



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0400697-6 B1



(22) Data de Depósito: 04/03/2004

(45) Data da Concessão: 28/07/2015
(RPI 2325)

(54) Título: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM MATERIAL ALIMENTÍCIO CONTENDO UMA ALTA QUANTIDADE DE CISTEÍNA

(51) Int.Cl.: A23L1/305; A23L2/385

(30) Prioridade Unionista: 10/03/2003 JP 2003-062660

(73) Titular(es): Ajinomoto CO. INC.

(72) Inventor(es): Hiroaki Nishiuchi, Yasushi Nishimura, Yuki Nishimori

“MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM MATERIAL ALIMENTÍCIO CONTENDO UMA ALTA QUANTIDADE DE CISTEÍNA”

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção diz respeito a um método para a
fabricação de um material alimentício contendo alta quantidade de cisteína,
caracterizado em que um extrato de levedura é preparado a partir células de
levedura contendo γ -glutamilcisteína, o extrato é concentrado mediante o
controle da temperatura tão baixa quanto, mas não mais do que 60°C, para
10 preparar um material alimentício em uma forma líquida em que a
concentração de sólidos não seja menor do que 10% e o material alimentício
resultante seja mantido em 70 a 130°C.

TÉCNICA ANTERIOR

15 Documento de Patente 1: Publicação Internacional WO 00/
30474

Documento de Patente 2: Patente Japonesa nº 2830415

Documento de Patente 3: Patente Japonesa nº 2903659

20 Documento de Patente 4: Publicação Internacional WO
01/90310

25 A cisteína e a cistina, que é um dissulfeto de um tipo de óxido
da cisteína, são usadas para os fins de melhorar o sabor do alimento. Na JP-A-
10-136883, existe uma divulgação de um método em que o alimento é imerso
em um eletrólito contendo cisteína e cistina para suprimir a mudança de cor
do alimento para marrom. De acordo com a invenção, existe uma divulgação
de que a cistina é reduzida em cisteína em um eletrodo de redução, e a
produção de corante marrom através da produção de quinina por uma
oxidação enzimática é eliminada pela cisteína. Assim sendo, de modo a
suprimir a descoloração do alimento, tal como com o uso da cistina, uma
operação inconveniente de produção de cisteína mediante redução é

necessária. Na Patente Japonesa nº 3246064, existe uma divulgação de uma técnica em que a cisteína é utilizada para a produção de peixe seco. De acordo com aquela invenção, existe uma descrição de que, no peixe seco que é produzido pela adição de um composto contendo enxofre, o sabor é intensificado e a deterioração do sabor é eliminada, e que o efeito por peso é mais elevado na cisteína do que na cistina. Na Publicação Internacional WO 93/08274, existe uma divulgação no estado da técnica, em que um resíduo de cisteína preparado pela redução do resíduo de cistina de um tipo oxidado contido na proteína animal e vegetal é usado para melhora da massa para pão. Como tal, a cisteína tem ampla faixa de utilização e alto efeito no uso em comparação com a cistina que é um tipo oxidado da mesma.

Com relação a um método para a fabricação de cisteína tendo tal utilização ampla, um método por decomposição da proteína, um método semissintético, etc. foram conhecidos, e os métodos que são principalmente usados no presente são um método por decomposição da proteína e um método semissintético. Entretanto, no caso do uso de cisteína para o objeto acima mencionado, houve uma forte demanda por um material alimentício que a contenha em uma quantidade elevada, mas não é conhecido até agora quase nenhum material alimentício que contenha alta quantidade de cisteína.

Recentemente, tornou-se claro, de acordo com a Publicação Internacional WO 00/30474 (Documento de Patente 1), que, quando um material alimentício contendo γ -glutamilcisteína (daqui em diante podendo ser abreviada como γ -GC) é submetido a um tratamento enzimático ou a um tratamento de aquecimento sob uma condição específica, é produzido um material alimentício contendo altas quantidades de cisteína e de cistina que é um dissulfeto de um tipo de óxido da cisteína. Entretanto, no Documento de Patente 1, embora a produtividade total da cisteína (daqui em diante podendo ser referida como Cys) e da cistina, que é um dissulfeto de um tipo de óxido da γ -GC, seja mencionada, a produtividade da cisteína unicamente, a partir da

γ -GC, não é dada. Como já mencionado, sabe-se que a cisteína tem um amplo uso e um efeito elevado em comparação com a cistina, e um método para a produção de cisteína de uma maneira eficiente é útil na indústria. Para a produção da cisteína e da cistina, que é um dissulfeto de um tipo de óxido (da cisteína), mediante um tratamento enzimático, uma enzima é necessária e tal produção tem custo mais elevado do que a produção de cisteína e cistina, que é um dissulfeto de um tipo de óxido (da cisteína), mediante um tratamento de aquecimento.

Sob tais circunstâncias, houve uma forte demanda quanto a um método melhorado em que a cisteína seja eficientemente produzida a partir de γ -GC por um tratamento de aquecimento.

Além do Documento de Patente 1, o processo para o tratamento de aquecimento da γ -GC foi também divulgado ao público na Patente Japonesa nº 283415 (Documento de Patente 2), na Patente Japonesa nº 2903659 (Documento de Patente 3), etc. O Documento de Patente 2 revela que, quando um sacarídeo é adicionado à γ -GC seguido por aquecimento, uma composição de condimento tendo gosto bom e sabor de carne assada é preparada e o Documento de Patente 3 revelou que, quando um sacarídeo é acrescentado ao extrato de levedura contendo uma certa quantidade de composto contendo enxofre, tal como a glutamilcisteína, seguido por aquecimento na ausência de gordura, um condimento tendo um sabor de carne assada é preparado. Entretanto, mesmo naqueles Documentos de Patente 2 e 3, não existe nenhuma divulgação quanto a uma descoberta de que a cisteína seja eficientemente preparada da γ -GC.

PROBLEMAS QUE A INVENÇÃO DEVE SOLUCIONAR

Sob as circunstâncias acima mencionadas relacionadas ao estado da técnica, um objeto da presente invenção é fornecer um método em que a cisteína seja capaz de ser eficientemente produzida a partir da γ -GC, e também um método excelente para a produção de um material alimentício

contendo elevado teor de cisteína a partir do extrato de levedura.

MEIOS PARA SOLUCIONAR OS PROBLEMAS

Incidentalmente, o Documento de Patente 1 revela que, quando a γ -GC é aquecida, a quantidade total de cisteína e de cistina, que é
5 um dissulfeto de um tipo de óxido da mesma, é obtida em um rendimento elevado conforme já mencionado.

Agora, os presentes inventores confirmaram por experimentos que a reação da γ -GC mediante aquecimento procede como uma reação intramolecular (referir-se ao Exemplo Experimental 1 que será mencionado
10 posteriormente). Portanto, o rendimento de cisteína e seu dissulfeto de um tipo de óxido liberado da γ -GC mediante uma decomposição térmica, não é dependente da concentração de γ -GC e, conseqüentemente, não é necessário concentrar uma solução aquosa contendo γ -GC. Por outro lado, os compostos contendo enxofre estão abundantemente contidos no extrato de levedura e
15 interagem com a γ -GC (referir-se ao Exemplo Experimental 2, que será mencionado posteriormente). Portanto, quando a γ -GC é submetida a uma decomposição térmica em uma solução de um material alimentício tal como o extrato de levedura contendo compostos que contêm enxofre, presume-se que ocorra uma reação intermolecular, que seja característica da reação de duas ou
20 mais moléculas. Conseqüentemente, um processo em que a γ -GC seja submetida a uma decomposição térmica em uma solução de um material alimentício, tal como o extrato de levedura, apresenta um mecanismo de reação em que a reação intramolecular e a reação intermolecular competem. Quando a reação intramolecular e a reação intermolecular competem como
25 tal, a reação intermolecular é capaz de ser suprimida pela redução da concentração do reagente na solução de reação. Por outro lado, a própria reação intramolecular não é dependente da concentração de um substrato e, portanto, mesmo que a concentração do reagente na solução de reação seja reduzida, isso não afeta a taxa de reação. Conseqüentemente, a reação

intermolecular é suprimida quando a concentração do reagente na solução de reação é reduzida e, como resultado, a eficiência da reação intramolecular aumenta relativamente.

5 A reação de ciclização do peptídeo pode ser listada como um exemplo da reação em que a reação intermolecular e a reação intramolecular venham a competir de tal forma. Quando um peptídeo cíclico é sintetizado, é dada prioridade a uma ciclização intramolecular (reação intramolecular) e, portanto, a reação é realizada por uma alta diluição ou por gotejamento de uma solução de reagente em uma solução, por meio do qual a concentração do
10 reagente na solução de reação é reduzida e o peptídeo cíclico é sintetizado em um alto rendimento.

Sob tal fundamento teórico, em uma decomposição térmica de γ -GC em uma solução de um material alimentício tal como o extrato de levedura, ele contribui na melhora da produtividade da cisteína e da cistina
15 que é um dissulfeto de um tipo de óxido da mesma a partir de γ -GC para conduzir a reação sob a condição em que a concentração de sólidos de uma solução de material alimentício seja baixa. No Documento de Patente 1, existe uma descrição de que, quando a decomposição térmica foi realizada após dissolução do extrato de levedura em pó contendo 4,5% de γ -GC de modo a
20 tornar a concentração de sólidos em 2% na solução aquosa resultante, foi obtido um extrato de levedura em pó contendo 2% como um todo de cisteína e cistina que é um dissulfeto de um tipo de óxido da mesma (referir-se ao Exemplo 1 do Documento). A produtividade da cisteína e da cistina que é um dissulfeto de um tipo de óxido da mesma a partir de γ -GC naquele momento
25 não é menor do que 90%, mostrando uma produtividade muito elevada conforme a teoria acima mencionada.

Em comparação com a cistina, a cisteína tem um amplo uso e um alto efeito em uso, como já mencionado e, portanto, é necessário confirmar a produtividade da cisteína (taxa de conversão em cisteína) sob a

condição mencionada naquele Documento. Portanto, os presentes inventores converteram o extrato de levedura em pó contendo γ -GC em uma solução aquosa contendo a concentração de sólidos de 2% de acordo com o Exemplo 1 daquele Documento, realizaram um tratamento térmico sob a mesma
5 condição e determinaram a taxa de conversão em cisteína (isto é, o quociente dos números molares de cisteína na solução aquosa termicamente tratada dividido pelos números molares de γ -GC na solução aquosa antes do tratamento térmico), após o que a taxa de conversão de γ -GC em cisteína foi de cerca de 40%.

10 De modo a aumentar a taxa de conversão de γ -GC em cisteína, os presentes inventores realizaram uma pesquisa intensiva e, como resultado, eles observaram que a taxa de conversão de γ -GC em cisteína foi capaz de ser aumentada para até 70% quando o extrato de levedura que continha γ -GC era concentrado juntamente com o controle a baixa temperatura não maior que 60
15 °C, para dar um concentrado contendo não menos do que 10% de sólidos e, então, submetido a um tratamento de aquecimento mantendo-se em 70 a 130 °C, o que é mais do que a temperatura de concentração acima mencionada preferivelmente em um estado de uma solução aquosa, em que a quantidade existente de um açúcar redutor não é maior do que 0,5%, preferivelmente sob
20 uma condição ácida ou, mais preferivelmente, em pH de 3,5 a 6, e, à base de tal achado, a presente invenção foi concluída. Tal resultado é inesperado, o qual é diferente do resultado esperado da reação de decomposição em uma solução aquosa de γ -GC, em que a reação intramolecular e a reação intermolecular competem entre si.

25 Assim, a presente invenção diz respeito a um método para uma produção eficiente de um material alimentício contendo uma quantidade elevada de cisteína de extrato de levedura contendo γ -GC, o qual compreende etapas em que um extrato de levedura preparado por um tratamento de células de levedura é concentrado sob controle a baixa temperatura não maior que

60°C, para dar um concentrado em que uma concentração de sólidos não seja menor que 10% e que então seja mantida em 70 a 130°C, o que é mais elevado do que a temperatura de concentração acima mencionada (tratamento de aquecimento), preferivelmente em 70 a 100°C ou, mais preferível, em 75 a 100°C, de preferência sob uma condição acídica ou, mais preferivelmente, em pH 3,5 a 6,0 e, preferivelmente, na presença de uma baixa quantidade de açúcar redutor, ou, sendo-se mais específicos, preferivelmente não mais do que 1% ou, mais preferível, não mais do que 0,5% de açúcar redutor.

MODO DE REALIZAR A INVENÇÃO

10 A presente invenção será agora ilustrada em detalhes como abaixo.

(1) Primeiramente, a levedura contendo γ -GC é suscetível de ser obtida como segue:

Nenhuma limitação particular existe quanto à levedura usada na presente invenção, na medida em que ela seja uma levedura que contenha γ -GC. É preferível usar uma levedura que contenha não menos do que 1% em peso de γ -GC (peso de γ -GC por peso de célula seca), tendo em vista que um material alimentício, preparado de levedura contendo menos do que 1% em peso de γ -GC, tem o cheiro de aroma de levedura, de forma que o material pode conter alto teor de cys. O peso máximo de γ -GC contido por uma levedura (peso de γ -GC por peso de célula seca) pode ser não maior que 30%, uma vez que a γ -GC se localiza na parte solúvel da célula de levedura e quase 1/3 do peso da célula de levedura constitui a parte solúvel. Exemplos de tal levedura são uma cepa H4ΔGSH2 mencionada na Publicação Internacional WO 00/30474 (o Documento de Patente 1 já mencionado) e a cepa Nα2 e a cepa Nα3 mencionadas na Publicação Internacional 01/90310 (o Documento de Patente 4 já mencionado). Como será mencionado posteriormente, a γ -GC interage com um composto tendo um grupo SH no extrato de levedura durante a reação de decomposição, depois que a produtividade de cisteína é reduzida

e, portanto, é preferível usar uma levedura em que o teor de glutathione nas células seja baixo, preferivelmente não maior que 0,5% em células de levedura seca ou, mais preferível, não mais do que 0,1% ou ainda mais, e preferivelmente usar uma cepa contendo apenas pequena quantidade de glutathione tendo em vista um equilíbrio para o crescimento das células. Exemplos de tal cepa são *Saccharomyces cerevisiae* tendo uma enzima sintetizadora da glutathione, em que um resíduo de glicina na posição 387 seja transformado em um resíduo de ácido aspártico, *Saccharomyces cerevisiae* tendo uma enzima sintetizadora da glutathione, em que um resíduo de prolina na posição 54 seja transformado em um resíduo de leucina, e *Saccharomyces cerevisiae* tendo uma enzima sintetizadora da glutathione, em que um resíduo de arginina na posição 370, e depois disso ficam deficientes.

Como já mencionado, não existe nenhuma limitação particular para uma cepa de levedura até agora, já que uma cepa de levedura contendo γ -GC e exemplos específicos são cepas de levedura que pertencem ao gênero *Saccharomyces* tais como *Saccharomyces cerevisiae*, gênero *Schizosaccharomyces* tais como *Schizosaccharomyces pombe* e o gênero *Candida* tais como *Candida utilis*. Incidentalmente, no exemplo 1, que será mencionado posteriormente, foi usada uma cepa N3 de levedura diplóide (*Saccharomyces cerevisiae*) preparada utilizando um meio mencionado na Publicação Internacional WO 01/90310 (Documento de Patente 4 já mencionado) em que a atividade enzimática que sintetiza glutathione foi enfraquecida.

(2) Assim, um método para a fabricação de extrato de levedura, a partir de levedura preparada conforme acima, será ilustrado.

O produto cultivado da levedura preparada conforme acima por incubação de leveduras de sementes sob uma condição preferida continha células de levedura contendo uma quantidade predeterminada de γ -GC. Embora seja possível fabricar um extrato de levedura diretamente a partir do

produto da cultura, desnecessário dizer que um extrato de levedura é também capaz de ser fabricado a partir de células de levedura contendo γ -GC que são uma vez separadas do produto cultivado da levedura. Não existe nenhuma limitação particular para o método de fabricação do extrato de levedura, mas um método comum pode ser usado na medida em que a condição usada não decomponha significativamente γ -GC ou Cys. Um exemplo é que as células de levedura são retidas com água quente de 60 a 80°C de modo que o conteúdo seja extraído e o resíduo, após extração (resíduo celular), seja removido. Quando o extrato de levedura é fabricado através de um método de extração com água quente como tal, a concentração do sólido no extrato de levedura é geralmente em torno de vários percentuais. Quando o extrato de levedura é fabricado por meios de extração com água quente, o resíduo celular é removido e, portanto, a quantidade de γ -GC por sólido contido no extrato de levedura eleva até uma dimensão de várias vezes. Por exemplo, quando o conteúdo é extraído de células de levedura contendo 1% em peso de γ -GC com água quente, o conteúdo de γ -GC por sólidos contido no extrato de levedura se eleva até cerca de 4 a 8% em peso. Incidentalmente, embora a eficiência da extração seja inferior, igualmente, um método para a fabricação de um extrato de levedura a partir de células de levedura ou levedura cultivada em que a temperatura de extração seja mantida a não mais do que 60°C não seja excluída da forma de realização da presente invenção. Neste caso, continua-se diretamente até a etapa de concentração que é a próxima etapa e, portanto, a temperatura é continuamente mantida em não mais do que 60°C até que a concentração de sólidos no extrato de levedura, que é um extrato, alcance os 10% ou mais.

(3) O método de concentração do extrato de levedura preparado mais acima de acordo com o método da presente invenção é como segue.

Assim sendo, uma vez que a concentração de sólidos do

extrato de levedura fabricado conforme mencionado acima é em geral tão baixa quanto vários percentuais, faz-se necessário concentrar antes do tratamento de aquecimento para conversão de γ -GC em Cys. Não existe nenhuma limitação particular para o método de concentração, já que γ -GC e Cys não são significativamente decompostas, embora uma concentração em baixa temperatura seja preferida. A concentração sob uma condição de alta temperatura não é preferida porque γ -GC e Cys interagem com um composto contendo enxofre no extrato de levedura de forma que o rendimento de Cys diminui.

Assim, na presente invenção, o extrato de levedura está concentrado, bem como controlado a uma temperatura baixa não maior do que 60°C para se preparar um material alimentício em uma forma líquida em que a concentração de sólidos não seja menor do que 10%. Exemplos específicos do método de concentração em temperatura baixa são a concentração a vácuo e a concentração por congelamento. É preferível que a concentração seja realizada na coexistência de poucas quantidades de oxigênio dissolvido tais como não mais do que 3 ppm, preferivelmente não mais do que 2 ppm ou, mais preferivelmente, não mais do que 1 ppm de oxigênio dissolvido. A concentração na coexistência de oxigênio dissolvido não é preferida porque grupos SH de Cys e γ -GC são oxidados, de forma que o rendimento de Cys diminui. De acordo com a concentração em baixa temperatura, sob tal condição, a concentração dos sólidos no extrato de levedura torna-se não menor do que 10% dentro, por exemplo, de 6 a 15 horas. Neste caso, é também possível que, por exemplo, o extrato de levedura se torne sólido mas, quando sólidos, é necessário que o sólido seja retornado ao líquido usando água ou similar na próxima reação de aquecimento, após a concentração. Consequentemente, é preferível, tendo em vista um controle do processo, que o extrato de levedura, após a concentração, esteja em uma forma líquida.

Então, um método em que o material alimentício em uma forma líquida, preparado como acima, seja submetido a um tratamento de aquecimento para obter um material alimentício contendo elevada quantidade de cisteína, será ilustrado.

5 É preferível que a reação de aquecimento (decomposição térmica) do extrato de levedura, após concentração, seja realizada em um material alimentício (uma solução aquosa) em uma forma líquida em que a concentração de sólidos não seja menor do que 10%. Quando a decomposição térmica é realizada em uma solução aquosa em que a concentração de sólidos
10 seja menor do que 10%, a reação de decomposição de γ -GC não segue uma reação de primeira ordem, outra reação paralela que não a decomposição em Cys ocorre, e a produtividade de Cys se reduz, motivo por que tal não é preferido. É preferível tendo em vista uma produção eficiente de Cys que a temperatura de aquecimento esteja entre 70 e 130°C. Quando a reação de
15 aquecimento é realizada em menos do que 70°C, algum tempo é necessário para a reação de decomposição de γ -GC em Cys e, durante aquele período, grupos SH de Cys e γ -GC são oxidados por oxigênio dissolvido na solução, motivo pelo qual isso não é preferido. Por outro lado, quando a reação de decomposição é realizada em mais do 130°C, grupos SH de Cys e γ -GC são
20 oxidados para reduzir a produtividade de Cys, motivo porque isso também não é preferido. De acordo com o tratamento de aquecimento sob tal condição, o material alimentício se torna um material alimentício contendo Cys em alto grau, em que Cys está contida em uma quantidade tão alta quanto 2% na concentração de sólidos, por exemplo dentro de 30 a 120 minutos.

25 (a) Incidentalmente, a quantidade existente do açúcar redutor no material alimentício de um estado líquido após o tratamento de aquecimento ilustrado acima (4), é como segue.

É preferível que nenhum açúcar redutor esteja presente durante a decomposição térmica de γ -GC. Para ser específico, é preferível que não

mais que 1% e, mais preferivelmente, não mais do que 0,5% como ilustrado anteriormente. Isso ocorre porque, quando um açúcar redutor está presente, ele reage com γ -GC e Cys, e é convertido em uma substância diferente de Cys. Uma vez que a quantidade existente do açúcar redutor afeta a taxa de conversão em Cys, é preferível que esteja ausente tanto quanto possível. Tal material alimentício, em que a quantidade existente de açúcar redutor esteja dentro da faixa acima, é suscetível de ser preparado a partir de um produto cultivado da levedura em que um sacarídeo é assimilado à levedura, de modo a tornar o sacarídeo residual tão pouco quanto possível na cultura de levedura.

Quando o sacarídeo residual está em muita quantidade, o extrato de levedura não é diretamente fabricado a partir da levedura cultivada, porém as células de levedura são uma vez separadas da levedura cultivada ou, se necessário, as células de levedura que são uma vez separadas, são lavadas com água etc. Em consequência, o extrato de levedura é capaz de ser preparado. Quando um açúcar redutor está presente durante a reação de aquecimento (decomposição térmica) de γ -GC em Cys, é preferível conduzir a reação de conversão de γ -GC em Cys, em que a quantidade existente do açúcar redutor seja preferivelmente não mais do que 1% ou, mais preferivelmente, não mais do que 0,5% e sob uma condição acídica que seja preferivelmente de pH de 3,5 a 6 quando o equivalente molar, etc. forem levados em consideração.

(b) O pH durante a reação de aquecimento é como segue.

Conforme mencionado no Exemplo Experimental 1 que será apresentado posteriormente, a etapa de conversão de γ -GC em Cys procede de uma maneira que a protonação ocorra no sítio do átomo de oxigênio do grupo carbonila de γ -GC e, como um resultado, uma eliminação acontece quando aquele sítio se torna um ponto de partida. Portanto, é preferível que seja realizado sob uma condição acida. Por exemplo, pode-se ter pH de 3,5 a 6 em que resulte uma protonação suficiente.

EXEMPLOS

A presente invenção será agora ilustrada em mais detalhes pelos seguintes Exemplos Experimentais e Exemplos.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 1: Confirmação de que a reação de liberação de cisteína a partir de γ -GC é devida a uma reação intramolecular.

5 Quando um cálculo de otimização de estrutura para γ -GC foi realizado usando um MOPAC (Cambridge Soft ChemOffice Ultra, CS MOPAC), foi previsto que a estrutura molecular de γ -GC não era uma estrutura estendida, o que é observado em dipeptídeos onde ocorre ligação comum α , mas era um estrutura curvada como se um grupo γ -glutamila
10 estivesse mais próximo de um grupo amino (ligação de amido) de cisteína (Cys). Quando a carga de polarização da γ -GC foi calculada, havia carga negativa no sítio do átomo de oxigênio de um grupo carbonila na posição γ . Portanto, foi previsto que, sob uma condição ácida, a protonação está apta a ocorrer neste sítio de γ -GC e que ocorre uma eliminação onde este sítio seja
15 um ponto de partida, após o que a Cys é liberada. De tal estrutura molecular de γ -GC, presume-se que a reação de liberação de Cys a partir de γ -GC (reação de decomposição de γ -GC em Cys) prossegue de acordo com uma reação intramolecular.

Depois disso, uma análise através da cinética química foi
20 realizada para confirmar que a reação de liberação de Cys a partir de γ -GC ocorre através de uma reação intramolecular e não depende da concentração de substrato. Dois tipos de soluções aquosas contendo cerca de 10 mM e cerca de 100 mM de γ -GC foram preparadas, cada uma delas tendo sido aquecida a 50, 60, 70 e 80°C e as quantidades de γ -GC após 0 a 24 horas foram medidas.
25 A constante da taxa de decomposição foi calculada a partir do resultado e gráficos de Arrhenius foram preparados.

O resultado é mostrado nas figuras 1A até 1D. A partir do resultado, percebe-se que quanto mais elevada a temperatura de aquecimento, maior a taxa de decomposição. Isto mostra que a reação de liberação de Cys a

partir de γ -GC ocorre não sendo dependente da concentração de substrato, mas sendo dependente da temperatura.

A partir do resultado acima, foi confirmado que a reação de liberação de Cys a partir de γ -GC ocorreu através de uma reação intramolecular e não é dependente de concentração de substrato de γ -GC.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 2: Interação de γ -GC com um composto contendo enxofre de um tipo de óxido.

A γ -GC interage com outros compostos contendo enxofre no material alimentício. Assim, a reação de decomposição de γ -GC em uma solução contendo glutathione de um tipo de óxido que é um dissulfeto de um tipo de óxido, foi pesquisada. Como resultado é estimado que, em um material alimentício em que um composto contendo enxofre de um tipo de óxido coexiste, γ -GC reduz o composto contendo enxofre de um tipo de óxido devido a sua alta capacidade de redução e então uma reação de decomposição de um composto contendo γ -GC procede. Presume-se que a reação prossegue de acordo com o mecanismo de reação apresentado na figura 2, que será mencionada posteriormente.

Em seguida, potenciais de redução de Cys, γ -GC e glutathione (daqui em diante podendo ser abreviados como GSH) foram pesquisados e foi descoberto que a capacidade de redução era alta na ordem de Cys, γ -GC e GSH. Então, soluções aquosas (pH 5) contendo 10 mM de γ -GC às quais 10 mM de GSSG (glutathione de um tipo oxidado) foram adicionados ou não, foram preparadas e aquecidas a 90°C para medir as quantidades de Cys, γ -GC e GSH periodicamente.

Os resultados estão apresentados nas figuras 3(a) e 3(b). Do resultado, foi observado que GSSG foi reduzido através de γ -GC para produzir GSH e, como um resultado da produção de GS - γ - GC, a liberação de Cys a partir de γ -GC não ocorreu eficientemente. Assim, quando γ -GC foi submetida a uma decomposição térmica em um material alimentício contendo

SH de um tipo de óxido, uma reação paralela ocorreu dependendo da sua concentração, após a qual a produtividade da cisteína foi reduzida.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 3: Preparação de extrato de levedura e pó de extrato de levedura contendo γ -GC.

5 O pó de extrato de levedura contendo γ -GC usado nos seguintes exemplos experimentais foi preparado com segue.

(a) Preparação da cepa de levedura N3 contendo γ -GC.

A cepa (MAT a) Na monoplóide foi preparada através de um método convencional a partir de uma cepa selvagem do *Saccharomyces cerevisiae* diplóide. A cepa Na e uma cepa (MAT α gsh2) N α 3 de levedura monoplóide (*Saccharomyces cerevisiae*), mencionada na publicação internacional WO 01/9310 (Documento 4 de patente já mencionada) foram conjugadas para preparar uma levedura diplóide. A levedura diplóide foi submetida a uma formação de esporos de acordo com um método convencional e uma cepa Na 3 de levedura monoplóide (MAT a gsh2), tendo um gene de enzima que sintetiza glutathiona de um tipo mutante que foi o mesmo da cepa N α , foi preparada. A cepa N α 3 foi conjugada à cepa Na 3 e, a partir do diplóide resultante, foi selecionada cepa N3 de levedura diplóide tendo uma enzima que sintetiza glutathiona de um tipo mutante na forma homo e contendo não menos do que 1% em peso de γ -GC durante uma fase de crescimento logarítmico cultivada em um meio SD. Incidentalmente, foi também suscetível de ser preparado com o uso de *Saccharomyces cerevisiae* FERM P-18546 (Depósito Internacional Número BP-8228) ao invés da cepa N α 3.

25 Além disso, foi também suscetível de se usar uma cepa diplóide *Saccharomyces cerevisiae* AJ14861 (Depósito Internacional FERM BP-08553) ao invés da cepa N3 de levedura.

(b) Preparação de células de levedura contendo γ -GC.

A cepa N3, que foi preparada conforme acima, foi cultivada

com o uso de um recipiente para fermentação. Um meio YPD foi usado e a incubação foi realizada com alimentação de glicose a 30°C. O produto cultivado foi coletado e lavado para preparar as células de levedura contendo γ -GC.

- 5 (c) Preparação de extrato de levedura e pó de extrato de levedura contendo γ -GC.

As células de levedura contendo γ -GC preparadas conforme acima foram colocadas em suspensão em água para produzir a concentração de 10 g/dL e foram aquecidas a 70°C por 10 minutos para extrair o conteúdo.

- 10 O conteúdo foi separado em resíduo e conteúdo de célula de levedura, através de separação centrífuga. O conteúdo separado (extrato de levedura; concentração de sólidos: 1,7%) foi secado através de secagem por congelamento para preparar um pó de extrato de levedura contendo γ -GC em uma quantidade de 8% para uma DM (matéria seca).

- 15 EXEMPLO EXPERIMENTAL 4: Reação de decomposição de γ -GC na presença de um sacarídeo (1).

- Nos documentos de patentes 1 e 2, acima mencionados, existem revelações de que uma composição de condimento tendo um bom sabor de carne assada é preparada através da adição de um sacarídeo a γ -GC em um extrato de levedura seguido por aquecimento. Em seguida, a produtividade de Cys naquela reação foi mensurada.

- Assim, uma solução aquosa de 83% de concentração contendo em um relação de 30 partes em peso do pó do extrato de levedura preparado no Exemplo Experimental 3, 30 partes em peso de ácido glutâmico e 3 partes em peso de xilose (açúcar redutor) foi preparada (quantidade existente do açúcar redutor: 3%) e submetida a um tratamento de aquecimento em 90°C por 35 minutos. Como um resultado, nenhuma Cys foi produzida. Presume-se que isto seja devido ao fato de que o Cys resultante tenha reagido com o sacarídeo.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 5: Reação de decomposição de γ -GC na presença de um sacarídeo(2).

O pó de extrato de levedura preparado no Exemplo Experimental 3 foi produzido em uma solução aquosa a 30% de pH 4,5 e igualmente dividida em dez, e então xilose e glicose foram adicionadas a cada uma delas para produzir as concentrações finais de 0%, 0,25%, 0,5%, 1% e 3%. Cada uma das soluções aquosas foi submetida a um tratamento de aquecimento mantendo-se em 90°C por 2 horas.

O resultado é apresentado na figura 4. É observado do resultado que, sob uma condição ácida, Cys é eficientemente preparada no caso em que a concentração de xilose seja de 1% ou menos.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 6: Condição para concentração de extrato de levedura (concentração de oxigênio dissolvido).

O pó de extrato de levedura contendo γ -GC, preparado no Exemplo Experimental 3, foi produzido em uma solução aquosa a 3,4% (pH 4,5) e aquecido em 50°C por 10 horas. A taxa residual de γ -GC (incluindo a Cys resultante) foi verificada através de concentração de oxigênio dissolvido na solução aquosa.

O resultado é apresentado na figura 5. Observa-se do resultado que, quando a concentração de oxigênio dissolvido foi de 1 ppm (controlado pela desaeração e introdução de nitrogênio), γ -GC permaneceu até uma extensão de cerca de 90%, ao passo que, quando a concentração de oxigênio dissolvido foi de 6 ppm, ele decresceu até cerca de 40%. Uma vez que 6 ppm é uma concentração de oxigênio que se dissolve sob pressão comum, a eficiência de um aquecimento de baixa temperatura em uma condição de vácuo foi também apresentada em uma observação tal de que nenhum SH de um tipo de óxido havia sido produzido.

Depois disso, o extrato da célula de levedura preparado no Exemplo Experimental 3 (c) (o conteúdo separado a partir do resíduo da

célula de levedura por meio de separação centrífuga) é aquecido *in vacuo* (120 mmHg) dentro da faixa de 50 a 70°C até que a concentração de sólidos alcançasse 60%. Durante a concentração, as quantidades de γ -GC e cisteína contidas no extrato de célula de levedura foram periodicamente medidas.

- 5 Como um resultado, a quantidade total de γ -GC e cisteína permaneceu em não menos do que 85%.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 7: Diferença na reação de decomposição de γ -GC dependendo das concentrações de sólidos.

- O extrato de células de levedura preparado no Exemplo
10 Experimental 3 (c) (concentração de sólidos: 1,7%) foi concentrado *in vacuo* (120 mmHg) em que a temperatura foi controlada até 50°C até que a concentração de sólidos se tornasse de 2 a 60% (isto é, 3%, 5%, 8%, 10%, 20% e 30%). Cada uma das soluções aquosas em que o pH havia sido
ajustado a 4,5 através da adição de ácido clorídrico, foi aquecida a 50°C,
15 60°C, 70°C, 80°C e 90°C e o conteúdo de γ -GC na solução aquosa foi periodicamente medido, após o que a reação de decomposição de γ -GC em cada concentração foi analisada cineticamente.

- O resultado é apresentado nas figuras 6A até 6F, as quais serão apresentadas posteriormente. Em cada um dos desenhos, (a) apresenta
20 mudanças na decomposição de γ -GC com um lapso de tempo em certa concentração de sólidos e (b) apresenta os gráficos de Arrhenius correspondentes. A partir daqueles resultados, observou-se que, quando o tratamento de aquecimento foi realizado em não menos do que 10% de concentração de sólidos, a reação de decomposição de γ -GC prosseguiu em
25 uma maneira tal que a reação intramolecular se deu antes da reação intramolecular e a reação prosseguiu como uma reação de primeira ordem dependente de temperatura. Consequentemente, foi apresentado que, em um material alimentício contendo SH de um tipo de óxido, o tratamento de aquecimento na concentração não menor que 10% é eficaz em suprimir a

reação intermolecular e em prosseguir a reação intramolecular para intensificar a produtividade de Cys.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 8: Produtividade de Cys a partir de γ -GC.

O extrato de célula de levedura preparado no Exemplo Experimental 3 (c) (concentração de sólidos: 1,7%) foi concentrado *in vacuo* (120 mmHg) controlando-se a temperatura em 50°C até a concentração de sólidos tornar-se de 10 a 60% (10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60%) e então ajustado a pH 4,5 por adição de ácido clorídrico para esse fim. Cada uma das soluções aquosas foi aquecida a 90°C e a produtividade de Cys foi medida periodicamente. O resultado foi que a produtividade de Cys em cada concentração de sólidos (quociente do número molar máximo de Cys contido em uma solução aquosa após o aquecimento dividido pelos números molares de γ -GC contido em uma solução antes da concentração) foi na ordem de 72,5%, 77,6%, 78,7%, 78,1%, 77,5% e 74%.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 9: Produtividade de Cys a partir de γ -GC.

O extrato de células de levedura preparado no Exemplo Experimental 3 (c) (concentração de sólidos: 1,7%) foi concentrado *in vacuo* (120 mmHg) controlando-se a temperatura em 50°C até a concentração de sólidos tornar-se de 10 a 60% (10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60%) e então ajustado a pH 3,5 por adição de ácido clorídrico para esse fim ou ajustado a pH 6,0 por adição de hidróxido de sódio. Cada uma das soluções aquosas foi aquecida a 90°C e a produtividade de Cys foi medida periodicamente. O resultado foi que a produtividade de Cys em pH 3,5 em cada concentração de sólidos foi na ordem de 75,8%, 79,3%, 80,2%, 80,1%, 76,2% e 75,2%. E o resultado foi que a produtividade de Cys em pH 6,0 em cada concentração de sólidos foi na ordem de 71,8%, 72,8%, 75,8%, 76,3%, 74,2% e 72,2%.

EXEMPLO EXPERIMENTAL 10: Exemplo experimental com o uso da cepa AJ14861.

(a) Preparação de células de levedura contendo γ -GC.

A cepa AJ14861 foi respectivamente inoculada em meio YPD e cultivada com agitação em 30°C. A cultura obtida foi inoculada em um meio A, que continha 0,4 mg/dL de pantotenato de cálcio, e cultivada com agitação em 30°C. Em suas fases de crescimento logarítmico, as células foram coletadas e inoculadas em um meio B, que não continha pantotenato de cálcio, na concentração de 120 mg (peso da levedura seca)/dL (meio) e cultivada com agitação em 30°C por 1 dia. (O conteúdo γ -GC por células de levedura secas foi aumentando no decurso de tempo e tornou-se cerca de 4% em 24 horas.). O produto cultivado foi coletado e lavado para preparar células de levedura contendo γ -GC.

O meio B, que não continha pantotenato de cálcio, pode ser exemplificado como segue.

Composição	Concentração
Glicose	3 g/dl
KH ₂ PO ₄	0,15 g/dl
MgSO ₄ - 7H ₂ O	0,17 g/dl
CaCl ₂ - 2H ₂ O	0,03 g/dl
Uréia	0,4 g/dl
Biotina	1,5 ppm
Inositol	100 ppm
V.B6	0,05 ppm
Ion Zn	0,3 ppm
Ion Fe	0,3 ppm
Ion Cu	0,05 ppm

O meio A, que contém pantotenato de cálcio, é o meio B com 0,4 mg/dL de pantotenato de cálcio.

(b) Preparação de extrato de levedura contendo γ -GC.

As células de levedura contendo γ -GC preparadas conforme acima foram submetidas a suspensão em água para produzir a concentração de 10 g/dL e aquecidas a 70°C por 10 minutos para extrair o conteúdo. Ele foi separado em resíduo e conteúdo de células de levedura através de separação centrífuga. O conteúdo separado (extrato de levedura; concentração de sólidos: 2,2%) continha γ -GC em uma quantidade de cerca de 14% para uma DM.

(c) Produtividade de Cys a partir de γ -GC.

O extrato de célula de levedura preparado acima foi concentrado *in vacuo* (120 mmHg) controlando a temperatura em 50°C até a concentração de sólidos tornar-se de 30% e então ajustado a pH 4,5 por
5 adição de ácido clorídrico para esse fim. A solução aquosa foi aquecida a 90°C e a produtividade de Cys foi periodicamente medida. A produtividade de Cys foi de 82,1%.

EXEMPLO 1: Preparação de material alimentício contendo cisteína em alto grau.

10 (a) Preparação do material alimentício líquido contendo uma quantidade elevada de cisteína.

As células de levedura contendo γ -GC, preparadas através do método mencionado no Exemplo Experimental 3 foram colocadas em suspensão em água para produzir 10 g/dL e aquecidas a 70°C por 10 minutos
15 para extrair o conteúdo. A separação centrífuga foi realizada para separar resíduo e conteúdo das células de levedura. Como tal, 10 litros do conteúdo contendo γ -GC foram preparados (a concentração de sólidos no extrato foi em torno de 1,7% e γ -GC estava contido em uma quantidade de cerca de 8% no sólido). O conteúdo foi concentrado em vácuo (120 mmHg) controlando a
20 temperatura em 50°C e, após cerca de 10 horas, a concentração de sólidos produziu cerca de 30%. O concentrado ao qual o ácido clorídrico foi adicionado para ajustar ao pH de 4,5 foi mantido em 90°C por cerca de 1 hora para preparar um material alimentício líquido contendo uma quantidade elevada de cisteína. Assim, um material alimentício contendo 3,1% de Cys ao
25 sólido foi preparado. Naquele momento, a taxa de conversão de γ -GC para Cys foi em torno de 80%.

(b) Preparação de material alimentício em pó contendo uma quantidade elevada de cisteína.

O material alimentício líquido, preparado acima, contendo alto

grau de cisteína, foi secado por congelamento para dar um material alimentício contendo Cys em alto grau em uma forma em pó em que a taxa para o sólido foi de 3,1%.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

5 De acordo com a presente invenção, a cisteína é capaz de ser eficientemente preparada a partir de γ -GC e, além disso, um material alimentício contendo uma quantidade elevada de cisteína é capaz de ser facilmente fornecido a partir do extrato de levedura.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

10 A figura 1A apresenta uma reação de decomposição de γ -GC (concentração: 10 mM) (Exemplo Experimental 1).

A figura 1B apresenta uma reação de decomposição (produção de Cys) de γ -GC (concentração: 10 mM) (Exemplo Experimental 1)

15 A figura 1C apresenta uma reação de decomposição de γ -GC (Concentração: 100 mM) (Exemplo Experimental 1).

A figura 1D apresenta uma reação de decomposição (produção de Cys) de γ -GC (concentração: 100 mM) (Exemplo Experimental 1).

20 A figura 2 apresenta um mecanismo de interação de γ -GC com um composto contendo enxofre de um tipo de óxido (Exemplo Experimental 2).

A figura 3 apresenta uma reação de aquecimento de Cys, γ -GC e GSH na coexistência e na ausência de GSSG (Exemplo Experimental 2).

25 A figura 4 apresenta uma reação de decomposição de γ -GC (convertendo a taxa de Cys) na presença de um sacarídeo (Exemplo Experimental 5).

A figura 5 apresenta uma relação entre a concentração de oxigênio dissolvido e a taxa residual de γ -GC (Exemplo Experimental 6).

A figura 6A apresenta uma reação de decomposição de γ -GC no caso de 3% em DM (Exemplo Experimental 7).

A figura 6B apresenta uma reação de decomposição de γ -GC no caso de 5% em DM (Exemplo Experimental 7).

A figura 6C apresenta uma reação de decomposição de γ -GC no caso de 8% em DM (Exemplo Experimental 7).

5 A figura 6D apresenta uma reação de decomposição de γ -GC no caso de 10% em DM (Exemplo Experimental 7).

A figura 6E apresenta uma reação de decomposição de γ -GC no caso de 20% em DM (Exemplo Experimental 7).

10 A figura 6F apresenta uma reação de decomposição de γ -GC no caso de 30% em DM (Exemplo Experimental 7).

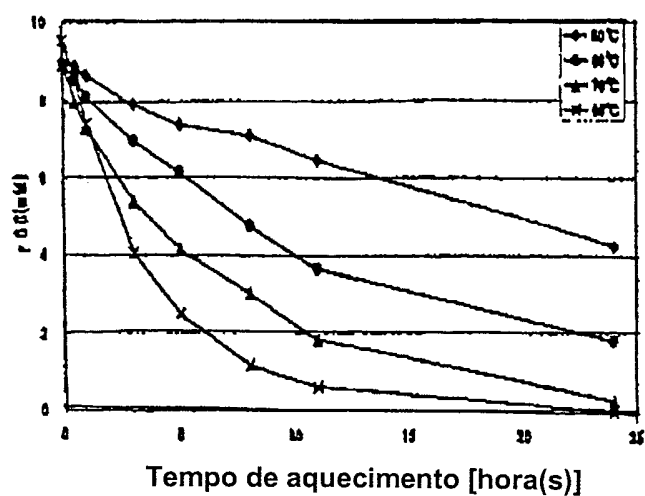
REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um material alimentício contendo uma alta quantidade de cisteína, em que um extrato de levedura é preparado de células de levedura contendo γ -glutamilcisteína em meio ácido com pH entre 3,5 e 6,0, caracterizado pelo fato de que o extrato é concentrado pelo controle na temperatura tão baixa quanto não superior a 60°C, para preparar um material alimentício em uma forma líquida, em que a concentração de sólidos seja não menor que 10%, e o material alimentício resultante seja mantido em 70 a 130 °C.
2. Método para a produção de um material alimentício contendo uma alta quantidade de cisteína de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade existente de açúcar redutor no material alimentício é não maior que 1% e um tratamento de aquecimento (mantendo-se em 70 a 130°C) é realizado sob uma condição acídica.
3. Método para a produção de um material alimentício contendo uma alta quantidade de cisteína de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o método para a concentração mediante controle na temperatura baixa, é uma concentração a vácuo.

FIGURA 1A

Reação de Decomposição de γ -GC 10 mM

Mudanças na decomposição de γ -GC com um lapso de tempo.



Gráficos de Arrhenius da decomposição de γ -GC

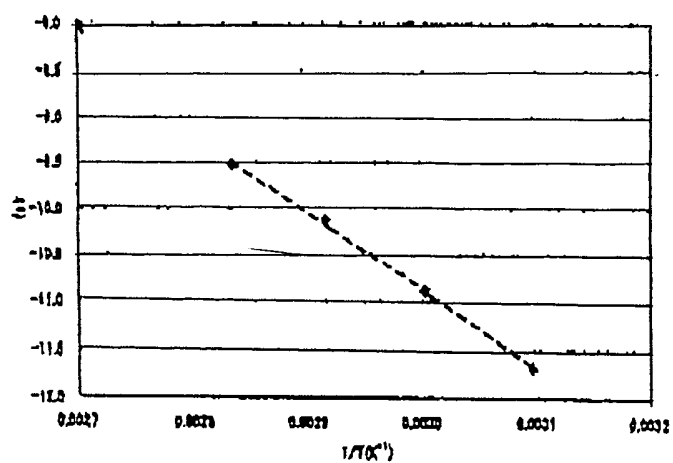
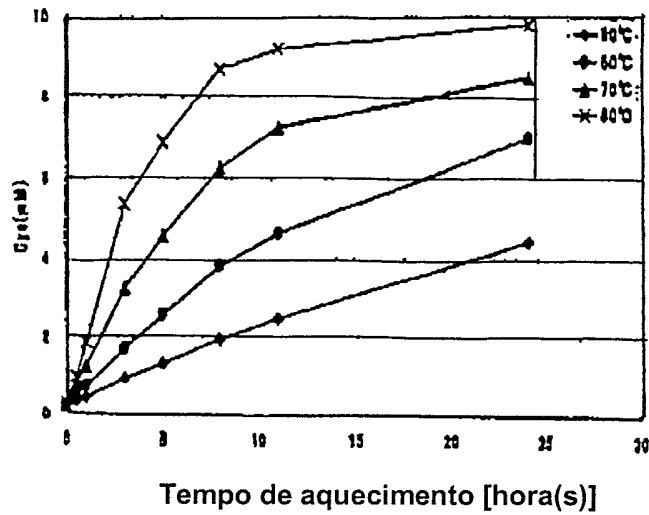


FIGURA 1B

Reação de Decomposição (Produção de Cys) de γ -GC 10 mM

Mudanças na produção de Cys com um lapso de tempo



Gráficos de Arrhenius da produção de Cys

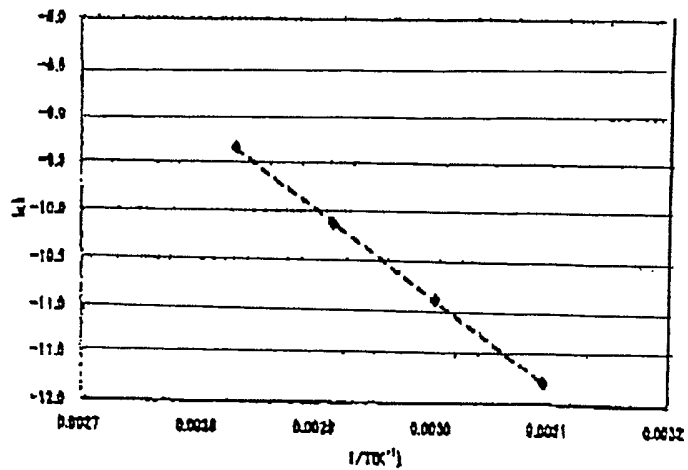
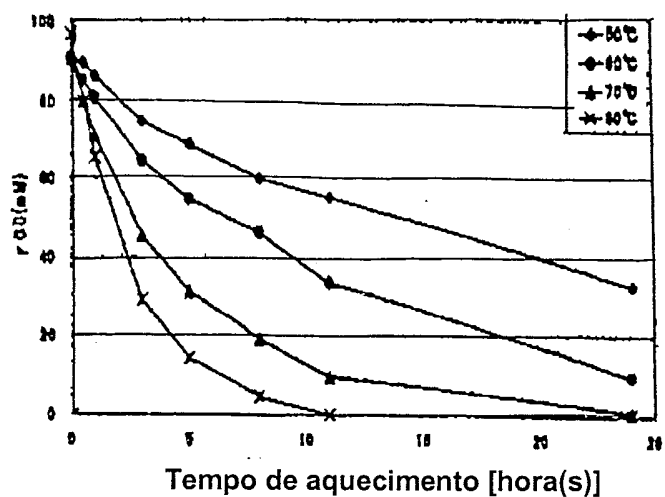


FIGURA 1C

Reação de Decomposição de γ -GC 100 mM

Mudanças na decomposição de γ -GC com um lapso de tempo



Gráficos de Arrhenius de decomposição de γ -GC

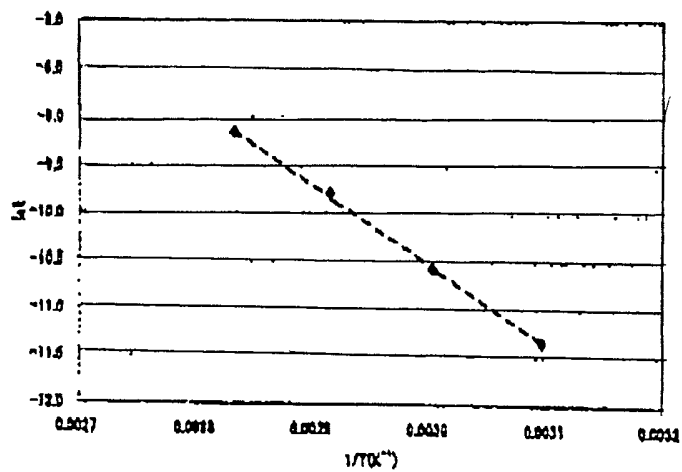
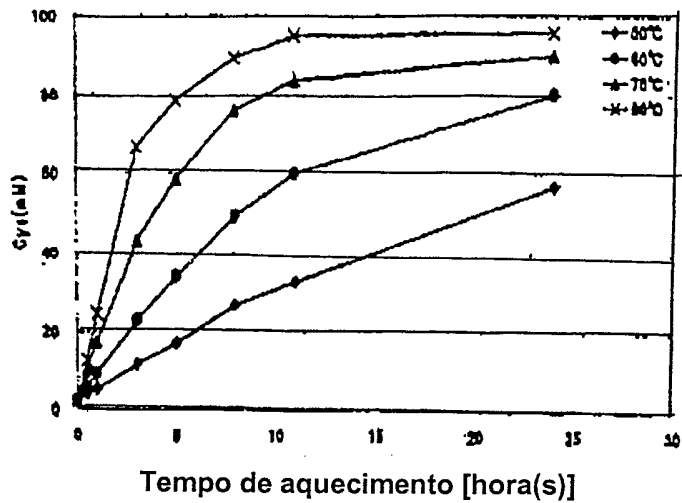


FIGURA 1D

Reação de Decomposição (Produção de Cys) de γ -GC 100 mM

Mudanças na produção de Cys com um lapso de tempo



Gráficos de Arrhenius de produção de Cys

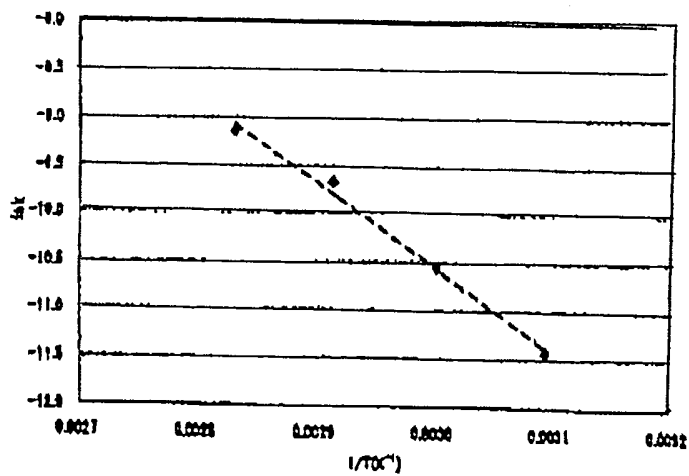
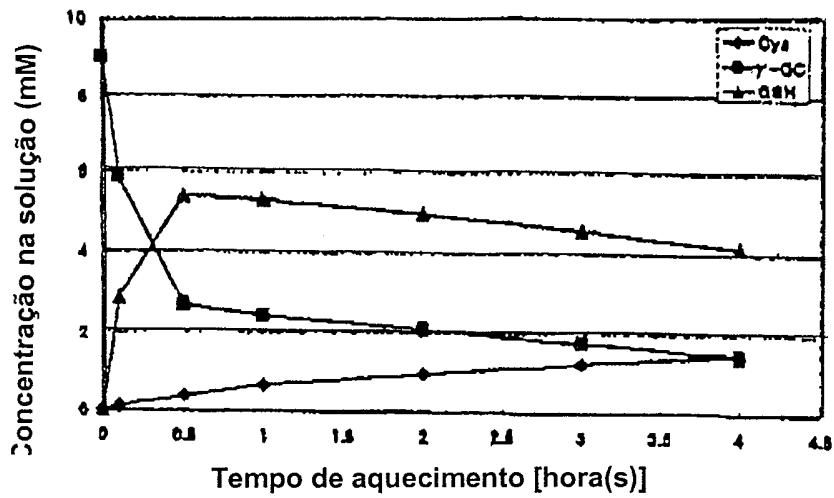


FIGURA 3

Reação de aquecimento na coexistência de GSSG 10 mM

(a) Reação de aquecimento na ausência de GSSG



(b) Reação de aquecimento na ausência de GSSG

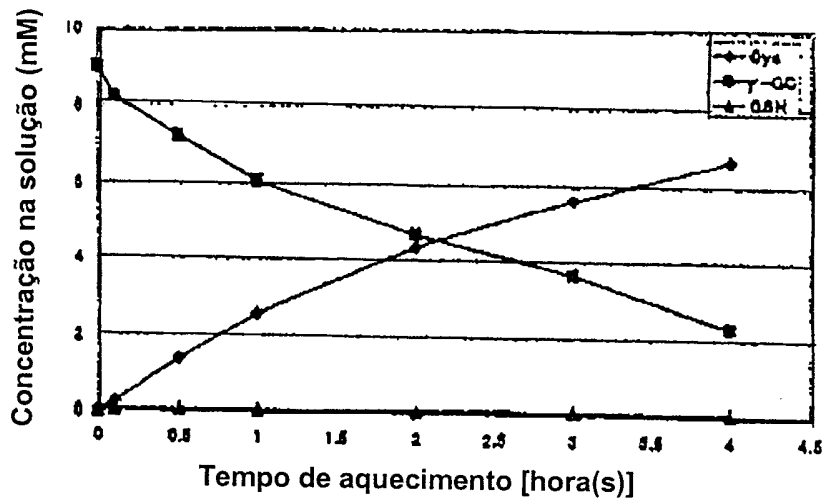
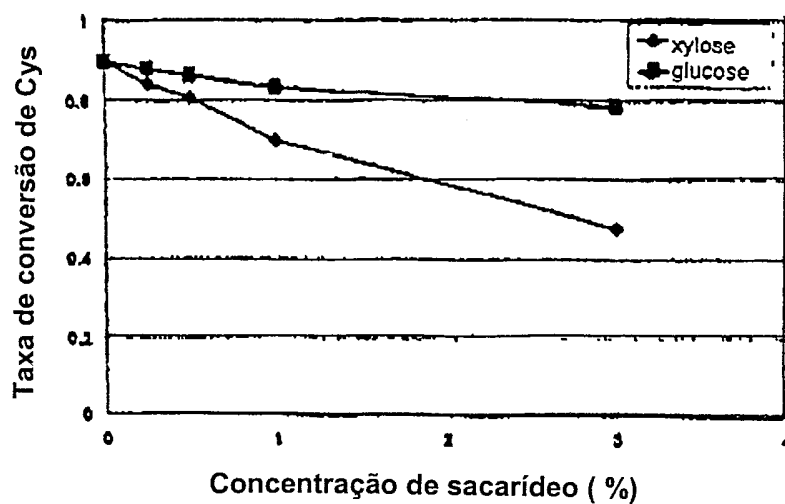


FIGURA 4

Taxa de conversão de Cys na presença de um sacarídeo

**FIGURA 5**

Taxa residual de γ -GC na presença de oxigênio dissolvido

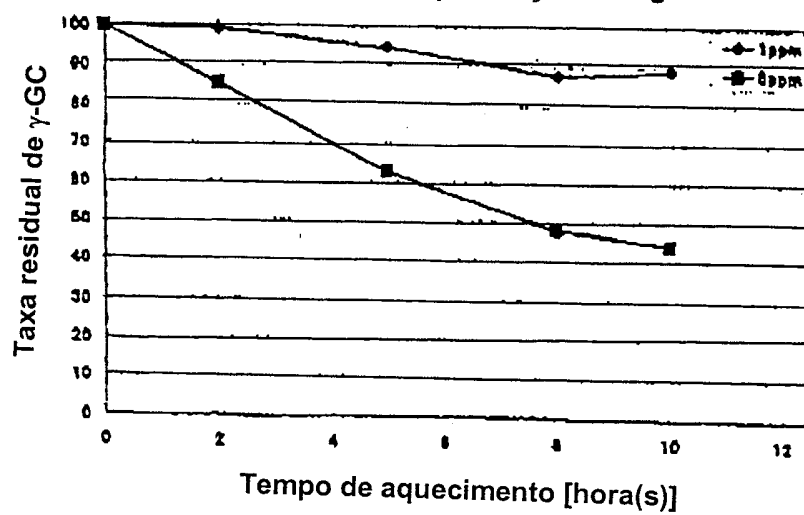
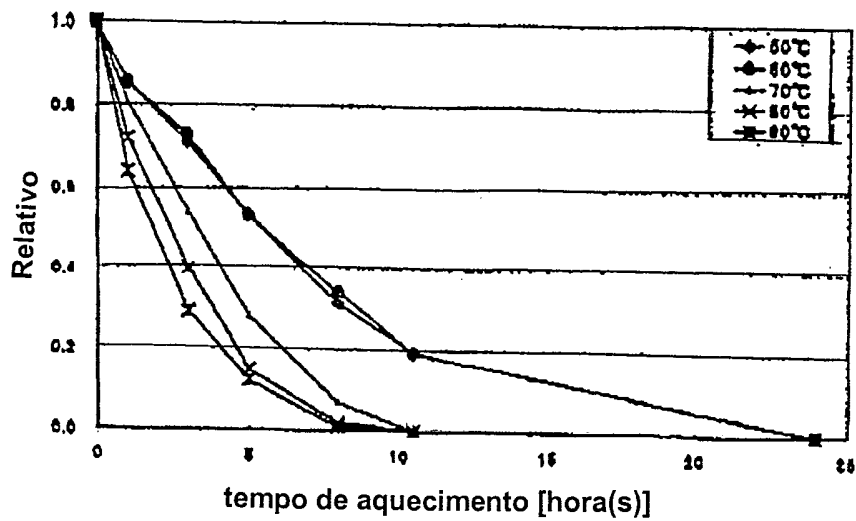


FIGURA6A

Reação de decomposição de γ -GC no caso de 3 % em DM

(a) Mudanças na decomposição de γ -GC com um lapso de tempo no caso de 3 % em DM



(b) Gráficos de Arrhenius no caso de 3 % em DM

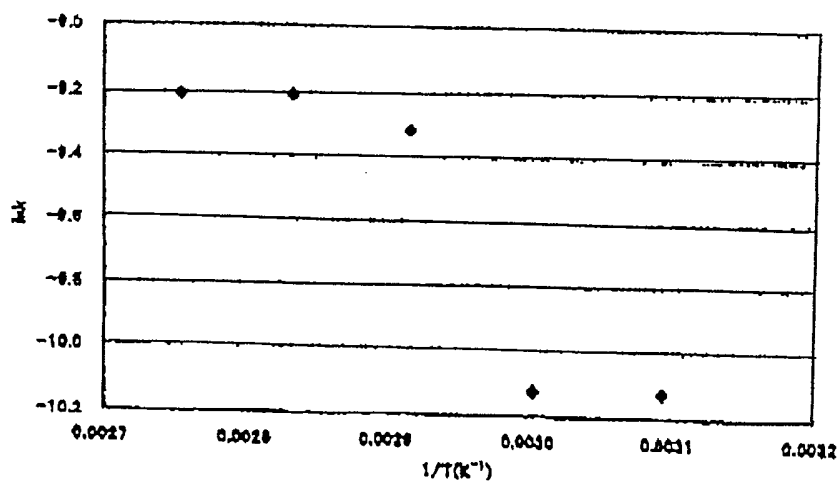
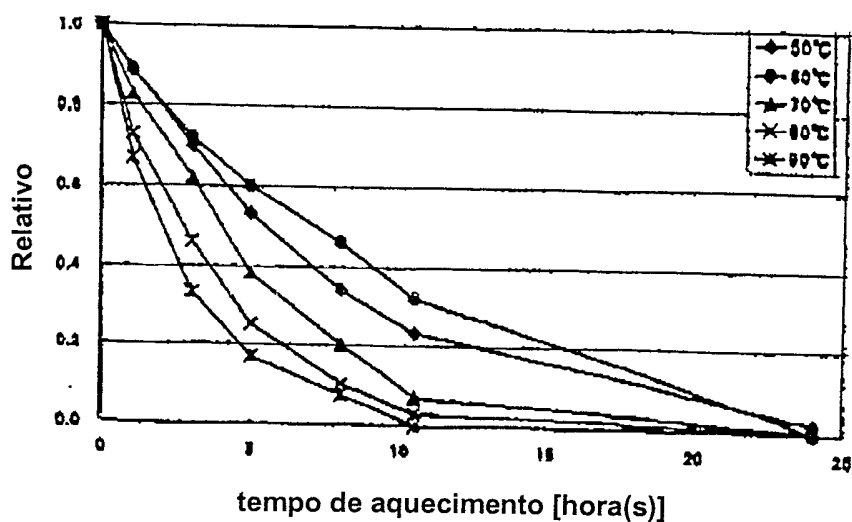


FIGURA 6B

Reação de decomposição de γ -GC no caso de 5% em DM

(a) Mudanças na decomposição de γ -GC com um lapso de tempo no caso de 5 % em DM



(b) Gráficos de Arrhenius no caso de 5 % em DM

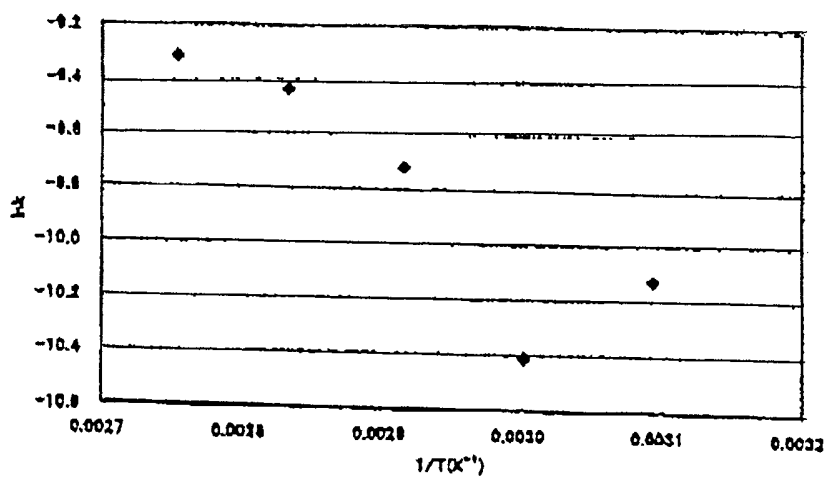
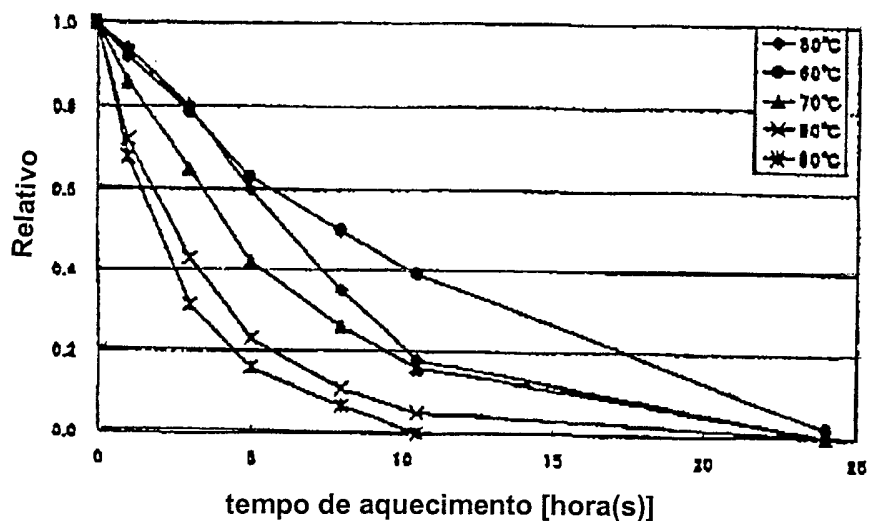


FIGURA 6C

Reação de decomposição de γ -GC no caso de 8 % em DM

(a) Mudanças na decomposição de γ -GC com um lapso de tempo no caso de 8 % em DM



(b) Gráficos de Arrhenius no caso de 8 % em DM

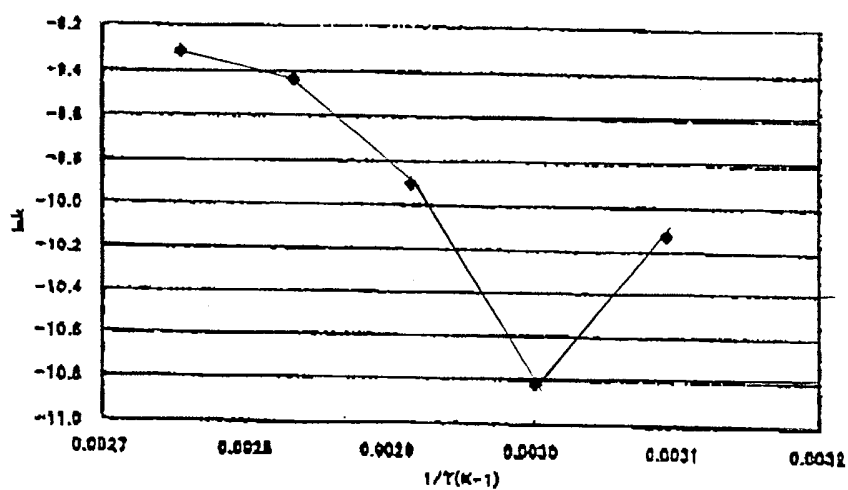
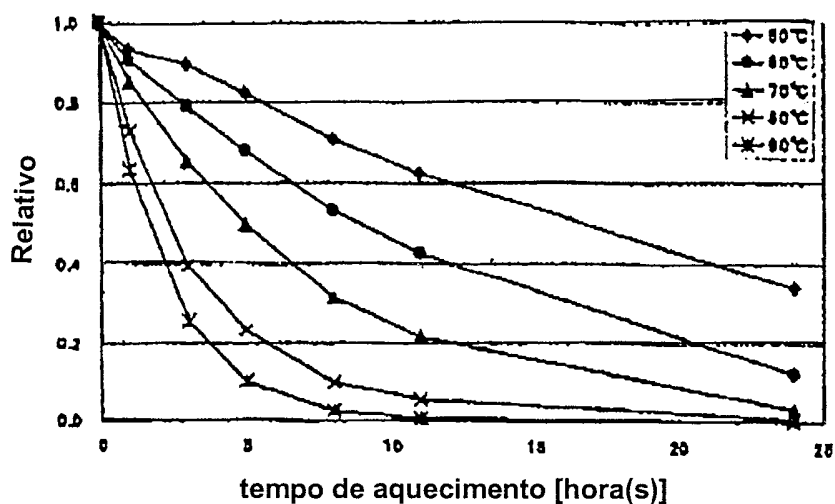


FIGURA 6D

Reação de decomposição de γ -GC no caso de 10 % em DM

(a) Mudanças na decomposição de γ -GC
com um lapso de tempo no caso de 10 % em DM



(b) Gráficos de Arrhenius no caso de 10 % em DM

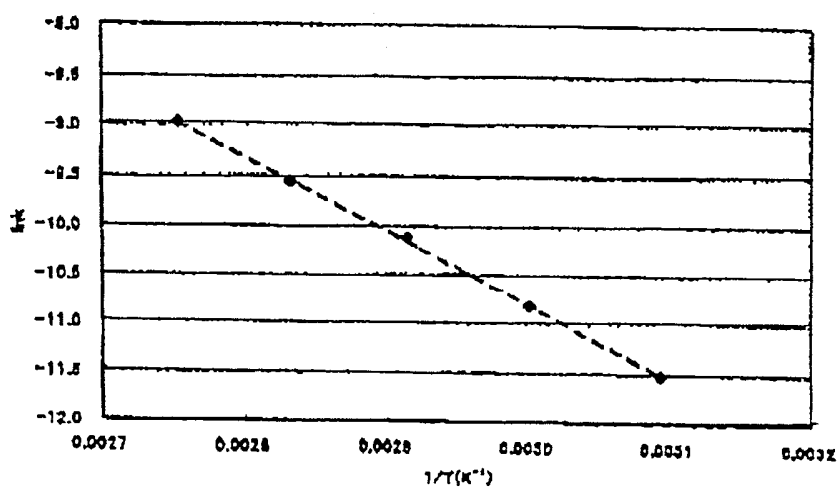
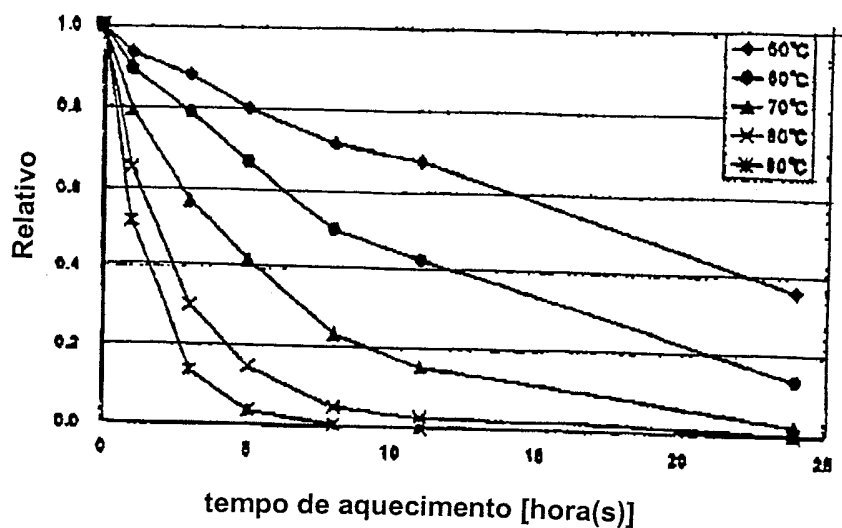


FIGURA 6E

Reação de decomposição de γ -GC no caso de 20 % em DM

(a) Mudanças na decomposição de γ -GC com um lapso de tempo no caso de 20 % em DM



(b) Gráficos de Arrhenius no caso de 20% em DM

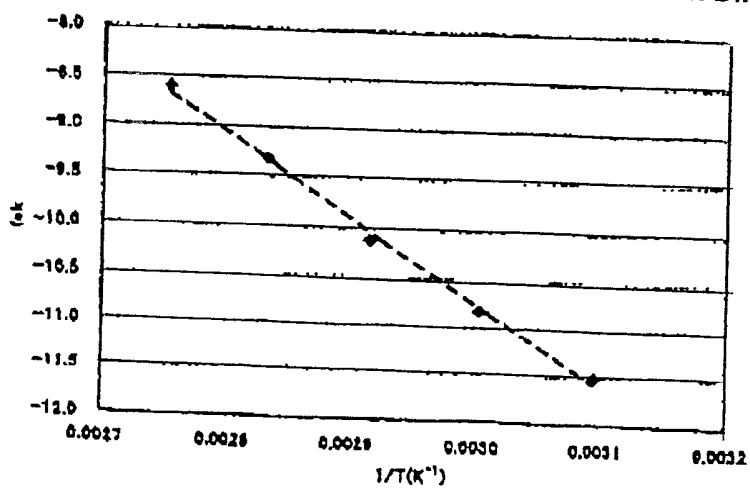
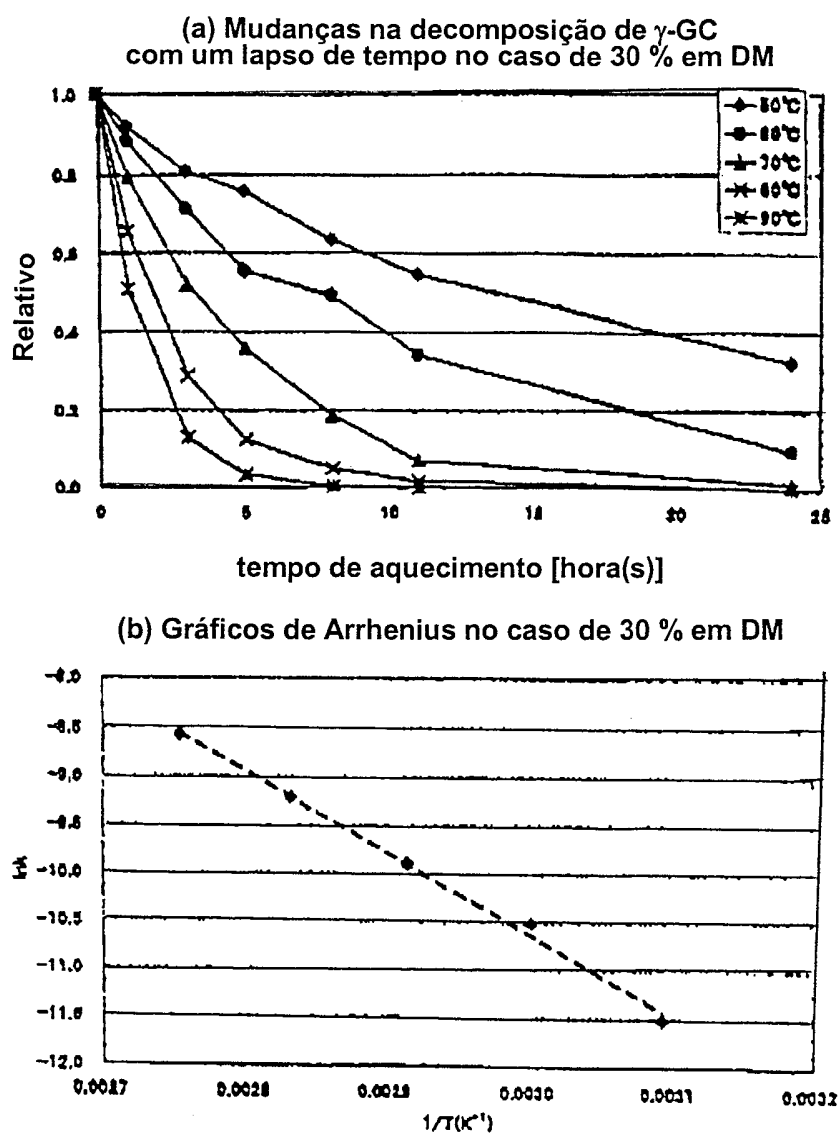


FIGURA 6F

Reação de decomposição de γ -GC no caso de 30 % em DM



RESUMO

“MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM MATERIAL ALIMENTÍCIO CONTENDO UMA ALTA QUANTIDADE DE CISTEÍNA”

5 A questão a ser solucionada é estabelecer um método pelo qual a cisteína seja suscetível de ser eficientemente preparada da γ -GC e, também, estabelecer um método excelente para a produção de um material alimentício que contenha uma alta quantidade de cisteína de extrato de levedura.

10 Um método para a produção de um material alimentício contendo uma alta quantidade de cisteína, caracterizado em que um extrato de levedura é preparado de células de levedura contendo γ -glutamilcisteína, o extrato é concentrado mediante controle na temperatura tão baixa quanto não mais do que 60°C para preparar um material alimentício em uma forma líquida, em que a concentração de sólidos seja não menor que 10% e o material alimentício seja mantido em 70 a 130°C.