



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0922088-7 B1

(22) Data do Depósito: 30/10/2009

(45) Data de Concessão: 09/01/2024

(54) Título: MÉTODOS PARA CULTIVAR UMA LEVEDURA, E PARA PRODUZIR UMA LEVEDURA, LEVEDURA, EXTRATO DE LEVEDURA, COMPOSIÇÃO DE TEMPERO, E, ALIMENTO OU BEBIDA

(51) Int.Cl.: A23L 27/22; A23L 33/14; A23L 33/145; A23L 2/56; A23L 33/175; (...).

(30) Prioridade Unionista: 18/11/2008 JP 2008-294642; 19/05/2009 JP pct/jp2009/059206.

(73) Titular(es): ASAHI GROUP HOLDINGS, LTD..

(72) Inventor(es): ICHIRO SHIBUYA; HIROAKI OKANO; YOSHITOMO KANAOKA; NOBUCHIKA TAKESUE.

(86) Pedido PCT: PCT JP2009005802 de 30/10/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/058527 de 27/05/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/05/2011

(57) Resumo: MÉTODOS PARA CULTIVAR UMA LEVEDURA, E PARA PRODUZIR UMA LEVEDURA, LEVEDURA, EXTRATO DE LEVEDURA, COMPOSIÇÃO DE TEMPERO, E, ALIMENTO OU BEBIDA. É fornecido um método para produzir levedura contendo ácido glutâmico em uma concentração alta. Em um método para cultivar levedura, levedura em fase de crescimento estacionária é submetida à cultura líquida sob condições nas quais o pH de um meio líquido é 7,5 ou mais elevado e menor do que 11. Após o pH do meio líquido para a levedura em fase de crescimento estacionária ser ajustado para 7,5 ou maior e menor do que 11, a levedura é adicionalmente cultivada, por intermédio do qual a levedura com teor alto de ácido glutâmico pode ser produzida. Na invenção, como a levedura, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Candida utilis* pode ser utilizada. Portanto, pelo uso de levedura com teor alto de ácido glutâmico obtida pelo dito método acima e um extrato obtido pela extração de levedura, podem ser obtidos uma composição de tempero e um alimento ou uma bebida com teor alto de ácido glutâmico.

“MÉTODOS PARA CULTIVAR UMA LEVEDURA, E PARA PRODUZIR UMA LEVEDURA, LEVEDURA, EXTRATO DE LEVEDURA, COMPOSIÇÃO DE TEMPERO, E, ALIMENTO OU BEBIDA”

Campo Técnico

5 A presente invenção refere-se a um método para produzir uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico, uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico, um extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico, e um alimento ou uma bebida contendo um extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico.

10 Este pedido é baseado em e reivindica prioridade ao Pedido de Patente Japonesa de Nº 2008-294642 depositado aos 18 de Novembro de 2008 e ao PCT/JP2009/059206 depositado aos 19 de Maio de 2009, cujas revelações são aqui incorporadas como referências.

Arte Anterior

15 Há correntemente uma demanda mundial por um tempero não-artificial, natural e orientado para a saúde sem o uso de aditivos, conforme orientado por Japão e países desenvolvidos incluindo países europeus e os E.U.A. Em relação a esta demanda, embora um extrato adicionado de valor alto com "umami" intensificado tal como ácido nucleico tenha sido
20 desenvolvido na indústria de extrato de levedura, desenvolvimento também está progredindo para aminoácidos, tal como ácido glutâmico, que é um representante de "umami" equivalente a ácido nucleico.

Ácido glutâmico tem sido amplamente usado há longo tempo na forma de glutamato de sódio como um tempero químico ou semelhante.
25 Recentemente, preferência tem sido demonstrada pela utilização de uma cultura ou de um extrato ou semelhante, que é obtida(o) pela cultura de levedura naturalmente contendo ácido glutâmico, em um alimento ou uma bebida.

Por exemplo, PTL (Literatura de Patente) 1 descreve um

agente melhorador de doçura contendo um extrato de levedura como um componente ativo, sendo que o extrato de levedura contém 5'-inosinato de sódio e/ou 5'-adenilato de sódio, 5'-guanilato de sódio, 5'-uridilato de sódio e 5'-citidilato de sódio em uma concentração de 1% a 15%, respectivamente, e 5 glutamato de sódio em uma concentração de 1% a 20%.

PTL 2 descreve um método para produzir um extrato de levedura contendo pelo menos 3% de ácido glutâmico derivado de glutamina livre intracelular em relação aos sólidos do extrato, que inclui uma etapa de digerir uma levedura contendo 15 mg ou mais de glutamina livre por 1 g de 10 biomassa livre.

PTL 3 descreve um extrato de levedura obtido por digestão ou decomposição de uma levedura, sendo que quando o extrato de levedura é permitido passar através de uma membrana de filtro tendo um diâmetro de 1 15 µm e o permeato é submetido à filtração em gel, e quando peptídeos no efluente fracionado são detectados por espectrofotometria de absorção a 220 nm, uma porção de peptídeos tendo um peso molecular de 10.000 ou maior é 10% ou mais alta baseado na quantidade total de todos os peptídeos detectados.

PTL 4 descreve um extrato de levedura com um teor alto de 20 ácido glutâmico, que contém 13% em peso ou mais de ácido L-glutâmico (como um sal de Na).

PTL 5 descreve um extrato de levedura no qual o teor de aminoácido livre é 25% em peso ou maior, e o teor total de componentes gustativos baseados em ácido é 2% em peso ou maior.

25 PTL 6 descreve uma composição de tempero contendo substâncias gustativas livres de ácido nucleico, ácido glutâmico, potássio e ácido láctico, lactato de sódio ou lactato de potássio, sendo que uma proporção molar de substância gustativa baseada em ácido nucleico: ácido glutâmico está dentro da faixa de 1:2 a 40, e uma proporção molar de (substâncias

gustativas livres de ácido nucleico + ácido glutâmico): potássio: (ácido lático, lactato de sódio ou lactato de potássio) está dentro da faixa de 1:5 a 80:10 a 80.

PTL 7 descreve a levedura que é resistente a um inibidor de crescimento antagonístico de ácido glutâmico e acumula ácido glutâmico em biomassa.

PTL 8 descreve um método para produzir um extrato de levedura, que usa *Yarrowia lipolytica*, uma levedura tendo resistência à Nystatin, uma droga que obstrui a estrutura e a função da membrana celular, e que tem uma capacidade para acumular 530 mg/L ou mais ácido L-glutâmico em biomassa.

Literatura da Arte Relacionada

Literatura de Patente

[PTL 1]: Patente Japonesa de Nº 3088709

15 [PTL 2]: JP-A Nº 2002-171961

[PTL 3]: JP-A Nº 2005-102549

[PTL 4]: JP-A Nº 2006-129835

[PTL 5]: JP-A Nº 2007-49989

[PTL 6]: JP-A Nº H05-227911

20 [PTL 7]: JP-A Nº H09-294581

[PTL 8]: Patente Japonesa de Nº 3896606

Sumário da Invenção

Problema Técnico

Contudo, o método da arte relacionada frequentemente sofre de complexidade de operação tal como uma necessidade de tratamento de decomposição incluindo tratamento por hidrólise ácida (HVP). Ademais, o teor de ácido glutâmico livre de extratos de levedura correntemente comercialmente disponíveis é tipicamente cerca de 10%, assim há uma necessidade de um método de produção de um extrato de levedura com uma

concentração mais alta de ácido glutâmico.

PTL 1 descreve um extrato de levedura contendo glutamato de sódio em uma concentração de 1% a 20%. Contudo, extrato de levedura como um produto comercial contém glutamato de sódio em uma concentração de 5,0%, que é praticamente usada, e não há revelação de um produto de extrato de levedura contendo 5,0% ou mais de glutamato de sódio.

PTL 2 sofre de complexidade de operação devido à realização de manipulação genética, e segurança insatisfatória, palatabilidade insatisfatória ou semelhante em termos de alimento.

PTL 3 descreve contendo 10% ou mais de glutamato de sódio (soda) por sólidos, mas não há revelação de Exemplos de Trabalho especificamente mostrando isto.

PTL 4 sofre de complexidade de operação tal como tratamento enzimático.

PTL 5 sofre de complexidade de operação tal como o uso de enzimas bem como de apenas cerca de 13% de ácido glutâmico por pó seco.

PTL 6 é meramente adição externa de ácido glutâmico.

PTL 7 sofre de um teor baixo de ácido glutâmico por peso seco de biomassa.

PTL 8 sofre de complexidade de operação tal como fornece resistência à droga a uma cepa parental.

A presente invenção tem sido feita tendo em vista a situação acima, e um objetivo da presente invenção é fornecer um método para produzir uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico, que contém uma concentração mais alta de ácido glutâmico, particularmente ácido glutâmico livre, em comparação com a arte relacionada, uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico, um extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico, e um alimento ou uma bebida contendo ácido glutâmico.

Solução do Problema

Como um resultado de estudos intensivos para alcançar o objetivo, os inventores da presente invenção descobriram que um teor de ácido glutâmico em levedura, particularmente um teor de ácido glutâmico livre é aumentado pela elevação de um pH de uma solução de cultura para um pH específico (deslocamento para uma faixa alcalina) durante a cultura de uma levedura em uma fase de crescimento estacionária. Em adição, os inventores da presente invenção descobriram que um extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico pode ser produzido pela preparação de um extrato de levedura usando esta levedura. A presente invenção tem sido completada baseado nestas descobertas. Isto é, a presente invenção adota as seguintes configurações.

(1) Um método para cultivar levedura, incluindo uma etapa de submeter uma levedura em uma fase de crescimento estacionária à cultura líquida sob as condições nas quais o pH de um meio líquido é 7,5 ou maior ou menor do que 11.

(2) O método para cultivar uma levedura de acordo com (1), no qual a etapa de cultura líquida inclui:

uma etapa de ajustar o pH de um meio líquido para 7,5 ou maior ou menor do que 11 após o crescimento de uma levedura entrar em uma fase estacionária; e

uma etapa de adicionalmente cultivar a levedura dentro da mesma faixa de pH.

(3) O método para cultivar uma levedura de acordo com (2), no qual a etapa de ajustar o pH de um meio líquido para 7,5 ou maior ou menor do que 11 é uma etapa de adicionar uma substância alcalina no meio líquido.

(4) O método para cultivar uma levedura de acordo com (1), no qual, na etapa de cultura líquida, uma porção da levedura cultivada é recuperada e o teor de ácido glutâmico livre na levedura é intermitentemente

medido.

(5) O método para cultivar uma levedura de acordo com qualquer um de (1) a (4), no qual a levedura é *Saccharomyces cerevisiae* ou *Candida utilis*.

5 (6) Um método de produzir uma levedura, compreendendo uma etapa de recuperar levedura cultivada pelo método de cultura de acordo com qualquer um de (1) a (5).

10 (7) Uma levedura obtida pelo método de cultura de levedura de acordo com qualquer um de (1) a (5) ou obtida pelo método de produção de acordo com (6).

(8) A levedura de acordo com (7), na qual o teor de ácido glutâmico livre é de 2,3% em peso a 10,0% em peso por biomassa de levedura seca.

15 (9) A levedura de acordo com (8), na qual o teor de ácido glutâmico livre é de 4,0% em peso a 10,0% em peso por biomassa de levedura seca.

(10) Um extrato de levedura obtido pela extração da levedura de acordo com (7).

20 (11) O extrato de levedura de acordo com (10), no qual o teor de ácido glutâmico livre no extrato de levedura é de 7% em peso a 35% em peso por peso seco.

(12) O extrato de levedura de acordo com (11), no qual o teor de ácido glutâmico livre no extrato de levedura é de 20% em peso a 35% em peso por peso seco.

25 (13) Um extrato de levedura com um teor de ácido glutâmico livre de 20% em peso a 35% em peso por peso seco.

(14) Uma levedura com um teor de ácido glutâmico livre de 4,0% em peso a 10,0% em peso por biomassa de levedura seca.

(15) Uma composição de temporo compreendendo o extrato de

levedura de acordo com qualquer um de (10) a (13).

(16) Um alimento ou uma bebida compreendendo a levedura de acordo com qualquer um de (7) a (9) e (14), o extrato de levedura de acordo com qualquer um de (10) a (13), ou a composição de tempero de acordo com (15).

Realizações Vantajosas da invenção

Por intermédio do método de produzir uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico de acordo com a presente invenção, uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico na qual o teor de ácido glutâmico, particularmente o teor de ácido glutâmico livre está significativamente aumentado pode ser convenientemente produzida por mero deslocamento do pH de um meio líquido para uma levedura em uma fase de crescimento estacionária para uma faixa alcalina.

Pela realização de uma operação de extração de uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico de acordo com a presente invenção, é obtido um extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico contendo ácido glutâmico, particularmente ácido glutâmico livre em uma concentração alta.

Descrição Breve das Figuras

FIG. 1 é uma curva mostrando um aumento em contagem bacteriana versus tempo de cultura em Exemplo 2.

FIG. 2 é uma curva mostrando um aumento em peso de biomassa de levedura seca versus tempo de cultura em Exemplo 2.

FIG. 3 mostra mudanças no pH de um meio líquido versus tempo de cultura em Exemplo 2.

Descrição das Modalidades

O método de cultura de uma levedura de acordo com a presente invenção inclui uma etapa de submeter uma levedura em uma fase de crescimento estacionária à cultura líquida sob as condições nas quais o pH de

um meio líquido é 7,5 ou maior ou menor do que 11. Pela realização deste método de cultura, é possível obter uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico.

5 Doravante, serão descritas em detalhe as modalidades da presente invenção.

A levedura é qualquer levedura desde que seja um fungo unicelular. Exemplos específicos da levedura incluem fungos pertencendo ao gênero *Saccharomyces*, fungos pertencendo ao gênero *Shizosaccharomyces*, fungos pertencendo ao gênero *Pichia*, fungos pertencendo ao gênero *Candida*, 10 fungos pertencendo ao gênero *Kluyveromyces*, fungos pertencendo ao gênero *Williopsis*, fungos pertencendo ao gênero *Debaryomyces*, fungos pertencendo ao gênero *Galactomyces*, fungos pertencendo ao gênero *Torulaspora*, fungos pertencendo ao gênero *Rhodotorula*, fungos pertencendo ao gênero *Yarrowia*, e fungos pertencendo ao gênero *Zygosaccharomyces*.

15 Dentre estas, do ponto de vista de edibilidade, são preferíveis *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica*, *Candida utilis*, *Candida sake*, *Saccharomyces cerevisiae* ou semelhantes, e é comumente usada *Saccharomyces cerevisiae* ou é mais preferível *Candida utilis*.

Para aplicação prática da presente invenção, a levedura é 20 cultivada até uma fase estacionária em um meio líquido contendo uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, um sal inorgânico, e semelhante, e a levedura é então submetida à cultura líquida sob as condições nas quais o pH de um meio líquido para a levedura em uma fase de crescimento estacionária é 7,5 ou maior e menor do que 11.

25 A composição do meio para estas cepas fúngicas não é particularmente limitado, e pode utilizar uma composição de meio usada no método estabelecido. Por exemplo, um ou dois ou mais tipos selecionados do grupo consistindo de glicose, sacarose, ácido acético, etanol, melaço, licor residual de polpa de ácido sulfuroso, e semelhante usados em cultura

convencional de microorganismos são utilizados como uma fonte de carbono. Um ou dois ou mais tipos selecionados do grupo consistindo de um sal inorgânico tais como uréia, amônio, sulfato de amônio, cloreto de amônio ou fosfato de amônio e uma substância orgânica contendo nitrogênio tal como licor de macerado de milho (CSL), caseína, extrato de levedura ou peptona são usados como uma fonte de nitrogênio. Em adição, um componente ácido fosfórico, um componente potássio, ou um componente magnésio podem ser adicionados no meio. Para o propósito disto, é utilizada uma matéria-prima industrial convencional, tal como superfosfato de cálcio, fosfato de amônio, cloreto de potássio, hidróxido de potássio, sulfato de magnésio ou cloreto de magnésio. Ademais, um sal inorgânico também pode ser usado tal como íons de zinco, de cobre, de manganês ou de ferro. Em adição, vitaminas, substâncias relacionadas a ácido nucleico ou semelhante podem ser adicionadas.

O modo de cultura pode ser de qualquer um de cultura em batelada, cultura alimentada e cultura contínua. Contudo, cultura alimentada ou cultura contínua é adotada a partir de um ponto de vista industrial.

As condições de cultura em uma fase de crescimento logarítmica ou as condições de cultura antes do ajuste de pH podem seguir as condições de cultura comuns de levedura. Por exemplo, a temperatura está dentro da faixa de 20°C a 40°C, preferivelmente 25°C a 35°C, e o pH está dentro da faixa de 3,5 a 7,5, particularmente preferivelmente 4,0 a 6,0. Em adição, condições aeróbicas são preferíveis.

Ademais, a cultura é preferivelmente realizada enquanto aeração ou agitação são ocasionadas. Volume de aeração e condições de agitação podem ser apropriadamente determinados considerando-se o volume de cultura e o tempo de cultura e uma concentração fúngica inicial. Por exemplo, aeração pode ser realizada a cerca de 0,2 V.V.M. a 2 V.V.M. (Volume por volume por minutos), e agitação pode ser conduzida a cerca de

50 rpm a 800 rpm.

O método de cultura líquida de uma levedura em uma fase de crescimento estacionária sob as condições nas quais o pH de um meio líquido é 7,5 ou maior ou menor do que 11 não é particularmente limitado. Exemplos 5 do método de ajuste de um pH incluem um método de ajuste do pH de um meio líquido para 7,5 ou maior ou menor do que 11 quando a levedura cultivada entra em uma fase estacionária, um método de ajuste de um pH pela adição de uma substância alcalina em um meio líquido, e um método de sujeição de um meio líquido ao deslocamento alcalino pela adição de uréia ou 10 semelhante antecipadamente no meio, de modo que um pH naturalmente se torne 7,5 ou maior ou menor do que 11 à medida que passa o tempo de cultura.

A quantidade de uma substância alcalina adicionada no meio não é limitada desde que um pH esteja dentro da faixa especificada acima. Do 15 ponto de vista de diluição do meio não excessivamente, e não tendo efeitos adversos sobre a produção de ácido glutâmico durante a cultura subsequente, a quantidade de uma substância alcalina é preferivelmente 5% ou menor em relação ao meio. Por exemplo, a quantidade de uréia como uma substância alcalina não é particularmente limitada e depende de uma concentração de 20 biomassa de levedura a ser cultivada, mas está preferivelmente dentro da faixa de cerca de 0,5% a 5% em relação ao meio.

O método de ajuste do pH de um meio líquido para 7,5 ou maior ou menor do que 11 quando a levedura cultivada entra em uma fase estacionária não é particularmente limitado. Por exemplo, uma substância 25 alcalina é apropriadamente adicionada de tal modo que o pH de um meio líquido seja ajustado para 7,5 ou maior ou menor do que 11, e preferivelmente 7,5 ou maior e 10 ou menor.

O ajuste de pH pode ser realizado em qualquer momento desde que a levedura esteja em uma fase estacionaria, mas é preferivelmente

realizado imediatamente após a levedura entrar em uma fase estacionária. Isto é porque uma concentração de ácido glutâmico livre em levedura pode ser suficientemente intensificada e o tempo exigido para a completitude do processo total pode ser reduzido. Se o pH de um meio líquido para uma levedura em uma fase de crescimento logarítmico for ajustado para 7,5 ou maior ou menor do que 11, o crescimento da levedura será inibido e o teor de ácido glutâmico livre na levedura não será aumentado, portanto, isto não é preferível.

Ademais, quando uma levedura sob cultura se desloca para uma fase estacionária a partir de uma fase de crescimento logarítmica, a levedura gradualmente desloca-se de um estado de crescimento logarítmico para um estado estacionário e então entra completamente no estado estacionário, mas o tempo de gradualmente se aproximar do estado estacionário completo quando a levedura completamente alcança o estado estacionário a partir da fase de crescimento logarítmica também está incluído na fase estacionária da presente invenção.

A substância alcalina não é particularmente limitada e seus exemplos incluem os seguintes componentes.

Estes incluem um álcali inorgânico tal como NH₄OH (amônia aquosa), gás amônia, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio ou hidróxido de magnésio, uma base alcalina tal como carbonato de sódio ou carbonato de potássio, um álcali orgânico tal como uréia, e semelhante.

Dentre estes, amônia aquosa, gás amônia ou uréia é preferível.

Quando uma levedura em uma fase estacionária é cultivada em um meio líquido com um pH de 7,5 ou maior ou menor do que 11, a temperatura e outras condições podem seguir as condições de cultura comuns de levedura. Por exemplo, a temperatura está dentro da faixa de 20°C a 40°C, preferivelmente 25°C a 35°C. O tempo de cultura é preferivelmente

imediatamente após o ajuste de pH de 24 horas, mais preferivelmente de 1 hora a 15 horas, ainda mais preferivelmente 3 horas a 12 horas, e particularmente preferivelmente 3 horas a 6 horas.

O teor de ácido glutâmico livre em levedura após deslocamento para um pH para 7,5 ou maior ou menor do que 11 tende a aumentar no decorrer do tempo de cultura, e após alcançar o pico, tende a decrescer. Em adição, o teor de ácido glutâmico livre em levedura depende das condições tais como a concentração de biomassa de levedura a ser cultivada, o pH, e a temperatura. Isto é criado devido ao fato de que cultura excessivamente longa sob condições alcalinas resulta em efeitos excessivamente intensos de álcali sobre levedura. Portanto, a presente invenção está configurada de tal modo que uma porção da levedura cultivada é recuperada após o deslocamento de pH e o teor de ácido glutâmico livre em levedura é intermitentemente medido, preferivelmente em intervalos de tempo regulares, embora o tempo ótimo de cultura possa ser apropriadamente selecionado para cada conjunto de condições de cultura, particularmente cada pH após o deslocamento alcalino.

Isto é, foi confirmado que uma levedura com teor de ácido glutâmico livre muito alto, ou seja, um teor de ácido glutâmico livre de 2,3% em peso a 10,0% em peso por peso de biomassa de levedura seca, pode ser obtida pela completitude da cultura no pico e recuperação da levedura. Quando se cultiva e se produz sob condições mais preferíveis, pode ser obtida uma levedura contendo ácido glutâmico livre dentro da faixa de 4,0% em peso a 10,0% em peso por peso de biomassa de levedura seca. Em adição, foi confirmado que um extrato de levedura com um teor muito alto de ácido glutâmico em uma extensão que não tem sido relatada pela arte relacionada, ou seja, um teor de ácido glutâmico livre de 20% em peso a 35% em peso por peso seco, pode ser obtido pela preparação de um extrato de levedura usando uma levedura no pico.

Como descrito acima, de acordo com o método de produção da presente invenção, uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico livre pode ser cultivada, e uma levedura com um teor muito alto de ácido glutâmico livre pode ser produzida pela recuperação apropriada da levedura cultivada.

5 Portanto, um extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico livre pode ser preparado a partir da levedura obtida. Ademais, não é preciso dizer que a levedura, o extrato de levedura ou semelhante da presente invenção é alto em teor de ácidos glutâmicos totais bem como em teor de ácido glutâmico livre.

10 Por exemplo, PTL 1 ou semelhante descreve um extrato de levedura contendo 20% em peso de ácido glutâmico em termos de glutamato de sódio (massa molecular de cerca de 169), que corresponde a não mais do que cerca de 17% em peso em termos do teor de ácido glutâmico (massa molecular de cerca de 147). Também é óbvio deste ponto que a levedura obtida pelo método de produção da presente invenção é uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico que não tem sido relatada pela arte relacionada.

15 Na presente invenção, o termo “teor de ácido glutâmico livre por biomassa de levedura seca” significa uma porção (% em peso) de ácido glutâmico livre contida nos sólidos obtidos pela secagem da biomassa de levedura. Em adição, o termo “teor de ácido glutâmico livre por peso seco de extrato de levedura” significa uma porção (% em peso) de ácido glutâmico livre contida em sólidos obtidos pela secagem de extrato de levedura.

O teor de ácido glutâmico livre em biomassa de levedura ou em extrato de levedura é medido usando, por exemplo, um biossensor BF-5 fabricado por Oji Scientific Instruments. Este aparelho é um aparelho que quantifica ácido glutâmico em uma solução, usando um eletrodo de enzima que é especificamente reativo ao ácido glutâmico, e o presente eletrodo de enzima não é reativo ao ácido glutâmico em uma proteína ou um peptídeo. Portanto, é possível seletivamente quantificar apenas o, ácido glutâmico livre

pela utilização de um tal aparelho.

Em adição, o teor de ácido glutâmico livre pode ser medido por um analisador automático de aminoácido JLC-500/V fabricado por JEOL Ltd., um analisador Acquity UPLC fabricado por Waters Corporation (USA), 5 ou semelhante, mas o aparelho de análise não é particularmente limitado.

O método da presente invenção permite a produção de uma levedura contendo muito ácido glutâmico, particularmente ácido glutâmico livre em biomassa. A levedura assim obtida com um teor alto de ácido glutâmico de acordo com a presente invenção pode conter 2,3% em peso ou 10 maior, preferivelmente 2,3% em peso a 9,1% em peso, e mais preferivelmente 4,0% em peso a 9,1% em peso de ácido glutâmico livre em biomassa de levedura seca. Por exemplo, uma levedura contendo 2,3% em peso a 7,4% em peso, mais preferivelmente 4,0% em peso a 7,4% em peso de ácido glutâmico livre em biomassa de levedura seca pode ser obtida.

15 Portanto, um extrato de levedura contendo muito ácido glutâmico livre que é um componente gustativo favorável pode ser convenientemente obtido pelas extração e preparação de um extrato de levedura a partir da levedura.

A levedura com um teor alto de ácido glutâmico produzida 20 pelo método da presente invenção é alta em teor de aminoácido livre e também é alta em teor de ácido glutâmico livre. Por exemplo, um extrato de levedura contendo 7% em peso ou mais, preferivelmente 7% em peso a 35% em peso, mais preferivelmente 12% em peso a 35% em peso, e ainda mais preferivelmente 20% em peso a 35% em peso de ácido glutâmico livre 25 derivado de biomassa de levedura por peso seco no extrato de levedura pode ser obtido pela preparação de um extrato de levedura usando uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico de acordo com a presente invenção. Por exemplo, um extrato de levedura contendo 7% em peso a 30% em peso, mais preferivelmente 12% em peso a 30% em peso, ainda mais preferivelmente

20% em peso a 30% em peso de ácido glutâmico livre também pode ser obtido. Ademais, um extrato de levedura contendo mais do que 30% em peso e 35% em peso ou menos de ácido glutâmico livre também pode ser obtido.

Conformemente, o extrato de levedura obtido pela presente invenção exibe uma propriedade gustativa muito alta e permite a produção de um alimento ou de uma bebida tendo uma profundidade de sabor e uma riqueza por intermédio de sua aplicação em um alimento ou uma bebida.

Ademais, a presente invenção permite a produção de uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico por um processo conveniente de meramente realizar o deslocamento alcalino de um meio líquido. Ademais, como descrito acima, o meio usado não é necessariamente um especial, e pode ser preparado usando uma matéria-prima barata tal como amônia.

Convencionalmente, o teor de ácido glutâmico livre da levedura tem sido intensificado por meio de uma cepa mutante ou recombinante principalmente por intermédio de modificação de gene(s) (veja PTL 2, 7, 8, ou semelhante). Por outro lado, de acordo com o método da presente invenção, a cultura de uma levedura em uma fase estacionária sob condições alcalinas pode intensificar o teor de ácido glutâmico livre em levedura, sem modificação de gene(s). Isto é, a presente invenção é um método capaz de intensificar o teor de ácido glutâmico livre em levedura, sem modificação genética de rotas de metabolismo e de acúmulo de ácido glutâmico inerentes à levedura. Portanto, o uso do método da presente invenção pode significativamente intensificar o teor de ácido glutâmico livre em levedura naturalmente ocorrente, sem realização de um tratamento de modificação de gene que pode deteriorar a palatabilidade como um alimento ou uma bebida. Ademais, não é preciso dizer que a levedura fornecida ao método da presente invenção pode ser uma levedura naturalmente ocorrente (levedura sem tratamento de modificação artificial de gene) ou uma cepa mutante.

Embora uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico contendo uma concentração alta de ácido glutâmico em biomassa de levedura seja obtida de acordo com o método da presente invenção, uma fração contendo ácido glutâmico pode ser obtida de uma levedura com um teor alto 5 de ácido glutâmico.

Fracionamento da fração contendo ácido glutâmico de uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico pode ser realizado por qualquer método desde que seja um método que seja comumente realizado.

Ademais, um extrato de levedura com um teor alto de ácido 10 glutâmico pode ser preparado de uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico cultivada pelo método mencionado acima. Preparação do extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico pode ser realizada por qualquer método desde que seja um método que é comumente utilizado. Por exemplo, um método de autodigestão, um método de decomposição enzimática, um método 15 de decomposição ácida, um método de extração alcalina, um método de extração em água quente, ou semelhante pode ser usado. Ademais, geralmente, é considerado que virtualmente quase toda a quantidade de ácido glutâmico no extrato de levedura obtido apenas por um método de extração em água quente é ácido glutâmico livre, diferente do extrato de levedura obtido por um método de 20 reação enzimática tal como um método de autodigestão.

A levedura com um teor alto de ácido glutâmico de acordo com a presente invenção é rica em ácido glutâmico livre e como um resultado, um extrato de levedura tendo sabor favorável é produzido com extração de um extrato de levedura apenas por um tratamento com água quente.

Convencionalmente, para o propósito de intensificar um teor 25 de aminoácido gustativo tal como ácido glutâmico livre, um tratamento de hidrólise por meio de um ácido ou um álcali ou semelhante tem sido geralmente realizado usando proteína vegetal ou animal. Contudo, o hidrolisado de proteína tem um problema associado com a incorporação de

monocloro-propanóis (MCP) que são carcinógenos suspeitos.

Por outro lado, visto que uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico produzida pelo método da presente invenção é inherentemente alta em teor de ácido glutâmico livre, um extrato de levedura com um teor suficientemente alto de ácido glutâmico livre pode ser preparado mesmo sem um tratamento de decomposição por ácido ou álcali ou semelhante ou um tratamento enzimático após extração da levedura por um método de extração em água quente ou semelhante. Isto é, por intermédio do uso de uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico de acordo com a presente invenção, é 10 possível convenientemente preparar e um extrato de levedura que é excelente tanto em sabor quanto em segurança.

Ademais, um pó de extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico pode ser obtido por pulverização do extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico de acordo com a presente invenção, e um pó 15 de extrato de levedura contendo 7% em peso a 35% em peso de ácido glutâmico livre pode ser obtido por seleção apropriada de um fungo levedura.

Ademais, biomassa de levedura seca pode ser preparada a partir de uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico cultivada pelo método mencionado acima. A preparação de biomassa de levedura seca pode 20 ser realizada por qualquer método desde que seja um método que seja comumente utilizado. Um método de secagem por congelamento, um método de secagem por pulverização, um método de secagem em tambor, ou semelhante pode ser adotado a partir de um ponto de vista industrial.

Ademais, a levedura com um teor alto de ácido glutâmico, 25 biomassa de levedura seca da levedura, um extrato de levedura preparado a partir da levedura, ou o pó de extrato de levedura de acordo com a presente invenção podem ser formulados em uma composição de tempero. Ademais, a composição de tempero pode ser preparada apenas a partir do extrato de levedura ou semelhante de acordo com a presente invenção, ou

diferentemente pode conter outros componentes tais como estabilizador ou conservante, em adição ao extrato de levedura ou semelhante de acordo com a presente invenção. A composição de tempero pode ser apropriadamente usada em uma variedade de alimentos ou bebidas, analogamente a outras 5 composições de tempero.

Ademais, a presente invenção refere-se a uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico obtida pelo método mencionado acima, e um alimento ou uma bebida contendo um extrato de levedura com um teor alto de ácido glutâmico extraído da levedura com um teor alto de ácido glutâmico. 10 Pela incorporação de uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico ou semelhante de acordo com a presente invenção, é possível produzir eficientemente um alimento ou uma bebida contendo uma concentração alta de ácido glutâmico.

Um tal alimento ou uma tal bebida pode ser qualquer um(a) 15 desde que seja um alimento ou uma bebida no(a) qual um típica levedura seca, um extrato de levedura, ou uma composição de tempero contendo-os possa ser preparada(o). Seus exemplos incluem bebidas alcoólicas, bebidas frias, bebidas fermentadas, tempero, sopas, pão, e doces.

Com o propósito de produzir alimento ou bebida de acordo 20 com a presente invenção, no processo de produção de um alimento ou uma bebida, pode ser adicionada uma preparação obtida da levedura com um teor alto de ácido glutâmico, ou da fração de uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico. Em adição, como uma matéria-prima, pode ser usada como tal uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico.

25 Exemplo 1

Doravante, a presente invenção será descrita com mais detalhe com referência aos seguintes Exemplos, mas a presente invenção não é limitadas aos mesmos.

De acordo com o método apresentado a seguir <1> a <8>,

levedura (cepa AB9846 de *Saccharomyces cerevisiae*) foi cultivada, e extração de um extrato da solução de cultura de levedura e análise de ácido glutâmico foram realizadas.

<1> Pré-cultura

5 Dois meios cada um composto da seguinte composição foram preparados em um volume de 350 mL (frasco Erlenmeyer de 2 L com defletores).

(Composição do meio)

Melaço: 8%

Uréia: 0,6%

10 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0,16% (sulfato de amônio)

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 0,08% (hidrogeno-fosfato de diamônio)

(Método de preparação)

15 (1) 167 mL de melaço (teor de açúcar: 36%) foi misturado até um volume de 750 mL com água Milli-Q, e um volume de 350 mL/frasco foi aliquotado para frascos Erlenmeyer de 2 L equipado com defletores.

(2) Foi realizado um tratamento em autoclave (121°C, 15 minutos).

20 (3) Quando o meio foi usado, um 1/50 volume (cada 7 mL) de um líquido misturado de componente nitrogenado (x100) foi assepticamente adicionado em um meio consistindo de apenas melaço.

(Condições de cultura)

Temperatura de cultura: 30°C

Agitação: 160 rpm (rotativa)

Tempo de cultura: 24 horas

25 (Volume de inoculação: 300 mL)

<2> Cultura principal

Um meio composto da seguinte composição foi preparado em um volume de 2.000 mL (ajustado para ser 3 L quando a alimentação foi completada).

(Composição do meio)

0,18% de cloreto de amônio (3 L em termos de quando a alimentação foi completada): 5,3 g

5 0,04% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (hidrogeno-fosfato de diamônio, em termos de alimentação completada): 1,2 g

Subsequentemente, a cultura foi realizada sob as seguintes condições.

(Condições de cultura)

Temperatura de cultura: 30°C

10 Aeração: 3 L/min

Agitação: 600 rpm

controle de pH: controle do limite inferior: pH 5,0 (por amônia aquosa 10%), no controle do limite superior

Anti-espumante: solução de estoque de ADEKANATE

15 Meio de alimentação: melaço (teor de açúcar: 36%), volume: 800 mL (em frasco de meio de 1 L, finalmente 8%)

<3> Deslocamento de pH

A seguir, imediatamente após a levedura cultivada ter entrado na fase estacionária, um pH da solução da cultura foi deslocado para uma 20 faixa alcalina por NH₄OH aquoso (10%) (doravante, chamado de "deslocamento de pH") (ajustar para um pH de 7 a 11), e a levedura foi adicionalmente cultivada. A cultura de levedura foi terminada 48 horas após o início da cultura principal.

<4> Método de colheita de levedura

25 (1) A solução de cultura obtida pela cultura principal de levedura foi transferida para um tubo plástico de 50 mL de centrífuga (FALCON 2070), seguido por centrifugação (3.000 g, 20°C, 5 min, HP-26).

(2) O sobrenadante foi jogado fora e a pelota foi suspensa em 20 mL de água Milli-Q, seguido por centrifugação (3.000 g, 20°C, 5 min, HP-

26). Este procedimento foi repetido duas vezes.

(3) O sobrenadante foi jogado fora e a pelota foi suspensa em 20 mL de água Milli-Q.

<5> Medição de peso de biomassa de levedura seca

5 2 mL de uma suspensão de levedura foram adicionados em uma placa de alumínio pré-pesada (diâmetro de: 5 cm), seguido por secagem a 105°C por 4 horas.

O peso de pós-secagem (peso após a secagem de levedura) foi medido, e o peso de sólidos (peso de biomassa de levedura seca, unidade: 10 g/L) foi calculada de acordo com a seguinte equação (1).

Massa após a secagem de levedura - peso da placa de alumínio = peso de biomassa de levedura seca(1)

<6> Preparação de solução de extrato pelo método de extração em água quente

15 (1) A suspensão de levedura restante (cerca de 18 mL) foi centrifugada (3.000 g, 20°C, 5 min, HP-26).

(2) 1,5 mL da suspensão restante foram transferidos para um tubo Eppendorf que foi então transferido para um aquecedor de bloco, seguido por aquecimento a 80°C por 30 minutos (para preparar um extrato).

20 Alternativamente, o tubo contendo a suspensão pode ser sobreaquecido em um banho quente a 100°C por 10 minutos (para preparar um extrato).

(3) Então, o sobrenadante (solução de extrato) foi separado por centrifugação (6.000 g, 4°C, 5 minutos).

<7> Método de medição de teor de ácido glutâmico livre

25 Ácido glutâmico livre em 300 µL da solução de extrato foi quantificado pelo uso de um biossensor. De acordo com o método de medição usando um biossensor, é possível seletivamente quantificar apenas o ácido glutâmico livre na solução de extrato. Especificamente, a medição foi realizada para uma diluição da solução de extrato (apropriadamente 5 vezes

diluída) pelo uso de BF-5 fabricado por Oji Scientific Instruments, e soluções padrão 1 mM e 5 mM foram utilizadas na curva de calibração.

Os resultados obtidos para deslocamento para pH 7,00, 7,50, 8,00, 9,00, e 11,00 são apresentados em Tabela 1. Com respeito à faixa de pH 8,00 a 9,00, os resultados obtidos com um intervalo de mudança de um pH de 0,25 são apresentados em Tabela 2. Com respeito à faixa de pH 9,00 a 10,00, os resultados obtidos com um intervalo de mudança de um pH de 0,25 são apresentados em Tabela 3. Como demonstrado dos dados de contagem bacteriana e dos dados de peso de biomassa de levedura seca mostrados em Tabela 2, deslocamento de pH foi realizado após o crescimento de levedura ter entrado na fase estacionária.

[Tabela 1]

Ajuste de pH		Massa seca de biomassa de levedura (g/L)	Teor de ácido glutâmico (% em peso de biomassa de levedura seca)
	Imediatamente após a inoculação	1,3	1,6
7,0	Antes do deslocamento de pH	34,5	2,8
	6 horas após o deslocamento de pH	36,6	2,6
7,5	Antes do deslocamento de pH	35,8	2,4
	6 horas após o deslocamento de pH	35,2	2,7
8,0	Antes do deslocamento de pH	34,4	2,4
	6 horas após o deslocamento de pH	33,0	2,8
9,0	Antes do deslocamento de pH	38,3	2,2
	6 horas após o deslocamento de pH	36,7	5,3
11,0	Antes do deslocamento de pH	37,4	2,2
	6 horas após o deslocamento de pH	17,7	0,0

[Tabela 2]

Ajuste de pH		Contagem bacteriana ($\times 10^6$ células/mL)	Massa de biomassa de levedura seca (g/L)	Teor de ácido glutâmico (% em peso de biomassa de levedura seca)
8,00	Imediatamente após a inoculação	76	1,3	2,5
	Antes do deslocamento de pH	2160	29,5	1,7
	3 horas após o deslocamento de pH	2420	29,4	2,5
8,25	Imediatamente após a inoculação	79	1,0	2,3
	Antes do deslocamento de pH	1980	30,9	2,3
	3 horas após o deslocamento de pH	2140	30,3	3,4
8,50	Imediatamente após a inoculação	80	0,6	2,0
	Antes do deslocamento de pH	2460	30,2	2,0
	3 horas após o deslocamento de pH	2220	30,2	3,6
8,75	Imediatamente após a inoculação	88	1,0	3,1
	Antes do deslocamento de pH	2180	32,2	1,9
	3 horas após o deslocamento de pH	2740	32,4	4,1
9,00	Imediatamente após a inoculação	70	1,2	2,4
	Antes do deslocamento de pH	2500	32,3	1,8
	3 horas após o deslocamento de pH	2360	30,7	4,0

[Tabela 3]

Ajuste de pH		Massa de biomassa de levedura seca (g/L)	Teor de ácido glutâmico (% em peso de biomassa de levedura seca)
9,00	Imediatamente após a inoculação	1,2	1,3
	Antes do deslocamento de pH	36,7	2,3
	6 horas após o deslocamento de pH	35,1	5,7
9,25	Imediatamente após a inoculação	1,0	1,8
	Antes do deslocamento de pH	35,0	2,2
	6 horas após o deslocamento de pH	32,4	5,1
9,50	Imediatamente após a inoculação	1,1	1,3
	Antes do deslocamento de pH	35,4	2,9
	6 horas após o deslocamento de pH	34,2	3,7
9,75	Imediatamente após a inoculação	1,3	1,3
	Antes do deslocamento de pH	36,8	1,9
	6 horas após o deslocamento de pH	31,7	2,6
10,00	Imediatamente após a inoculação	1,1	1,2
	Antes do deslocamento de pH	37,6	2,0
	6 horas após o deslocamento de pH	33,1	2,3

Como mostrado Tabela 1, foi confirmado que o teor (% em peso) de ácido glutâmico livre na biomassa de levedura seca aumenta no ajuste de pH de 7,5 ou maior ou menor do que 11,0, antes do deslocamento de

pH e 6 horas após o deslocamento de pH. Particularmente, no ajuste de pH de 9,0, o teor de ácido glutâmico livre aumentou 2-vezes ou mais de 2,2% em peso a 5,3% em peso, como um resultado do deslocamento do pH, confirmando assim um aumento significativo no teor de ácido glutâmico livre.

Particularmente, quando o ajuste de pH (pH após o deslocamento de pH) está dentro da faixa de 8,00 a 9,00, foi confirmado, como mostrado em Tabela 2, que o ajuste de pH acarreta um aumento maior no teor (% em peso) de ácido glutâmico livre na biomassa de levedura seca como um resultado do deslocamento de pH.

Por outro lado, como mostrado em Tabela 3, quando o ajuste de pH está dentro da faixa de 9,00 a 10,00, foi confirmado que um aumento no teor (% em peso) de ácido glutâmico livre na biomassa de levedura seca como um resultado do deslocamento de pH foi mais significativo à medida que o ajuste de pH decresce. Particularmente, no ajuste de pH de 9,00, o teor de ácido glutâmico foi aumentado de 2,3% em peso para 5,7% em peso como um resultado do deslocamento de pH. Em adição, embora não mostrado na tabela, no ajuste de pH de 9,00, o teor de ácido glutâmico livre na biomassa de levedura seca foi 4,6% em peso 3 horas após o deslocamento de pH.

Em adição, dentre estas leveduras, foi confirmado que o extrato de levedura preparado usado a levedura após ser submetida ao deslocamento de pH dentro do ajuste de pH de 7,5 ou maior ou menor do que 11,0 exibiu um aumento no teor (% em peso) de ácido glutâmico por peso seco, em comparação com o extrato de levedura preparado usando levedura antes de ser submetida ao deslocamento de pH, e um extrato de levedura com um teor alto teor de ácido glutâmico foi obtido pela preparação de um extrato de levedura usando a levedura produzida pelo método de produção da presente invenção. Por exemplo, com relação à levedura com o ajuste de pH de 9,00 mostrado em Tabela 1, no extrato de levedura preparado a partir da levedura antes de ser submetida ao deslocamento de pH, o teor de ácido

glutâmico por peso seco foi 22,4% em peso no extrato de levedura preparado da levedura 6 horas após o deslocamento de pH. Em adição, com relação à levedura com o mesmo ajuste de pH de 9,00 (veja Tabela 3), o teor de ácido glutâmico por peso seco foi 19,4% em peso no extrato de levedura preparado da levedura cultivada por 3 horas após o deslocamento de pH, e o teor de ácido glutâmico por peso seco foi 25,5% em peso no extrato de levedura preparado da levedura cultivada por 6 horas após o deslocamento de pH. Em adição, com relação à levedura com o ajuste de pH de 9,25 (veja Tabela 3), o teor de ácido glutâmico por peso seco foi 21,3% em peso no extrato de levedura preparado da levedura cultivada por 6 horas após o deslocamento de pH.

Dos resultados acima, foi mostrado que o teor de ácido glutâmico em levedura é aumentado pelo ajuste do pH para 7,5 ou maior ou menor do que 11 após uma fase estacionária e a cultura. Particularmente, o teor de ácido glutâmico foi alto em 3 horas a 6 horas após o ajuste de pH.

Exemplo 2

Pré-cultura foi realizada na mesma maneira como em <1> de Exemplo 1, e então a cultura principal foi realizada sob as seguintes condições.

Em vez de realizar o deslocamento de pH após uma fase estacionária, uréia foi adicionada previamente no meio de cultura principal de tal modo que um pH fosse permitido espontaneamente se deslocar, obtendo deste modo uma levedura com um teor alto de ácido glutâmico.

Primeiro, um meio composto da seguinte composição foi preparado em um volume de 2000 mL (ajustado para ser 3 L quando a alimentação foi completada).

(Composição do meio)

0,18% cloreto de amônio (3 L em termos de quando a alimentação foi completada): 5,3 g

0,04% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (hidrogeno-fosfato de diamônio, em termos de quando a alimentação foi completada): 1,2 g

1% uréia (3 L em termos de quando a alimentação foi completada): 30 g

Outras condições foram iguais às em Exemplo 1. FIG. 1 é uma curva mostrando um aumento em contagem bacteriana versus tempo de cultura. FIG. 2 é uma curva mostrando um aumento em peso de biomassa de levedura seca versus tempo de cultura. FIG. 3 mostra mudanças em um pH de uma solução de cultura versus tempo de cultura.

Como mostrado em FIG. 1, um aumento na contagem bacteriana ($\times 10^6$ células/mL) chegou na fase estacionária após 18 horas de cultura, confirmando assim a entrada em uma fase estacionária. Em adição, o peso de biomassa de levedura seca (g/L) chegou em fase substancialmente estacionária após 24 horas de cultura, confirmando assim uma fase estacionária de crescimento. Quando um pH da solução de cultura foi medido, como mostrado em FIG. 3, um pH foi deslocado para uma faixa alcalina (7,5 ou maior ou menor do que 11) após entrada na fase estacionária de crescimento. Os resultados são apresentados em Tabela 4.

[Tabela 4]

Time (horas passadas)	pH	Contagem bacteriana ($\times 10^6$ células/mL)	Massa de biomassa de levedura seca (g/L)	Teor de ácido glutâmico (% em peso de biomassa de levedura seca)
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	1750	19,3	3,1
21	5,1	1540	28,8	2,7
24	5,9	1840	32,7	2,6
27	7,9	1700	36,9	3,8
30	8,4	1510	35,1	5,8
33	8,6	1660	34,3	6,0
36	8,6	1830	33,5	6,5
39	8,6	1870	34,3	6,7

42	8,6	2080	33,7	7,2
45	8,7	1940	34,5	7,3
48	8,7	1470	32,4	7,4

Como mostrado em Tabela 4, o teor de ácido glutâmico por peso de biomassa de levedura seca tornou-se 7,4% em peso quando um pH aumentou, o que corresponde a um aumento de 2,8 vezes em comparação com 2,6% em peso antes de um aumento de pH.

5 Exemplo 3

Extração de um extrato da solução de cultura de levedura e análise de ácido glutâmico foram realizadas na mesma maneira como em Exemplo 1, exceto que a pré-cultura e as condições principais de cultura foram as seguintes condições.

10 (Composição do meio)

Solução de pré-cultura: 150 mL

O sobrenadante foi removido da solução de pré-cultura obtida na mesma maneira como na pré-cultura de Exemplo 1, e um concentrado no qual uma concentração de levedura foi concentrada para de 15% a 20% foi usada como a solução de pré-cultura.

Água: 2000 mL

H_2SO_4 (97%): 1,33 mL

Melaço (teor de açúcar: 36%): 6,7 mL

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 0,06%

20 (Condições de cultura)

Temperatura de cultura: 32°C

pH: 0 hora a 15,5 horas: Não ajustado

Agitação: 600 rpm

Subsequentemente, a cultura foi realizada sob as seguintes

25 condições.

Após 15,5 horas: deslocamento de pH foi realizado com amônia aquosa

Agitação: 600 rpm

Meio de alimentação: melaço (teor de açúcar: 36%): 870 mL

NH₄OH (10%): 100 a 200 mL

Ácido fosfórico (85%): 5 a 20 (g)

Levedura foi cultivada, e deslocamento de pH foi realizado por NH₄OH aquoso após 15,5 horas, seguido por continuação de cultura de cultura. Os resultados obtidos são apresentados em Tabela 5.

[Tabela 5]

Ajuste de pH		Massa de biomassa de levedura seca (g/L)	Teor de ácido glutâmico (% em peso de biomassa de levedura seca)
9,0	Imediatamente após a inoculação	15,2	2,3
	Antes do deslocamento de pH	65,3	3,0
	6 horas após o deslocamento de pH	63,3	9,0

Como mostrado em Tabela 5, foi confirmado que o teor (% em peso) de ácido glutâmico livre na biomassa de levedura seca foi aumentado no ajuste de pH de 9,0, antes do deslocamento de pH e 6 horas após o deslocamento de pH. O teor de ácido glutâmico de 9,0% em peso foi cerca de 25% em termos de teor de ácido glutâmico no extrato de levedura.

A composição do meio foi diferente em comparação com Exemplo 1, e foi confirmado que qualquer composição do meio é capaz de aumentar o teor de ácido glutâmico em uma maneira dependente do pH.

Exemplo 4

Extração de um extrato da solução de cultura de levedura e análise de ácido glutâmico foram realizadas na mesma maneira como em Exemplo 3, exceto que um meio de alimentação para uso em cultura principal foi ajustado para satisfazer as seguintes condições, e o tempo de cultura após o deslocamento de pH foi de 3 horas. Os resultados obtidos são apresentados em Tabela 6.

Meio de alimentação: melaço (teor de açúcar: 36%): 760 mL a

870 mL

NH₄OH (10%): 100 mL a 200mL

Ácido fosfórico (85%): 5 a 20 (g)

[Tabela 6]

Nº do Exemplo	Ajuste de pH		Massa de biomassa de levedura seca (g/L)	Teor de ácido glutâmico (% em peso de biomassa de levedura seca)
4-1	9,0	Antes do deslocamento de pH	55,8	2,25
		3 horas após o deslocamento de pH	52,2	8,44
4-2	9,0	Antes do deslocamento de pH	48,1	2,52
		3 horas após o deslocamento de pH	47,0	8,06
4-3	9,0	Antes do deslocamento de pH	50,3	2,48
		3 horas após o deslocamento de pH	48,7	8,45
4-4	9,0	Antes do deslocamento de pH	49,7	2,29
		3 horas após o deslocamento de pH	53,7	9,13

Como mostrado em Tabela 6, os teores (% em peso) de ácido glutâmico livre na biomassa de levedura seca foram 8,44% em peso (Exemplo 4-1), 8,06% em peso (Exemplo 4-2), 8,45% em peso (Exemplo 4-3), e 9,13% em peso (Exemplo 4-4), respectivamente. Por outro lado, os teores de ácido glutâmico livre no extrato de levedura preparado usando uma tal levedura foram 33,2% em peso (Exemplo 4-1), 33,3% em peso (Exemplo 4-2), 28,2% em peso (Exemplo 4-3), e 27,1% em peso (Exemplo 4-4), respectivamente.

Destes resultados, é óbvio que pela sujeição de uma levedura em uma fase estacionária ao deslocamento de pH, é possível obter uma levedura com um teor muito alto de ácido glutâmico livre, isto é, um teor de 8% em peso ou maior na biomassa de levedura seca, e é possível preparar um extrato de levedura contendo muito ácido glutâmico livre não exibido pela arte relacionada, isto é, um teor de ácido glutâmico livre de 30% em peso ou maior.

Exemplo 5

Subsequentemente, a cultura foi realizada na mesma maneira como em Exemplo 1 usando levedura (cepa JCM1624 de *Candida utilis*) como uma cepa, e foram realizadas extração de um extrato da solução de cultura de levedura e análise de ácido glutâmico. Os resultados são 5 apresentados em Tabela 7.

[Tabela 7]

Ajuste de pH		Massa de biomassa de levedura seca (g/L)	Teor de ácido glutâmico (% em peso de biomassa de levedura seca)
9,0	Imediatamente após a inoculação	3,8	1,7
	Antes do deslocamento de pH	44,6	2,2
	Após o deslocamento de pH	46,1	2,6

Dos resultados acima, levedura (cepa JCM1624 de *Candida utilis*) também exibiu um aumento significativo no teor de ácido glutâmico na 10 levedura, como um resultado do deslocamento de pH após uma fase estacionária.

Exemplo 6

A seguir, para o extrato de levedura preparado a partir da levedura (ajuste de pH de 9,0) produzido na mesma maneira como em 15 Exemplo 1 exceto que o tempo de cultura após o deslocamento de pH foi de 3 horas, foram medidos o teor de ácido glutâmico livre e o teor total de aminoácido livre por peso seco. Em adição, foi conduzida uma medição de aminoácido livres tal como ácido glutâmico livre usando um analisador Acquity UPLC fabricado por Waters Corporation, de acordo com um "AccQ-20 Tag Ultra labeling method". Os resultados medidos são apresentados em Tabela 8. Em Tabela 8, o termo "teor de ácido glutâmico" significa o teor de ácido glutâmico livre por peso seco de um extrato de levedura, e o termo "teor total de aminoácido" significa o teor total de aminoácidos livres por peso seco de um extrato de levedura.

[Tabela 8]

	Antes do deslocamento de pH	3 horas após o deslocamento de pH
Teor de ácido glutâmico(% em peso em extrato)	6,9	26
Teor total de aminoácido(% em peso em extrato)	11,4	43

Como mostrado em Tabela 8, os teores de ácidos glutâmico livre antes e após o deslocamento de pH foram 6,9% em peso e 26% em peso, respectivamente, representando assim um aumento aproximado de 3,7-vezes.

- 5 Por outro lado, o teor total de aminoácido livre foi aumentado de 11,4% em peso para 43% em peso.

Exemplo 7

Subsequentemente, com relação ao extrato de levedura preparado a partir da levedura (pH 9,0) produzido na mesma maneira como 10 em Exemplo 1 e extratos de levedura comercialmente disponíveis (Exemplos Comparativos 1 a 8), o teor de ácido glutâmico livre e teor total de aminoácido livre por peso seco de extrato foram medidos e comparados. Em adição, uma medição de aminoácidos livres tal como ácido glutâmico livre foi realizada na mesma maneira como em Exemplo 6. O teor de ácido glutâmico 15 livre (% em peso) e teor total de aminoácido livre (% em peso) por peso seco de cada extrato de levedura obtido como os resultados de medição são apresentados em Tabela 9. Em Tabela 9, o termo “teor de ácido glutâmico” significa o teor de ácido glutâmico livre por peso seco de um extrato de levedura, e o termo “teor total de aminoácido” significa o teor total de 20 aminoácidos livres por peso seco de um extrato de levedura.

[Tabela 9]

Amostra	Exemplo 7	Exemplo Comparativo 1	Exemplo Comparativo 2	Exemplo Comparativo 3	Exemplo Comparativo 4	Exemplo Comparativo 5	Exemplo Comparativo 6	Exemplo Comparativo 7	Exemplo Comparativo 8
Teor em extrato		Produto de companhia A	Produto de companhia B	Produto de companhia C	Produto de companhia D	Produto de companhia E	Produto de companhia F	Produto de companhia G	Produto de companhia H
Ácido glutâmico (% em peso)	29,1	5,6	0,1	8,0	3,4	3,2	0,5	9,5	9,5
Aminoácido total (% em peso)	60,2	8,6	5,6	11,1	8,8	9,9	3,6	21,0	17,0

Dos resultados cima, o teor de ácido glutâmico livre do extrato de levedura de acordo com a presente invenção foi muito alto, isto é, 29,1% em peso. O extrato de levedura contendo ácido glutâmico livre em uma concentração muito alta de cerca de a 30% em peso como descrito acima não tem sido relatado na arte relacionada. Estes resultados sugerem que o extrato de levedura da presente invenção é preferível como um tempero.

Exemplo 8

Usando um pó de extrato de levedura (derivado de cepa AB9846 de *Saccharomyces cerevisiae*, teor de ácido glutâmico de 23% em peso) obtido por pulverização do extrato de levedura preparado a partir da levedura (pH 9,0) ajustada na mesma maneira como em Exemplo 1, foram preparadas uma sopa de pasta de feijão e uma sopa de consommé. A quantidade de misturação do extrato de levedura para a sopa de pasta de feijão e para sopa de consommé foi de 0,2%.

Usando MEAST POWDER N (fabricado por Asahi Food & Healthcare Co., Ltd., teor de ácido glutâmico: 4% em peso) como um Exemplo Comparativo, foram preparadas uma sopa de pasta de feijão e uma sopa de consommé na mesma maneira como acima. Avaliação sensorial foi conduzida de acordo com o seguinte método.

20 (Método de avaliação)

Com a comparação de 2-pontos cega por 10 panelistas especialistas, foi realizado um teste sensorial comparativo. Um teste-t foi conduzido na forma de um par de testes comparativos.

(Critérios de avaliação)

3 Itens de sabor salgado (efeito redutor de sal), sabor umami e sabor de segurelha foram avaliados em termos de 5 estágios como segue, considerando uma sopa de pasta de feijão ou uma sopa de consommé servindo como uma referência com o valor 0.

“Forte” = +2,

“Suavemente forte” = +1,
“Não pertencendo a “forte ou fraco”” = 0,
“Suavemente fraco” = -1,
“Fraco” = -2.

5 Os resultados para a sopa de pasta de feijão são apresentados em Tabela 10, e os resultados para a sopa de consommé são apresentados em Tabela 11.

[Tabela 10]

Amostra	Item	Painel							Valor médio	Desvio padrão
		Painel A	Painel B	Painel C	Painel D	Painel E	Painel F	Painel G		
Exemplos	Sabor salgado	-1	1	1	-1	1	0	0	0,10	0,88
	Umami	0	0	1	2	-1	0	1	0,40	0,97
	Sabor de segurelha	0	2	0	1	0	0	1	0,80	0,79
"Meast powder N" (Exemplos Comparativos)	Sabor salgado	0	0	1	-2	0	-1	0	-0,30	0,82
	Umami	1	0	0	1	-1	-1	1	0,00	0,82
	Sabor de segurelha	1	2	0	0	-1	0	0	0,20	0,79

Teste-t pareado dos dados

Sabor salgado: p=0,11

Umami: p=0,11

Sabor de segurelha: p=0,03*

[Tabela 11]

Amostra	Item	Painel							Valor médio	Desvio padrão
		Paine 1A	Paine 1B	Paine 1C	Paine 1D	Paine 1E	Paine 1F	Paine 1G		
Exemplos	Sabor salgado	1	1	1	1	0	-1	1	0	0,50
	Umami	1	0	1	2	1	-1	2	0	0,90
	Sabor de	1	0	0	0	2	1	0	0	0,50

Teste-t pareado dos dados

Sabor salgado: p=0,15

Sabor Umami: p=0,03*

Sabor de segurelha: p=0,38

Dos resultados de Tabela 10, a sopa de pasta de feijão exibiu uma diferença nos valores médios de sabores salgado e umami, e uma diferença significativa no sabor de segurelha. Dos resultados de Tabela 11, a sopa de consommé exibiu uma diferença nos valores médios de sabor salgado e sabor de segurelha, e uma diferença significativa em umami. Acredita-se que isto é devido ao fato de que o extrato de levedura da presente invenção tem um teor significativamente mais alto de ácido glutâmico do que aqueles da arte relacionada.

Exemplo 9

Visto que leveduras diferentes de cepa AB9846 de *Saccharomyces cerevisiae* e de cepa JCM1624 de *Candida utilis* também são obtidas com um teor aumentado de ácido glutâmico em levedura, pela realização do deslocamento de pH após uma fase estacionária, 10 cepas pertencendo ao gênero *Saccharomyces*, 4 cepas pertencendo ao gênero *Candida*, e 2 cepas pertencendo ao gênero *Kluyveromyces* foram cultivadas na mesma maneira como em Exemplo 1, seguido pela medição de teores de ácido glutâmico. Especificamente, a cultura e a medição de teores de ácido glutâmico foram realizadas para cepa AB1 de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de cerveja), cepa AB2 de *Saccharomyces cerevisiae* (vinho Kyokai Nº 4), cepa AB3 *Saccharomyces cerevisiae* (levedura Kyokai Nº 5), (levedura de vinho) cepa AB4 pertencendo ao gênero *Saccharomyces*, cepa AB5 de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de padaria), cepa AB6 de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de padaria), cepa AB7 (levedura de uísque) pertencendo ao gênero *Saccharomyces*, cepa AB8 de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa AB9 de *Saccharomyces sake* (levedura Kyokai Nº 6), cepa AB10 de *Saccharomyces bayanus*, cepa AB11 de *Candida utilis* (IAM0626), cepa AB12 de *Candida utilis* (IFO0639), Cepa AB13 de *Candida utilis* (JCM2287 é uma cepa parental), cepa AB14 de *Candida utilis* (JCM2287 é uma cepa parental), cepa AB15 de *Kluyveromyces lactis* (IFO1090), e cepa

AB16 de *Kluyveromyces lactis*. Em adição, a cultura e a medição de teores de ácido glutâmico também foram realizadas para a cepa AB9846 de *Saccharomyces cerevisiae* como um controle.

Especificamente, cultura principal de cada cepa pré-cultivada em um meio de melaço (8% de melaço, 0,6% de uréia, 0,16% de sulfato de amônio, e 0,08% de hidrogeno-fosfato de diamônio) foi realizada em um meio (0,18% de cloreto de amônio, 0,04% de hidrogeno-fosfato de diamônio), usando melaço (teor de açúcar: 36%), um volume de 800 mL (em frasco de meio de 1 L, finalmente 8%) como um meio de alimentação. A temperatura de cultura e as condições de aeração/agitação foram as mesmas como em Exemplo 1.

imediatamente após a levedura cultivada ter entrado em uma fase estacionária, deslocamento de pH foi realizado por NH₄OH aquoso (10%) (ajuste de pH de 7 para 11), e levedura foi adicionalmente cultivada. Cultura de levedura foi terminada 48 horas após o início da cultura principal. Da levedura cultivada, biomassa de levedura seca e extrato de levedura foram preparados na mesma maneira como em Exemplo 1, e quantidades de ácido glutâmico livre contidas nos mesmos foram respectivamente medidas.

Os resultados medidos do teor (% em peso) de ácido glutâmico livre na biomassa de levedura seca são apresentados em Tabela 12, e os resultados medidos do teor (% em peso) de ácido glutâmico livre no extrato de levedura são apresentados em Tabela 13. Com relação aos testes de Números 6 a 10, o teor de ácido glutâmico antes de uma elevação de pH não foi medido.

[Tabela 12]

Nº do Teste	Cepa	Espécie	Teor de ácido glutâmico (% em peso) antes do deslocamento de pH	Teor de ácido glutâmico (% em peso) após o deslocamento de pH	Proporção de teor de ácido glutâmico antes e após o deslocamento de pH
1	AB1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de cerveja)	2,0	6,3	3,15
2	AB2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vinho Kyokai Nº 4)	1,5	2,7	1,8
3	AB3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura Kyokai Nº 5)	2,7	5,2	1,9
4	AB4	Genus <i>Saccharomyces</i> (levedura de vinho)	1,8	4,4	2,4
5	AB5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de padaria)	2,5	4,7	1,9
6	AB6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de padaria)	-	4,6	-
7	AB7	Gênero <i>Saccharomyces</i> (levedura de uísque)	-	5,3	-
8	AB8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	5,4	-
9	AB9	<i>Saccharomyces sake</i> (levedura Kyokai Nº 6)	-	5,3	-
10	AB10	<i>Saccharomyces bayanus</i>	-	6,4	-
11	AB11	<i>Candida utilis</i> (IAM0626)	1,3	1,7	1,3
12	AB12	<i>Candida utilis</i> (IFO0639)	2,0	4,0	2,0
13	AB13	<i>Candida utilis</i> (JCM2287 é uma cepa parental)	0,3	0,5	1,8

14	AB14	<i>Candida utilis</i> (JCM2287 é uma cepa parental)	0,4	1,1	3,1
15	AB15	<i>Kluyveromyces lactis</i> (IFO1090)	0,2	0,9	5,4
16	AB16	<i>Kluyveromyces lactis</i>	0,3	2,9	11,0
17	AB9846	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (controle)	2,7	5,9	2,2

[Tabela 13]

Nº do Teste	Cepa	Espécie	Teor de ácido glutâmico (% em peso) antes do deslocamento de pH	Teor de ácido glutâmico (% em peso) após o deslocamento de pH	Proporção de teor de ácido glutâmico antes e após o deslocamento de pH
1	AB1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de cerveja)	7,8	26,8	3,4
2	AB2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (vinho Kyokai Nº 4)	9,5	12,6	1,3
3	AB3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura Kyokai Nº 5)	8,5	18,0	2,1
4	AB4	Genus <i>Saccharomyces</i> (levedura de vinho)	10,2	17,8	1,7
5	AB5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de padaria)	9,9	17,2	1,7
6	AB6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de padaria)	-	24,6	-
7	AB7	Genus <i>Saccharomyces</i> (levedura de uísque)	-	29,4	-
8	AB8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	22,4	-
9	AB9	<i>Saccharomyces sake</i> (levedura Kyokai Nº 6)	-	28,5	-

10	AB10	<i>Saccharomyces bayanus</i>	-	28,8	-
11	AB11	<i>Candida utilis</i> (IAM0626)	4,1	6,4	1,6
12	AB12	<i>Candida utilis</i> (IFO0639)	6,3	12,7	2,0
13	AB13	<i>Candida utilis</i> (JCM2287 é uma cepa nova)	1,2	3,3	2,8
14	AB14	<i>Candida utilis</i> (JCM2287 é uma cepa nova)	1,1	4,5	4,1
15	AB15	<i>Kluyveromyces lactis</i> (IFO1090)	1,2	3,2	2,6
16	AB16	<i>Kluyveromyces lactis</i>	1,3	12,4	9,4
17	AB9846	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (controle)	10,2	21,1	2,1

Como mostrado em Tabela 12 e Tabela 13, foi confirmado que todas as cepas exibiram um aumento excessivo no teor de ácido glutâmico livre após uma elevação de pH, em comparação com antes de um aumento de pH. Ademais, com relação aos testes de 6 a 10, embora o teor de ácido glutâmico antes de uma elevação de pH não tenha sido medido, porque o teor de ácido glutâmico livre por biomassa de levedura seca estava mais alto do que 4,5% em peso em qualquer uma das cepas e o teor de ácido glutâmico livre no extrato de levedura era significativamente mais alto do que 20% em peso, acredita-se que o teor de ácido glutâmico livre foi significativamente aumentado pela realização do deslocamento de pH após uma fase estacionária. Destes resultados, é óbvio que um efeito crescente de teor de ácido glutâmico de acordo com o método da presente invenção é exibido em várias leveduras sem ser limitado a uma cepa específica, e um tal efeito é exibido se a cepa de levedura for pelo menos uma cepa pertencendo ao gênero *Saccharomyces* ou uma cepa pertencendo ao gênero *Candida*.

Aplicabilidade Industrial

Visto que uma levedura mantendo na mesma ácido glutâmico em uma concentração alta pode ser obtida pelo método para produzir uma

levedura com um teor alto de ácido glutâmico de acordo com a presente invenção, uma tal levedura pode ser usada no campo de alimentos tal como na preparação de extratos de levedura.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma levedura, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) cultivar a levedura de ocorrência natural em uma fase de crescimento logarítmica em um meio líquido, a um pH de 3,5 a 7,5; e

(b) após a levedura entrar em uma fase de crescimento estacionária, continuar o cultivo da levedura sob condições nas quais o pH do meio líquido seja igual ou maior do que 7,5 e menor do que 11;

obtendo assim uma levedura compreendendo ácido glutâmico livre de 4,0% em peso a 9,13% em peso por biomassa de levedura seca.

2. Método para produzir a levedura de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é uma etapa de adicionar uma substância alcalina no meio líquido.

3. Método para produzir a levedura de acordo com a
15 reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, na etapa (b), uma porção da
levedura cultivada é recuperada e o teor de ácido glutâmico livre na levedura
é intermitentemente medido.

4. Método para produzir a levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a levedura é
20 *Saccharomyces cerevisiae.*

5. Método para produzir a levedura de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de compreender adicionalmente, uma etapa de recuperar a levedura do meio líquido.

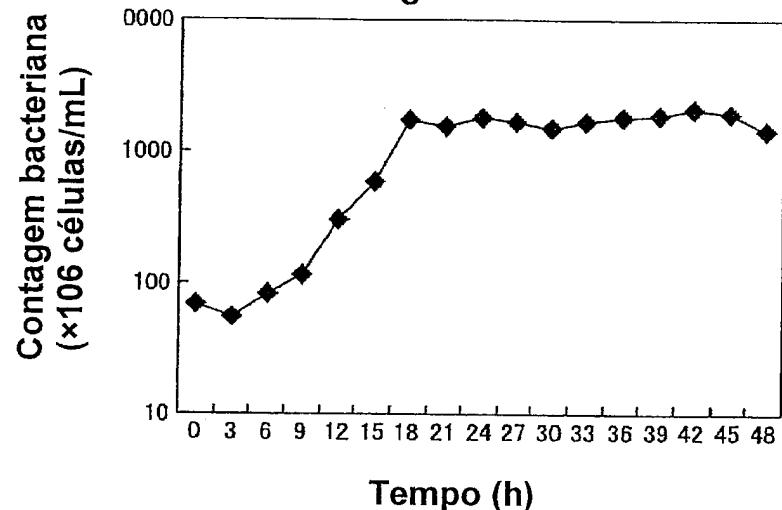
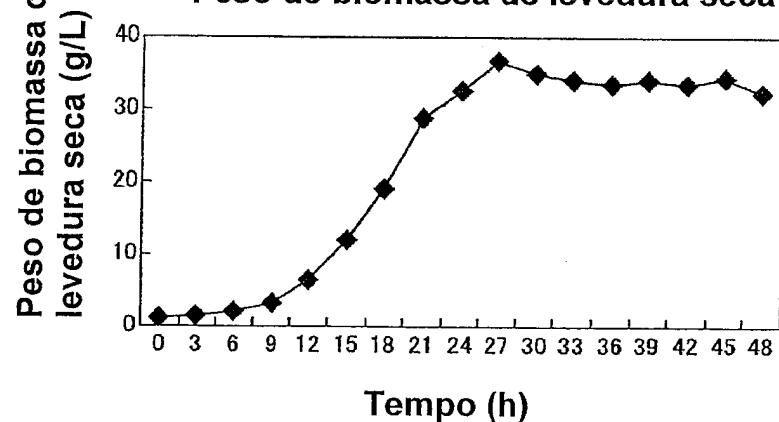
FIG.1**Contagem bacteriana****FIG.2****Peso de biomassa de levedura seca**

FIG.3