク	p=	0.38

[0080] 表9の結果から、みそ汁では、塩味と旨味の平均値で差があり、コクで有意

差があった。表 10 の結果から、コンソメスープでは、塩味とコクの平均値で差があり、旨味で有意差があった。これは、本発明の酵母エキ스가、従来よりもグルタミン酸含有量が有意に高いためと考えられる。

産業上の利用可能性

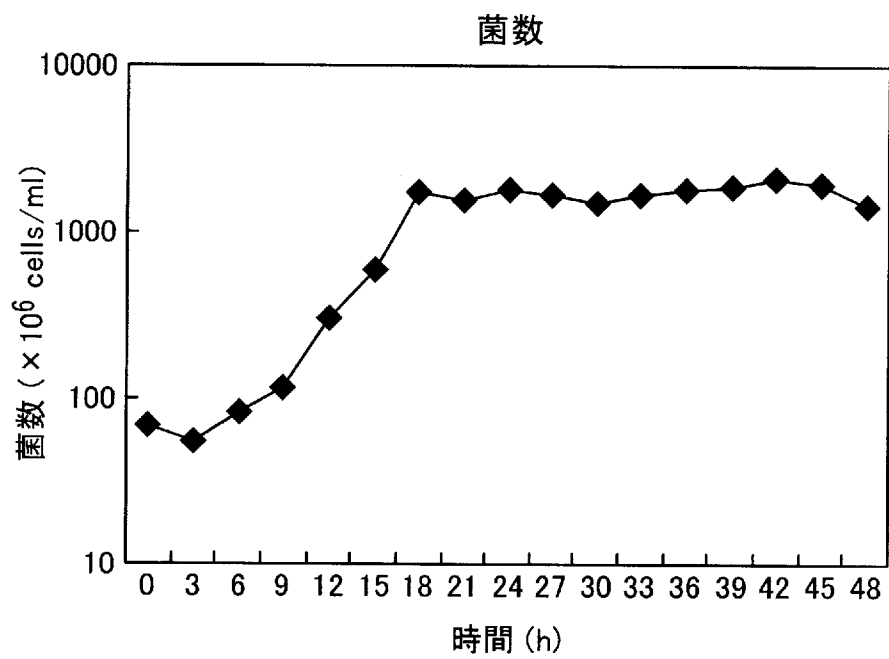
[0081] 本発明のグルタミン酸高含有酵母の製造方法により、菌体内にグルタミン酸を高濃度に保持させた酵母を得ることができるため、酵母エキスの製造等の食品分野において利用が可能である。

請求の範囲

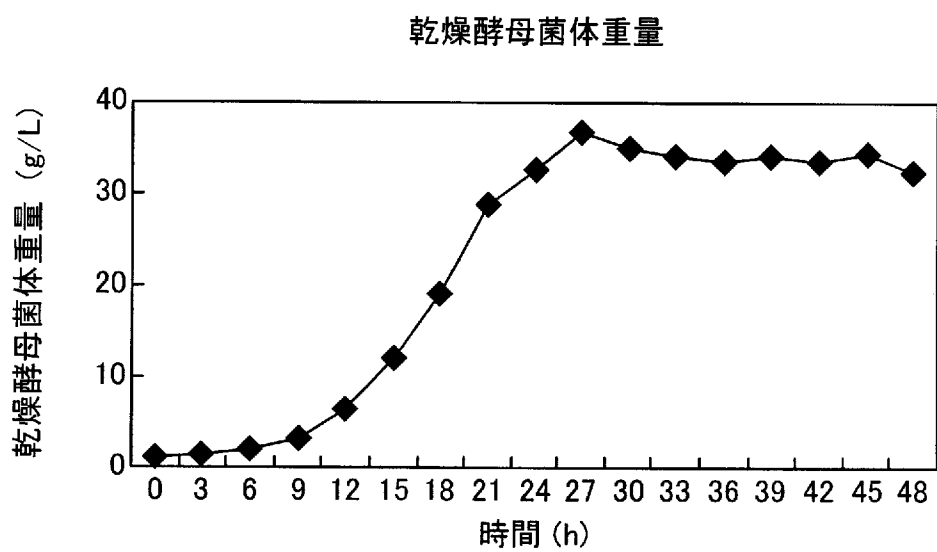
- [請求項1] 増殖の定常期にある酵母を、液体培地のpHが7.5以上11未満である条件下で液体培養する工程を含む、酵母の培養方法。
- [請求項2] 前記の液体培養する工程が、
酵母の増殖が定常期に入った後に液体培地のpHを7.5以上11未満に調整する工程；及び
当該酵母を当該pHの範囲内において更に培養する工程；
を含む、請求項1に記載の酵母の培養方法。
- [請求項3] 前記の液体培地のpHを7.5以上11未満に調整する工程が、
前記液体培地にアルカリ物質を添加する工程である、請求項2に記載の培養方法。
- [請求項4] 前記の液体培養する工程において、培養酵母の一部を回収し、当該酵母内の遊離グルタミン酸含有量の測定を断続的に行う、請求項1に記載の培養方法。
- [請求項5] 前記酵母がサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、又はキャンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) である請求項1～4の何れか一項に記載の、酵母の培養方法。
- [請求項6] 前記請求項1～5の何れか一項に記載の培養方法で培養した酵母を回収する工程を含む、酵母の製造方法。
- [請求項7] 請求項1～5の何れか一項に記載の酵母の培養方法によって得られた、又は請求項6に記載の製造方法によって得られた酵母。
- [請求項8] 遊離グルタミン酸含有量が、乾燥酵母菌体当たり2.3～10.0重量%である、請求項7に記載の酵母。
- [請求項9] 前記遊離グルタミン酸含有量が、乾燥酵母菌体当たり、4.0～10.0重量%である、請求項8に記載の酵母。
- [請求項10] 請求項7～9の何れか一項に記載の酵母から抽出された酵母エキス。

- [請求項11] 前記酵母エキス中の遊離グルタミン酸含有量が、乾燥重量当たり7～30重量%である、請求項10に記載の酵母エキス。
- [請求項12] 前記酵母エキス中の遊離グルタミン酸含有量が、乾燥重量当たり20～30重量%である、請求項11に記載の酵母エキス。
- [請求項13] 遊離グルタミン酸含有量が、乾燥重量当たり20～30重量%である、酵母エキス。
- [請求項14] 遊離グルタミン酸含有量が、乾燥酵母菌体当たり4.0～10.0重量%である、酵母。
- [請求項15] 請求項10～13の何れか一項に記載の酵母エキスを含有する、調味料組成物。
- [請求項16] 請求項7～9、又は14の何れか一項に記載の酵母、請求項10～13の何れか一項に記載の酵母エキス、又は請求項15に記載の調味料組成物を含有する、飲食品。

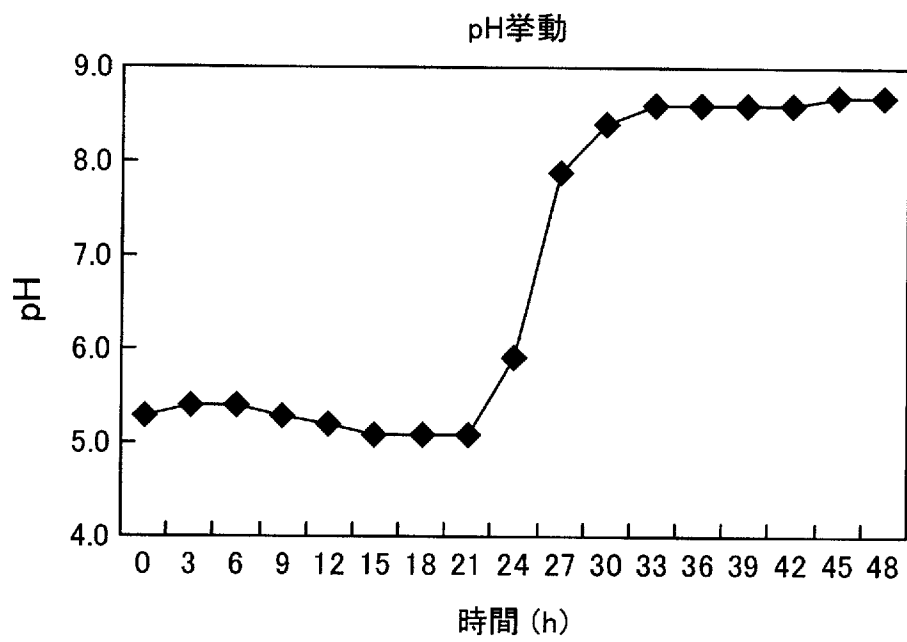
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/16(2006.01) i, A23L1/221(2006.01) i, A23L1/28(2006.01) i, A23L1/39(2006.01) i

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)

C12N1/16, A23L1/221, A23L1/28, A23L1/39

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), Science Direct, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 09-047295 A (The Green Cross Corp.), 18 February, 1997 (18.02.97), Full text (Family: none)	1, 3, 6/2, 4-5, 7-16
X/A	JP 09-276843 A (Canon Inc.), 28 October, 1997 (28.10.97), Full text (Family: none)	1, 3, 5/2, 4, 6-16
X/A	WO 1998/035049 A1 (Oriental Yeast Co., Ltd.), 13 August, 1998 (13.08.98), Full text & EP 974665 A1 & US 6387683 B1	1, 5-6/2-4, 7-16



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 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
05 June, 2009 (05.06.09)

Date of mailing of the international search report
16 June, 2009 (16.06.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059206

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 09-313169 A (Ajinomoto Co., Inc.), 09 December, 1997 (09.12.97), Full text (Family: none)	1, 3, 5-16/2, 4
X/A	JP 2002-171961 A (Japan Tobacco Inc.), 18 June, 2002 (18.06.02), Full text (Family: none)	7-16/1-6
X/A	JP 09-294581 A (Ajinomoto Co., Inc.), 18 November, 1997 (18.11.97), Full text & EP 805202 A1	7-16/1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/059206

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.:
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:

The "special technical feature" of the inventions of claims 1-12 relates to "a method for culturing a yeast, which involves the step of carrying out the liquid culture of the yeast that is in an ordinary stationary phase under conditions in which a liquid culture medium has a pH value of not less than 7.5 and less than 11". The "special technical feature" of the inventions of claims 13 and 14, on the other hand, relates to "a yeast extract having a free glutamic acid content of 20 to 30 wt% per dry weight of the yeast extract" or "a yeast having a free glutamic acid content of 4.0 to 10.0 wt% per dry weight of the yeast cells". There is no technical relation involving one

(continued to 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.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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/JP2009/059206

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

or more of the same or corresponding special technical features between these groups of inventions. Therefore, these groups of inventions cannot be regarded as being so linked to each other as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N1/16(2006.01)i, A23L1/221(2006.01)i, A23L1/28(2006.01)i, A23L1/39(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N1/16, A23L1/221, A23L1/28, A23L1/39			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), Science Direct, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求項の番号
X/A	JP 09-047295 A（株式会社ミドリ十字）1997.02.18, 全文 （ファミリーなし）		1, 3, 6/2, 4-5, 7-16
X/A	JP 09-276843 A（キヤノン株式会社）1997.10.28, 全文 （ファミリーなし）		1, 3, 5/2, 4, 6- 16
X/A	WO 1998/035049 A1（オリエンタル酵母株式会社）1998.08.13, 全文 & EP 974665 A1 & US 6387683 B1		1, 5-6/2-4, 7- 16
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 0 5 . 0 6 . 2 0 0 9		国際調査報告の発送日 1 6 . 0 6 . 2 0 0 9	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 左海 匡子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 3 0 3 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/A	JP 09-313169 A (味の素株式会社) 1997. 12. 09, 全文 (ファミリーなし)	1, 3, 5-16/2, 4
X/A	JP 2002-171961 A (日本たばこ産業株式会社) 2002. 06. 18, 全文 (ファミリーなし)	7-16/1-6
X/A	JP 09-294581 A (味の素株式会社) 1997. 11. 18, 全文 & EP 805202 A1	7-16/1-6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求項1－12に係る発明の「特別な技術的特徴」は「通常の定常期にある酵母を、液体培地のpHが7.5以上11未満である条件下で液体培養する工程を含む、酵母の培養方法」であるのに対し、請求項13、14に係る発明の「特別な技術的特徴」は「遊離グルタミン酸含有量が、乾燥重量当たり20～30重量%である、酵母エキス」、あるいは「遊離グルタミン酸含有量が、乾燥酵母菌体当たり4.0～10.0重量%である、酵母」に関するものである。これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にならないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。