

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3733585号
(P3733585)

(45) 発行日 平成18年1月11日(2006. 1. 11)

(24) 登録日 平成17年10月28日(2005. 10. 28)

(51) Int. Cl.	F I
A 2 3 L 1/28 (2006. 01)	A 2 3 L 1/28 Z N A A
A 2 3 L 1/221 (2006. 01)	A 2 3 L 1/221 H
A 2 3 L 1/227 (2006. 01)	A 2 3 L 1/227 B
A 2 3 L 1/231 (2006. 01)	A 2 3 L 1/231

請求項の数 9 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2000-583370 (P2000-583370)	(73) 特許権者	000000066
(86) (22) 出願日	平成11年11月25日 (1999. 11. 25)		味の素株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP1999/006576		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(87) 国際公開番号	W02000/030474	(74) 代理人	100064687
(87) 国際公開日	平成12年6月2日 (2000. 6. 2)		弁理士 霜越 正夫
審査請求日	平成16年8月17日 (2004. 8. 17)	(74) 代理人	100102668
(31) 優先権主張番号	特願平10-335385		弁理士 佐伯 憲生
(32) 優先日	平成10年11月26日 (1998. 11. 26)	(72) 発明者	香村 正徳
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
(31) 優先権主張番号	特願平10-335386		素株式会社 食品研究所内
(32) 優先日	平成10年11月26日 (1998. 11. 26)	(72) 発明者	西村 康史
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
(31) 優先権主張番号	特願平11-194172		素株式会社 食品研究所内
(32) 優先日	平成11年7月8日 (1999. 7. 8)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 食品の風味増強用素材の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

γ - グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材を、糖の非存在下かつ水の存在下、pH 1 ~ 7 において50 ~ 120 に保持することを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法。

【請求項 2】

γ - グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材に、γ - グルタミルペプチド加水分解酵素を水の存在下、pH 3 ~ 9 かつ15 ~ 70 において作用させることを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法。

【請求項 3】

γ - グルタミルペプチド加水分解酵素がγ - グルタミルトランスフェラーゼ、γ - グルタミルシクロトランスフェラーゼまたはグルタミナーゼであることを特徴とする請求項2記載のシステイン高含有食品素材の製造法。

【請求項 4】

原料の食品素材が酵母エキスまたは酵母菌体であることを特徴とする請求項1 ~ 3のいずれかに記載のシステイン高含有食品素材の製造法。

【請求項 5】

γ - グルタミルシステイン又はγ - グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材を、還元糖の非存在下かつ水の存在下、pH 1 ~ 7 において50 ~ 120 に3 ~ 300 分間保持した後に還元糖を前記γ - グルタミルシステインに対す

10

20

る割合で 1 ~ 10 倍モル加えることを特徴とする食品の風味増強用素材の製造法。

【請求項 6】

γ -グルタミルシステイン又は γ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で 1 重量 % 以上含有する食品素材に、 γ -グルタミルペプチド加水分解酵素を水の存在下、pH 3 ~ 9 かつ 15 ~ 70 において 1 ~ 300 分間作用させた後に還元糖を前記 γ -グルタミルシステインに対する割合で 1 ~ 10 倍モル加えることを特徴とする食品の風味増強用素材の製造法。

【請求項 7】

γ -グルタミルペプチド加水分解酵素が γ -グルタミルトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼまたはグルタミナーゼであることを特徴とする請求項 6 記載の食品の風味増強用素材の製造法。

【請求項 8】

原料の食品素材が酵母エキスまたは酵母菌体であることを特徴とする請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の食品の風味増強用素材の製造法。

【請求項 9】

請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の食品の風味増強用素材を 50 ~ 180 に 10 ~ 300 分間保持することを特徴とする食品の風味増強剤の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、固形分中 γ -グルタミルシステイン（本明細書においては、別異の指示のない時は、 γ -グルタミルシステインは、その酸化型ジスルフィドを含む）を 1 %（重量 %）以上の高含有量で含有する酵母エキスおよび酵母菌体などの食品素材を原料として、これを pH 酸性乃至中性領域で加熱すること、またはこれに γ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させることにより、容易にシステイン（本明細書においては、別異の指示のない時は、システインは、その酸化型ジスルフィドであるシスチンを含む）を高含有量で含む食品素材を得る方法に関する。

本発明は、また、 γ -グルタミルシステイン又は固形分中 γ -グルタミルシステインを 1 %（重量 %）以上の高含有量で含有する酵母エキスおよび酵母菌体などの食品素材を原料として、これを pH 酸性乃至中性領域で加熱し、またはこれに γ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させた後に還元糖を加えることにより容易に食品の風味増強用素材を得る方法、及びこのような方法によって得られた食品の風味増強用素材を加熱することにより容易に食品の風味増強剤を得る方法に関する。

本発明は、さらにまた、 γ -グルタミルシステインを高含有量で含有する食品用途酵母菌体そのもの、延いては酵母エキスそのもの、又はこれらを製造する方法に関する。

【0002】

(背景技術)

システインは食品の風味改善などを目的に用いられている。システインの製法については蛋白分解法や半合成法などが知られているが、現在主に用いられている方法は蛋白分解法と半合成法である。

システインを上記の目的で用いる場合、これを高含有量で含有する食品素材の強い要望があるが、システインを高含有量で含有する食品素材は従来ほとんど知られていない。例えば、 γ -グルタミルシステインを酵母菌体内に蓄積させた例として、遺伝子工学的に γ -グルタミルシステイン合成酵素を過剰発現させ、菌体乾燥重量当たり最高 2 % の γ -グルタミルシステインを蓄積させた報告がある（大竹ら、バイオサイエンスとインダストリー、50 巻、10 号、989 ~ 994 頁、1992 年）。しかし、この結果はあくまで遺伝子工学を用いた実験室酵母というモデルを用いて、自然界では通常あり得ない形で作製された γ -グルタミルシステインの高蓄積酵母についてのものである。また、この報告においては、この酵母を用いて食品用途の素材とするなどという発想の記載はない。

また、 γ -グルタミルシステインまたは γ -グルタミルシステインを含有する酵母エキス

10

20

30

40

50

などを食品に添加するとコク味が増強されることが知られている。また、 γ -グルタミルシステインまたは γ -グルタミルシステインを含有する酵母エキスなどを糖の共存下で加熱して得られる食品素材が食品の風味増強に有効であることは、例えば、特開平4-66069号公報、同4-91762号公報などにより既に知られている。

詳述すると、前者（特開平4-66069号公報）によれば、「より好ましいミートフレイバー調味料を得るべく、鋭意研究を重ねた結果、グルタチオン、システイン、またはグルタミルシステインなどの含硫化合物を2~20重量%（固形物濃度）含有する酵母エキスを糖類および必要に応じてアミノ酸類を添加し、脂肪非存在下で加熱することにより、上述の酵母由来の不快臭・不快味がない、良質で安定性に優れたローストミートフレイバー様調味料が得られるとの知見を得るに至り」（同公報「問題を解決するための手段」冒頭）、このような知見に基づいて「グルタチオン、システイン、またはグルタミルシステインなどの含硫化合物を一定量（エキス当たり2~20重量%）含有する酵母エキスを糖類並びに必要に応じてアミノ酸を添加し、脂肪非存在下で温度70~180、10~180分間加熱することを特徴とする調味料の製造法」を完成したという（同公報「特許請求の範囲」）。

また、後者（特開平4-91762号公報）によれば、「既存のミートフレイバーには多種多様なものがあるが、いずれも、天然の肉のロースト香とは異なる質を有するものであり、天然のローストミートフレイバーにより近い質をもった、フレイバー付与剤が望まれていた。」ところ（同公報「発明の解決しようとする問題点」）、「これらの欠点を解決することを目的として、各種アミノ酸と糖類の加熱褐変フレイバーに関する研究を行った結果、 γ -グルタミルシステインに糖類を添加した後に水に溶解し、温度70~180、10~180分間加熱反応を行うことによって、従来なしえなかった良好なローストミート香を有するフレイバー組成物を製造し得ることを発見し、本発明を完成した。」とし（同公報「問題点を解決するための手段」）、「 γ -グルタミルシステインに、糖類を添加して、温度70~180、10~180分間加熱することを特徴とするフレイバー組成物の製造法。」を開示する。

しかしながら、これらのフレイバー調味料については、ミートフレイバーが増加するが、これと同時にコゲ臭が強くなるという問題点が指摘される。

【0003】

（発明の開示）

前項記載の従来技術の背景下に、本発明は、システインを高含有量で含有する食品素材を提供することを目的とする。

前項記載の従来技術の背景下に、本発明は、また、コゲ臭が強いなどの前記問題点を免れた、飲食品にビーフフレイバーや鰹節フレイバー等の風味を増強する食品の風味増強用素材及び風味増強剤を提供することを目的とする。

前項記載の従来技術の背景下に、本発明は、さらにまた、上記の食品素材、食品の風味増強用素材又は風味増強剤の製造原料として適当な γ -グルタミルシステインを高含有量で含有する食品用途酵母菌体、延いては酵母エキスを提供することを目的とする。

本発明者は、前項記載の目的を達成すべく鋭意検討の結果、 γ -グルタミルシステインは、これをpH1~7において50~120で加熱すると3~300分でシステインとPCA（ピロリドンカルボン酸）に分解するため、システインが全体として高収率で得られること、また、 γ -グルタミルシステインを γ -グルタミルペプチド加水分解酵素を用いて加水分解させると γ -グルタミルシステインはシステインとグルタミン酸に分解するため、システインが全体として高収率で得られること、さらにまた、 γ -グルタミルシステインを1%（重量%）以上含有する酵母菌体または酵母エキスを、糖の非存在下、含水状態で同様に加熱し、またはこれに γ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させるとシステイン高含有酵母エキスが得られることを見出し、このような知見に基づいて本発明の第一（第一の発明）を完成した。

すなわち、本発明は、 γ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材を、糖の非存在下かつ水の存在下、pH1~7において50~120に

10

20

30

40

50

保持する、またはこれにpH 3～9で15～70 においてγ-グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させることを特徴とするシステイン高含有食品素材の製造法、およびこのような方法であって原料の食品素材が酵母エキスまたは酵母菌体であることを特徴とするものに関する。

【0004】

本発明者は、前項記載の目的を達成すべく更に鋭意研究の結果、γ-グルタミルシステイン又はγ-グルタミルシステインを固形分に占める割合で1%（重量%）以上の高含有量で含有する酵母菌体もしくは酵母エキスを還元糖の非存在下、酸性乃至中性のpH領域において50～120 で3～300分加熱し、またはpH 3～9かつ15～70 においてγ-グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させた後に、続いて還元糖を加えて得られ 10
る素材が食品の風味増強に有効であること、及びこのような素材を加熱すると食品の優れた風味増強剤となり得ることを見出し、このような知見に基づいて本発明の第二（第二の発明）を完成した。

すなわち、本発明は、γ-グルタミルシステイン又はγ-グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上含有する食品素材を、還元糖の非存在下かつ水の存在下、pH 1～7において50～120 に3～300分間保持し、またはpH 3～9かつ15～70 においてγ-グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させた後に還元糖を前記γ-グルタミルシステインに対する割合で1～10倍モル加えることを特徴とする食品の風味増強用素材の製造法、およびこのようにして得られた食品の風味増強用素材を50～180 20
に10～300分間保持することを特徴とする食品の風味増強剤の製造法に関する。

本発明者は、前項記載の目的を達成すべく更に鋭意研究の結果、食品用途酵母として代表的な*Saccharomyces cerevisiae*において、1%を超える乾燥菌体あたりの重量をもつγ-グルタミルシステインを高含有する酵母を作出し、その酵母菌体から酵母エキスを調製する方法（このエキス中にはγ-グルタミルシステインが高濃度で含有されている）、さらにその酵母エキスを加熱処理することにより、加熱前よりもシステインの含有量が上昇した酵母エキスを得ることに成功し、これに基づいて本発明の第三（第三の発明）を完成した。すなわち、本発明は、γ-グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上の高含有量で含有することを特徴とする食品用途酵母菌体又は酵母エキスに関する。

因みに、上記本発明の第一、本発明の第二および本発明の第三は、これまでの説明からおよ 30
びこれからの説明から理解できるように、単一の一般的発明概念を形成するように連関
している一群の発明を構成している。

【0005】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0006】

先ず、上記第一の発明について説明する。

本発明の製造法における原料である食品素材は、γ-グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上の高含有量で含有する食品素材である。γ-グルタミルシステインの含有量が1%以下のものは、得られる風味力価が弱く工業的には実用的でないの で好ましくない。 40

そのような食品素材としては、例えば、γ-グルタミルシステインの固形分に占める割合が1重量%以上の酵母菌体や酵母エキスを挙げることができる。因みに、このようなγ-グルタミルシステインを高含有量で含有する酵母菌体は、例えば、後掲実施例7に記載の方法または突然変異でγ-グルタミルシステインを高含有するようになった酵母を自然界より分離もしくは変異処理することによって得ることができる。また、酵母エキスは、このような酵母菌体から抽出もしくは自己消化することにより又はγ-グルタミルシステインの含有量が前記所定量に達していない酵母エキスをγ-グルタミルシステインを補添することにより調製することができる。

本発明によれば、このような食品素材を水の存在下、酸性乃至中性のpH領域、すなわち、pH 1～7において50～120 に保持して加熱をする。水の存在量は、操作性の見 50

地から定められ、例えば、食品素材に対し、その1重量部(乾物換算)当たり1~100重量部とすることができる。pHは前記の範囲外では、システインの生成量が少なくなり好ましくない。なお、pHの調整は、食品として許容される塩酸などの酸や水酸化ナトリウムなどの塩基によって行うことができることは言うまでもない。加熱温度は、これが低温に過ぎると γ -グルタミルシステインの分解反応の進行が遅く、逆に、高温に過ぎると一旦生成したシステインが副反応によって減少してしまい好ましくない。上記の加熱条件で食品素材を加熱処理すると、3~300分間でシステインが多量に生成蓄積したシステイン高含有食品素材が得られる。加熱時間は、これが短かすぎると反応が完了せず、逆に長すぎるとやはり一旦生成したシステインが副反応により減少してしまい好ましくない。 γ -グルタミルシステイン分解反応は、糖、特にグルコース、フラクトース、キシロース、マルトースなどの還元糖を添加せず、それらの非存在下で行うことが肝要である。これは生成したシステインが糖、特にこれらの還元糖と反応して焦げ臭を発するのや褐変反応を防ぐためである。

10

また、 γ -グルタミルシステインは、これからシステインを生成させるには酵素を作用させる方法も挙げられる。すなわち、 γ -グルタミルシステインのペプチド結合を加水分解する酵素(γ -グルタミルペプチド加水分解酵素)を前記の食品素材にpH3~9かつ15~70において作用させる。水の存在量は、操作性の見地から定められ、例えば、食品素材に対し、その1重量部(乾物換算)当たり1~100重量部とすることができる。pHおよび温度は前記の範囲外では γ -グルタミルペプチド加水分解酵素の活性が弱まり、好ましくない。上記の条件で食品素材を酵素処理すると、1~300分間でシステインが多量に生成蓄積したシステイン高含有食品素材が得られる。

20

γ -グルタミルペプチド加水分解酵素には数多くの種類が存在するが、特に本発明の実施上有用なものとしては γ -グルタミルトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ、グルタミナーゼなどを挙げることができる。

このように作成したシステイン高含有食品素材は、そのまま液体の状態で、濃縮してペーストの状態で、または乾燥して粉末の状態で、その他顆粒の状態など、適宜の形態で流通にしておくことができる。

【0007】

次に、前記第二の発明について説明する。

まず第一に、本発明の食品の風味増強用素材の製造方法について説明する。これは、例えば、先に述べたように、pH酸性乃至中性領域において γ -グルタミルシステイン又は γ -グルタミルシステインを1%(重量%)以上含有する酵母菌体または酵母エキスを還元糖の非存在下で加熱し、または γ -グルタミルペプチド加水分解酵素を作用させ、続いて糖を加えることにより製造することができる。

30

このような製造法における原料である食品素材は、本発明の第一に関して先に説明したところと同様に、 γ -グルタミルシステインを固形分に占める割合で1重量%以上の高含有量で含有する食品素材である。 γ -グルタミルシステインの含有量が1%以下のものは、得られる風味力価が弱く工業的には実用的でないので好ましくない。

そのような素材としては、例えば、 γ -グルタミルシステインの固形分に占める割合が1重量%以上の酵母菌体や酵母エキスを挙げることができる。因みに、このような γ -グルタミルシステインを高含有量で含有する酵母菌体は、例えば、後掲実施例7に記載の遺伝子工学的方法によって得ることができる。また、酵母エキスは、このような酵母菌体から抽出もしくは自己消化することによりまたは γ -グルタミルシステインを補添することにより調製することができる。これは、本発明の第一に関して先に説明したところと同様である。

40

本発明によれば、まず、 γ -グルタミルシステイン又は γ -グルタミルシステインを高含有量で含有する前記のような食品素材を還元糖の非存在下かつ水の存在下、酸性乃至中性のpH領域、すなわち、pH1~7において50~120に3~300分間保持して加熱をする。このようなpH、温度および時間の条件それ自体は、本発明の第一に関して先に説明したところと同様である。

50

水の存在量は、操作性の見地から定められ、例えば、 γ -グルタミルシステイン又はこれを高含有量で含有する食品素材に対し、その1重量部(乾物換算)当たり1~100重量部とすることができる。

因みに、本発明者は、別途、 γ -グルタミルシステインをpH1~7において50~120で、例えば3~300分加熱すると、 γ -グルタミルシステインはシステインとPCA(ピロリドンカルボン酸)に分解するため、システインが全体として高収率で得られること、さらに又、 γ -グルタミルシステインを1%(重量%)以上含有する酵母菌体または酵母エキスを、還元糖の非存在下、含水状態で同様に加熱するとシステイン高含有酵母エキスが得られることを見出しているが、本発明に係わる食品用組成物の風味増強作用は、 γ -グルタミルシステインからこのようにして生成するシステインによるものである。そして、pHは前記の範囲外では、システインの生成量が少なくなり好ましくない。なお、pHの調整は、食品として許容される塩酸などの酸や水酸化ナトリウムなどの塩基によって行うことができることはいうまでもない。これは、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

10

加熱温度は、これが低温に過ぎると γ -グルタミルシステインの分解反応の進行が遅く、逆に、高温に過ぎると一旦生成したシステインが副反応により減少してしまい好ましくない。加熱時間は、これが短すぎると反応が完了せず、逆に長すぎるとやはり一旦生成したシステインが副反応により減少してしまい好ましくない。これも、また、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

本発明者の知見によれば、先に説明したように、 γ -グルタミルシステインをpH1~7の酸性乃至中性領域において特定の温度で特定時間加熱すると、 γ -グルタミルシステインはシステインとPCA(ピロリドンカルボン酸)に分解して最終的にシステインが高収率で得られ、また、 γ -グルタミルシステインを1%(重量%)以上含有する酵母菌体または酵母エキスを、還元糖の非存在下、含水状態で同様に加熱するとシステイン高含有酵母エキスが得られるのである。

20

γ -グルタミルシステインのこのような分解反応は、例えば、グルコース、フラクトース、キシロース、マルトースなどの還元糖を添加せず、これの非存在下で行うことが肝要である。これは、生成したシステインがこれらの還元糖と反応して焦げ臭を発するのや褐変反応を防ぐためである。これは、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

30

また、 γ -グルタミルシステインは、これからシステインを生成させるには酵素を利用する方法も挙げられる。すなわち、 γ -グルタミルシステインのペプチド結合を加水分解する酵素(γ -グルタミルペプチド加水分解酵素)を γ -グルタミルシステイン又は前記の食品素材にpH3~9かつ15~70において1~300分間作用させる。水の存在量は、操作性の見地から定められ、例えば、食品素材に対し、その1重量部(乾物換算)当たり1~100重量部とすることができる。pHおよび温度は前記の範囲外では γ -グルタミルペプチド加水分解酵素の活性が弱まり、好ましくない。これは、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

γ -グルタミルペプチド加水分解酵素には数多くの種類が存在するが、特に本発明の実施上有用なものとしては γ -グルタミルトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ、グルタミナーゼなどを挙げることができる。これも、本発明の第一に関して上に説明したところと同じである。

40

このように作成したシステイン高含有の加熱処理生成物は、これに前記のような還元糖を前記 γ -グルタミルシステインに対する割合で1~10倍モル加えることにより本発明の食品の風味増強用素材とすることができる。

還元糖としては、グルコース、フラクトース、キシロース、マルトースなどを挙げることができ、これらの還元糖は、安価で入手容易であり、また食品としての利用可能の理由から好ましい。

還元糖の添加量(使用量)は、上記のように、原料の γ -グルタミルシステイン又はこれを含有する酵母菌体若しくは酵母エキスなどの天然食品素材に含まれる γ -グルタミルシ

50

ステインに対する割合でこれの１モル当たり１～１０モルである。添加量がこの範囲より少ないと効果が弱く、一方、多いと甘味が強くなって共に好ましくない。

このようにして製造することのできる風味増強用素材は、これをそのまま液体の状態で、濃縮してペーストの状態で、または乾燥して粉末の状態で、その他顆粒の状態など、適宜の形態で流通に置くことができる。本発明の風味増強用素材は、後に食品加工に使用された場合に加工処理における加熱工程において、それに含まれるシステインと還元糖が反応して風味増強効果を奏するのである。

次に、本発明の食品の風味増強剤の製造法について説明する。これは、例えば、上に説明した本発明の風味増強用素材を適当な条件で加熱処理することによって得ることができる。

10

加熱処理に際して、風味増強効果を得る目的で、システイン濃度が０．１重量％以上、好ましくは０．６重量％以上になるように必要に応じて濃縮してから加熱する。加熱条件は、５０～１８０ で１０～３００分の範囲で焦げ臭や褐変反応の起こらない範囲とする。このような加熱条件には、例えば、５０～６０ で１８０～３００分というような低温で長時間および９０～１００（沸点前後）で３０～１２０分というような高温で短時間加熱する条件が含まれる。

例えば、このように作成することのできる本発明の食品の風味増強剤は、先の風味増強用素材と同様に、そのまま液体の状態で、濃縮してペーストの状態で、または乾燥して粉末の状態で、その他顆粒の状態など、適宜の形態で流通に置くことができる。

【０００８】

20

最後に、前記第三の発明について説明する。

γ - グルタミルシステインを高含有量で含有する、本発明の食品用途酵母（菌体）は、次のようにして作成する。すなわち、まず、グルタチオン合成酵素の遺伝子であるＧＳＨ２を破壊することによってグルタチオン合成酵素が機能しなくなった酵母を作成し、次に、これを常法により培養するのである。

因みに、ＧＳＨ２遺伝子が生育に必須な遺伝子でないことは既に報告されている（Chris M. Grantら、Molecular Biology of the Cell、８巻、１６９９頁から１７０７頁、９月、１９９７年）。生育に必須でない遺伝子の破壊は、公知のごとく１遺伝子の自然突然変異でも容易に生起する現象であることから、本発明の後掲実施例７は、自然な状況下で起こりうる結果の一例であるといえる。

30

また、本発明においては、作製した酵母から実際に酵母エキスを作製し、それがγ - グルタミルシステイン、延いてはシステインを高含有する食品素材であることを明らかに示した。

【０００９】

（発明を実施するための最良の形態）

以下、検査例および実施例により本発明を更に詳しく説明する。

【００１０】

まず、本発明の第一の検査例および実施例を掲げる。

検査例１（加熱によるγ - グルタミルシステインからのシステインの生成）

pHの異なる（すなわち、pH 3、5および7の）還元型γ - グルタミルシステインの１mmol濃度の水溶液を98 で加熱した際の生成システイン量の経時的消長を調べた。結果を後掲図1～3に示す。図中、PCAはピロリドンカルボン酸を、γ - Glu - Cysは還元型γ - グルタミルシステインを、そしてTotal Cysteineはシステインを表す。

40

図1～3より理解されるように、加熱によりγ - グルタミルシステインからシステインが高収率で得られる。

検査例２（酵素によるγ - グルタミルシステインからのシステインの生成）

pHの異なる（すなわち、pH 5、7および9の）還元型γ - グルタミルシステインの１mmol濃度の水溶液に「グルタミナーゼ ダイワ」（大和化成社製グルタミナーゼ、比活性3.0mM/min/mg）を種々の濃度で加え、37 で10分間作用させたとき

50

の生成システインの量を調べた（ γ -グルタミルシステインの加水分解の酵素量依存性）。結果を後掲図4～6に示す。図中、 γ -Glu-Cysは還元型 γ -グルタミルシステインを、そしてTotal Cysteineはシステインを表す。

図4～6より理解されるように、グルタミナーゼにより γ -グルタミルシステインの加水分解にともなってこれから等モルのシステインが得られる（高収率）。

実施例 1

γ -グルタミルシステインを4.5%含有する酵母エキス粉末に水を加え、塩酸でpHを5に調整し、濃度2%の水溶液を作成し、これを98℃で180分間加熱した後凍結乾燥したところ、2.0%のシステイン含有量を有する酵母エキス粉末が得られた。

因みに、この酵母エキス粉末を調味料の製造に用いたところ、良好なローストミートフレーバを有する調味料が得られた。

10

実施例 2

γ -グルタミルシステインを4.5%含有する酵母エキス粉末に水を加え、1N NaOHを用いてpHを7に調整し、濃度2%の水溶液を作成した。この溶液にグルタミナーゼ（検査例2で使用のものと同じ）を1mg/mlの濃度になるように加え、37℃で10分間インキュベートした後凍結乾燥したところ、2.5%のシステイン含有量を有する酵母エキス粉末が得られた。

因みに、この酵母エキス粉末を調味料の製造に用いたところ、実施例1と同様に良好なローストミートフレーバを有する調味料が得られた。

【0011】

20

次に、本発明の第二の実施例および検査例を掲げる。

実施例 3（ γ -グルタミルシステイン）

1N NaOHを用いてpHを5に調整した γ -グルタミルシステインの4%水溶液を98℃で3時間加熱した。加熱後グルコースを溶液に対して4%（ γ -グルタミルシステイン1モル当たり1.4モルに相当する）加えた（風味増強用素材）。これを60℃で180分間加熱した後凍結乾燥した（風味増強剤）。

このようにして得られた凍結乾燥物（本発明の食品の風味増強剤）を用いて市販ビーフコンソメスープの系における官能評価を実施した。本凍結乾燥物は、市販ビーフコンソメスープの固形分に対して0.05%になるように添加し、無添加のものを対照として15名のパネルにより、各評価項目について、より好ましい方またはより強い方を選択させる方法で評価を行った。

30

結果を下記第1表に示す。表中の人数は、より好ましいまたはより強いとして選択したパネル員の人数である。

第1表：評価結果

0.05%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	15人	0人
肉風味の好ましさ	14人	1人
風味全体の強さ	13人	2人
風味全体の好ましさ	12人	3人
総合評価	13人	2人

40

実施例 4（ γ -グルタミルシステイン）

1N NaOHを用いてpHを7に調整した γ -グルタミルシステインの4%水溶液に1mg/mlとなるようにグルタミナーゼを加え、37℃で2時間インキュベートした。反応後グルコースを溶液に対して4%（ γ -グルタミルシステイン1モル当たり1.4モルに相当する）加えた（風味増強用素材）。これを60℃で180分間加熱した後凍結乾燥

50

した（風味増強剤）。

このようにして得られた凍結乾燥物（本発明の食品の風味増強剤）を用いて市販ビーフコンソメスープの系における官能評価を実施した。本凍結乾燥物は、市販ビーフコンソメスープの固形分に対して0.05%になるように添加し、無添加のものを対照して15名のパネルにより、各評価項目について、より好ましい方またはより強い方を選択させる方法で評価を行った。

結果を下記第2表に示す。表中の人数は、より好ましいまたはより強いとして選択したパネル員の人数である。

第2表

0.05%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	15人	0人
肉風味の好ましさ	15人	0人
風味全体の強さ	12人	3人
風味全体の好ましさ	14人	1人
総合評価	13人	2人

10

実施例5（酵母エキス）

γ -グルタミルシステインを4.5%含有する酵母エキスの、1N NaOHを用いてpHを5に調整した20%水溶液（この水溶液における γ -グルタミルシステインの濃度は、0.9%）を98で3時間加熱した。加熱後グルコースを溶液に対して1.8%（対 γ -グルタミルシステイン1モル当たり2.8モルに相当する）加えた（風味増強用素材）。これを実施例3におけると同じように加熱した後濃縮してからスプレードライした（風味増強剤）。

本乾燥物（本発明の食品の風味増強剤）を用いて（a）市販ビーフコンソメスープ、（b）カレーおよび（c）すまし汁の各系における官能評価を実施した。結果を下記第3表に示す。なお、本乾燥物は、固形分に対して表に示す量添加し、無添加のものを対照として、15名のパネルにより実施例3におけると同様にして評価を行ったものである。

20

30

第3表：評価結果

(a) ビーフコンソメスープ

0.05%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	14人	1人
肉風味の好ましさ	13人	2人
風味全体の強さ	12人	3人
風味全体の好ましさ	13人	2人
総合評価	13人	2人

10

(b) カレー

0.1%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	13人	2人
肉風味の好ましさ	12人	3人
風味全体の強さ	13人	2人
風味全体の好ましさ	12人	3人
総合評価	13人	2人

20

(c) すまし汁

0.1%添加	本発明	対照
だし風味の強さ	15人	0人
だし風味の好ましさ	14人	1人
風味全体の強さ	14人	1人
風味全体の好ましさ	13人	2人
総合評価	14人	1人

30

実施例6（酵母エキス）

γ-グルタミルシステインを4.5%含有する酵母エキスの、1N NaOHを用いてpHを7に調整した20%水溶液（この水溶液におけるγ-グルタミルシステインの濃度は、0.9%）にグルタミナーゼを1mg/mlとなるように加え、37℃で2時間インキュベートした。反応後グルコースを溶液に対して1.8%（対γ-グルタミルシステイン1モル当たり2.8モルに相当する）加えた（風味増強用素材）。これを実施例3におけると同じように加熱した後濃縮してからスプレードライした（風味増強剤）。

本乾燥物（本発明の食品の風味増強剤）を用いて（a）市販ビーフコンソメスープ、（b）カレーおよび（c）すまし汁の各系における官能評価を実施した。結果を下記第4表に示す。なお、本乾燥物は、固形分に対して表に示す量添加し、無添加のものを対照として、15名のパネルにより実施例3におけると同様にして評価を行ったものである。

40

第4表：評価結果

(a) ビーフコンソメスープ

0.05%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	12人	3人
肉風味の好ましさ	14人	1人
風味全体の強さ	12人	3人
風味全体の好ましさ	14人	1人
総合評価	14人	1人

10

(b) カレー

0.1%添加	本発明	対照
肉風味の強さ	12人	3人
肉風味の好ましさ	13人	2人
風味全体の強さ	12人	3人
風味全体の好ましさ	12人	3人
総合評価	13人	2人

20

(c) すまし汁

0.1%添加	本発明	対照
だし風味の強さ	15人	0人
だし風味の好ましさ	15人	0人
風味全体の強さ	14人	1人
風味全体の好ましさ	15人	0人
総合評価	15人	0人

30

検査例3

γ-グルタミルシステインの4%溶液にグルコースを4%加え、pH5に調整してから98℃で3時間加熱した後直ちに凍結乾燥した。

このようにして得られた凍結乾燥物の試料(比較試料)および上掲実施例3で調製した本発明の風味増強剤(凍結乾燥物=本発明試料)を用い、市販ビーフコンソメスープの系に添加し官能評価を実施した。これら2種類の凍結乾燥物の試料は、市販ビーフコンソメスープの固形分に対して0.05%になるように添加し、15名のパネルによる比較評価を行った。すなわち、上記2種類の試料について下記第5表の欄外に示す評価基準により各評価員に採点させ、その平均点を取った。

40

第5表：評価結果

0.05%添加	比較試料	本発明試料
コゲ臭の強さ	4.6	4.2
肉風味の強さ	4.3	4.6
風味全体の強さ	4.4	4.8
風味全体の好ましさ	4.2	4.6

10

< 評価基準 >

評点 5：非常に強い、または好ましい

4：強い、または好ましい

3：やや強い、またはやや好ましい

2：やや弱い、またはやや好ましくない

1：弱い、または好ましくない

【0012】

最後に、本発明の第三の実施例を掲げる。

実施例7

20

(a) γ -グルタミルシステインを乾燥菌体重量あたり1%以上含有する食品用途酵母の育種について以下に説明する。

γ -グルタミルシステインは、酵母の細胞内代謝においてはグルタチオン(GSH)生成の1歩手前の中間代謝産物として存在する。 γ -グルタミルシステインをグルタチオンに変換する酵素はグルタチオンシンターゼである。そこで、グルタチオンシンターゼの遺伝子(以下、GSH2)の機能を失わしめることにより、 γ -グルタミルシステインを食品用途酵母細胞内に蓄積させることを試みた。

(1) GSH2遺伝子の機能を失わしめる方法として、一段遺伝子破壊法(one-step-gene-disruption法)を行った。まず、このために必要なGSH2遺伝子破壊カセットの調製を行った。

30

詳述すると、市販食品用途酵母(パン酵母) *Saccharomyces cerevisiae* に常法により胞子を形成させ、得られた胞子を発芽させて得た株の1株(これをH4株と称する)のGSH2遺伝子上流領域からGSH2遺伝子末端までの領域をPCR法により増幅した。条件は下記第6表に示す通り。

第6表

酵母染色体遺伝子	1 μ l
10X PCR buffer	10 μ l
10mM dNTPs	10 μ l
10pmol/ μ l GAL11F (7°ライマー)	1 μ l
配列: 5'-TATGAAGACTGTACAGTCTCC-3' (後掲配列番号1の配列)	
10pmol/ μ l GSH2R3 (7°ライマー)	1 μ l
配列: 5'-CCGGGAGCTCAGCTAAATG GTGTACTTCGCTAC-3' (後掲配列番号2の配列)	
miliQ水	76 μ l
Taq polymerase	1 μ l
合計	100 μ l

備考: 94℃、1 min-94℃、30 sec-60℃、40 sec-
74℃、1 min 30 secを30サイクル繰り返す。

このようにして増幅した遺伝子断片 (GSH2) を、常法によりプラスミド pGEM-Easy (Promega 社) に連結させてクローン化した (以下、GSH2/pGEM)。

同様にして one-step-gene-disruption 法に用いる選択遺伝子マーカーとして、URA3 遺伝子も PCR 法によって増幅した。条件は下記第7表に示す通り。

第7表

10ng/ μ l pYES2 (Invitrogen 社)	1 μ l
10X PCR buffer	10 μ l
10mM dNTPs	10 μ l
10pmol/ μ l URA3F2 (7°ライマー)	1 μ l
配列: 5'-ATTAACCCGGGTTGATTCGGTAATCTCCG-3' (後掲配列番号3の配列)	
10pmol/ μ l URA3R2 (7°ライマー)	1 μ l
配列: 5'-ATTAACCCGGGGTTTTTAGTTTTGCTGGC-3' (後掲配列番号4の配列)	
miliQ水	76 μ l
Taq polymerase	1 μ l
合計	100 μ l

備考: 94℃、1 min-94℃、30 sec-52℃、30 sec-
74℃、40 secを30サイクル繰り返す。

続いて、GSH2/pGEM を制限酵素 MunI で切断し、常法により遺伝子末端を平滑化した。その切断末端に、制限酵素 SmaI で遺伝子末端を平滑化した URA3 遺伝子を常法によりライゲーションを行い導入した (以下、URA3-GSH2/pGEM)。
URA3-GSH2/pGEM を鋳型として、GSH2 の両端をコードする遺伝子プライマー (上述 GAL11F、GSH2R) を用いて PCR を行い、GSH2 遺伝子破壊カセ

10

20

30

40

50

ットを調製した。P C R の条件を下記第 8 表に示す。

第 8 表

10ng/ μ l URA3-GSH2/pGEM	1 μ l
10X PCR buffer	10 μ l
10mM dNTPs	10 μ l
10pmol/ μ l GAL11F (プライマー)	1 μ l
配列：前に記載(後掲配列番号1の配列)	
10pmol/ μ l GSH2R (プライマー)	1 μ l
配列：5'-AGCTAAATGGTGTACTTCGCTAC-3' (後掲配列番号5の配列)	
miliQ水	76 μ l
Taq polymerase	1 μ l
合計	100 μ l

備考：94℃、1 min-94℃、30 sec-56℃、30 sec-
74℃、1 minを30サイクル繰り返す。

(2) 以上の方法で調製したGSH2遺伝子破壊カセット(以下、URA3-GSH2)を用いて、食品用途酵母H4株のGSH2遺伝子破壊を行った。

まず、H4株を3mlのYPD培地中で24時間、30 で振とう培養して前培養を行った。その培養菌体液1mlを50mlのYPD培地中に移し、対数増殖期まで培養した後、1Mソルビトールに懸濁した状態にURA3-GSH2を混和して常法によりエレクトロポレーションを行って、GSH2遺伝子が破壊カセットに入れ替わったH4株(以下、H4-GSH2)を取得した。

(b) γ -グルタミルシステインを乾燥菌体重量あたり1%以上含有する食品用途酵母の培養は、以下のようにして行った。

H4-GSH2株を、グルタチオンを1mM含む3mlの合成最少培地で24時間、30 で振とう培養して前培養を行った。その培養菌体液1mlを5mMのシステインを含む50mlの合成最少培地中に移し、48時間の培養を行うことにより菌体を取得した。この菌体を蒸留水で3回洗浄した後、これを70 で10分間の抽出処理に付して細胞内容物を抽出した。

これを遠心処理し、得られた上清(酵母エキス抽出液)中の γ -グルタミルシステイン含量を測定した。その結果得られた酵母乾燥菌体あたりの γ -グルタミルシステイン含量を図7に示す。なお、乾燥菌体重量は、一定培地中に含まれる酵母菌体を濾紙上に取り、105 で4時間加熱後に残った菌体重量をもって測定した。

さらに、上記酵母エキス抽出液を常法により凍結乾燥して粉末にした後、その粉末20.2mgを1mlの水に溶かし、溶液のpHを5に合わせた。その一部を98 で3時間加熱し、加熱前および加熱後の酵母抽出物(酵母エキス)中の γ -グルタミルシステインおよびシステインの含量を測定した。結果を図8に示す。

上記図7および図8において、Total Cysteineはシステインを、 γ -Glu-Cysは還元型 γ -グルタミルシステインを、そしてGSHはグルタチオンを表す。なお、本発明の製造法によって得られる γ -グルタミルシステインを高含有量で含有する酵母菌体や酵母エキスは、本発明に係わる食品素材、食品の風味増強用素材または食品の風味増強剤の製造原料として使用することができるばかりでなく、その他の用途における γ -グルタミルシステインまたはシステインの優れたソースとなり得ることはいうまでもない。

【 0 0 1 3 】

(産業上の利用可能性)

本発明によれば、食品の風味改善などに有用なシステイン高含有酵母エキスなどのシステイン高含有天然食品素材を容易に得ることができる。

本発明によれば、また、焦げ臭が強いなどの問題点を免れた、飲食品にビーフフレーバーや鰹節フレーバー等の風味を増強する食品の風味増強用素材や風味増強剤を容易に得ることができる。

本発明に係わる方法によれば、さらにまた、 γ -グルタミルシステインを高含有量で含有する酵母菌体を容易に得ることができる。

【配列表】

10

配列表
Sequence Listing

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> 食品の風味増強用素材の製造法

<130> DF26PCT/B508

<150> JP 10-335385

20

<151> 1998-11-26

<150> JP 10-335386

<151> 1998-11-26

<150> JP 11-194172

<151> 1999-07-08

<150> JP 11-194209

<151> 1999-07-08

30

<160> 5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 1

40

tatgaagact gtacagtctc c

21

<210> 2

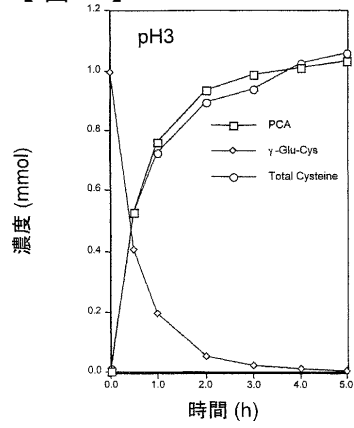
<211> 34

<212> DNA

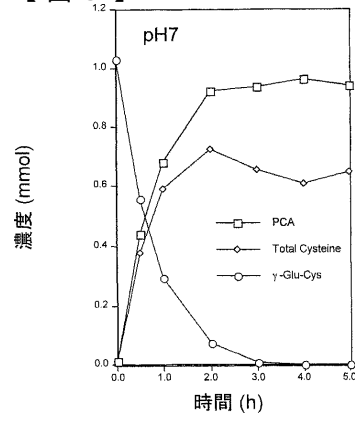
<213> Artificial Sequence

<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 2		
ccggggagct cagctaaatg gtgtacttcg ctac	34	
<210> 3		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 3		
attaaccggt gttgattcgg taatctcgc	29	
<210> 4		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 4		
attaaccggt ggTTTTTTtag ttttgctggc	30	
<210> 5		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: primer		
<400> 5		
agctaaatgg tgtacttcgc tac	23	

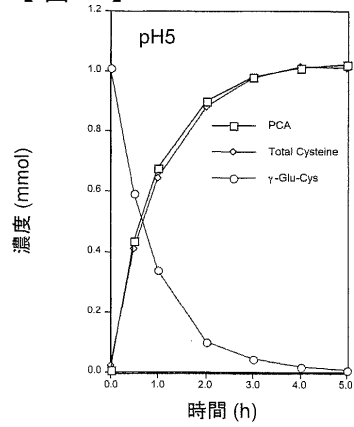
【図 1】



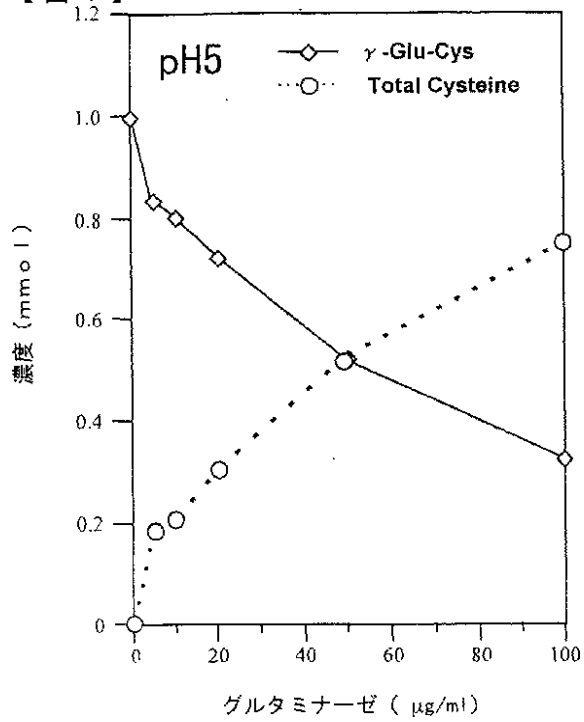
【図 3】



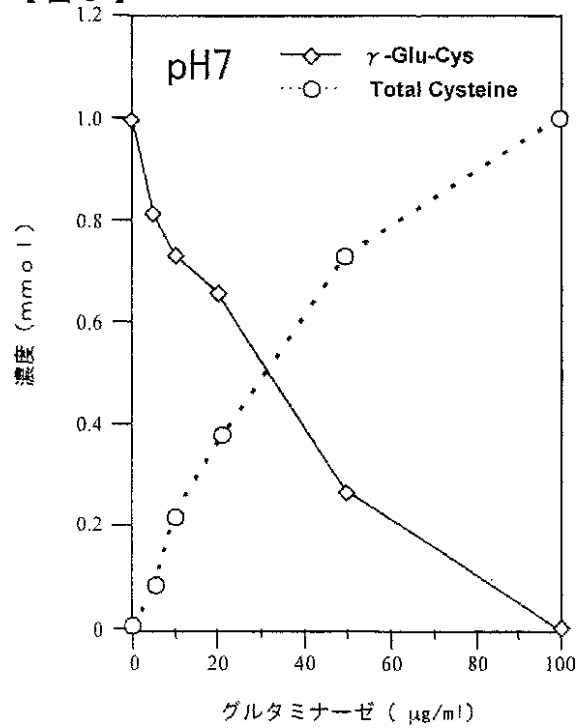
【図 2】

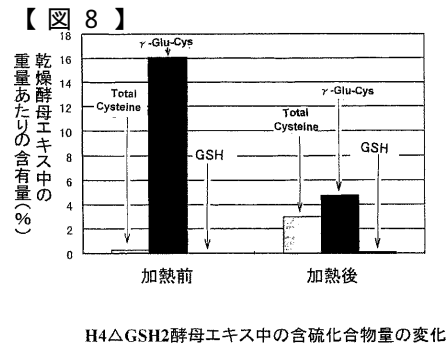
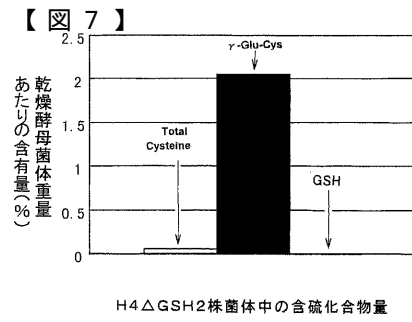
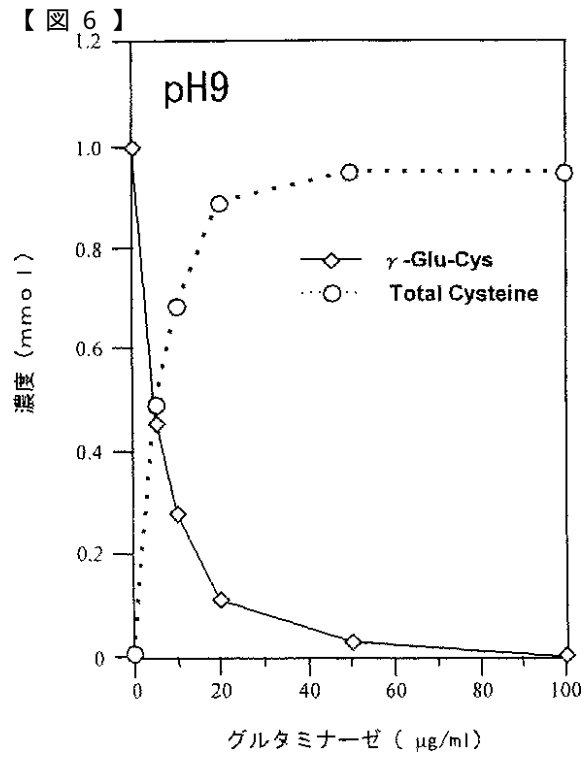


【図 4】



【図 5】





フロントページの続き

(31)優先権主張番号 特願平11-194209

(32)優先日 平成11年7月8日(1999.7.8)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(72)発明者 佐野 公一朗

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社 食品研究所内

(72)発明者 川口 宏和

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社 食品研究所内

(72)発明者 日比野 岳

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社 食品研究所内

(72)発明者 杉本 玲子

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社 食品研究所内

(72)発明者 西内 博章

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社 食品研究所内

(72)発明者 若松 秀彦

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社 食品研究所内

(72)発明者 石黒 恭佑

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社 食品研究所内

(72)発明者 上田 要一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社 食品研究所内

審査官 ▲高▼ 美葉子

(56)参考文献 米国特許第 0 3 3 9 4 0 1 5 (U S , A)

特開平 0 8 - 2 2 8 7 1 4 (J P , A)

特開平 0 4 - 0 6 6 0 6 9 (J P , A)

特開平 0 4 - 0 9 1 7 6 2 (J P , A)

バイオサイエンスとインダストリー, Vol.50, No.10(1992), p.989-994

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A23L 1/28

A23L 1/221

A23L 1/226

A23L 1/231

食品関連文献情報(食ネット)

JICSTファイル(JOIS)

WPI(DIALOG)

FOODLINE(DIALOG)

Foods Ad Libra(DIALOG)

Food Sci.&Tech.Abs(DIALOG)