

新規の γ -アミノ酪酸高生産菌の検索及び食品加工残渣への応用

細井永次*

Isolation of New γ -Aminobutyric Acid-producing Bacteria and Application to Food processing Residues

HOSOI Eiji*

抄録

県内食品工場の発酵食品から、血圧降下作用等の生理活性がある γ -アミノ酪酸を生産する乳酸菌を分離した。この乳酸菌を利用し、パンくず、オカラ等の食品加工残渣にグルタミン酸を添加し発酵させ、 γ -アミノ酪酸を豊富に含んだ発酵食材を試作した。

キーワード γ -アミノ酪酸, GABA, 乳酸菌, 食品加工, 残渣

1 はじめに

乳酸菌は、乳酸発酵によりヨーグルト、漬け物などの発酵食品に利用され、古来より、多様な食文化の形成や健康に貢献してきた。一方で、食文化の発達により、多量の食品加工残渣が食品製造工場等から廃棄されているが、乳酸菌の生育に利用可能な栄養成分が含まれたままである。

そこで、筆者は生理活性物質の一つである γ -アミノ酪酸（以下、GABA）を生産する乳酸菌（以下、GABA高生産菌）が発酵食品から発見されていることから^{1), 2)}、新規のGABA高生産菌を見だし、食品加工残渣への利用方法を検討した。GABAとはアミノ酸の一種で、グルタミン酸を原料にグルタミン酸脱炭酸酵素の働きで生産される。血圧降下作用や利尿作用³⁾、ストレス低減作用⁴⁾などが報告されており、現在、特定保健食品等としてGABAを含む食品が数多く製品化されている。

本研究では、まず主に県内の発酵食品の製造工場及びその製品から乳酸菌を分離し、GABA高

生産能を有する乳酸菌の検索、同定及び性質の把握を行い、食品工場等の製造過程で発生する残渣等から容易にGABAを生産する方法について検討した（図1）。

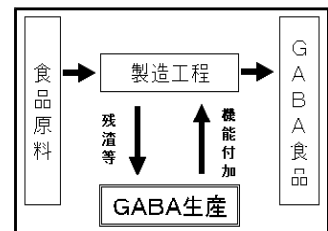


図1 残渣利用の概念図

2 実験方法

2.1 乳酸菌の分離・培養

発酵食品からGABA高生産菌を分離するために、関東化学製 L-グルタミン酸ナトリウム一水和物（以下、MSG）を1%及び共存微生物の生育を抑制する目的でシクロヘキシミドとアジ化ナトリウムをそれぞれ10mg/L添加したGYP寒天培地を使用し、30℃で72時間嫌気培養を行った。

2.2 GABA高生産菌の分離

GYP寒天培地に生育したコロニーは、それぞれ1%MSG含有GYP液体培地（ダーラム管入り試験管）に接種し、30℃で72時間静置培養を行った。そして、GABA高生産菌がMSGをGABAに変換するとき二酸化炭素を発生させるメ

* 北部研究所 生物工学部

カニズムを利用し、ダーラム管にガスが充満したものを選抜した。次に、選抜した菌株について、薄層クロマトグラフィー(以下、TLC)を行い、GABAが検出された株を選抜した。最後に、高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLC)によりアミノ酸分析を実施し、MSG及びGABAの濃度を定量し、MSGからGABAの変換率が90%以上のものをGABA高生産菌とした。

2.3 GABAの定性分析

ワットマン社製 Partisil K6F Sillica Gel60 ÅのTLCを使用し、展開溶媒として(1-ブタノール:酢酸:水 = 3:2:1 (v/v/v))²⁾に、アミノ酸発色試薬としてニンヒドリンを0.05%(w/v)添加して使用した。

2.4 GABAの定量分析

フェニルイソチオシオナートによるプレカラム誘導体化法によりHPLCで定量した。分離にはWakosil-PTC(4.0mm×250mm)を用い、溶離液Bを30分間で3%から48%(A:0.01M酢酸ナトリウム、B:アセトニトリル)の濃度勾配で行った。アミノ酸は紫外波長254nmで誘導体化アミノ酸を測定した。

2.5 GABA高生産菌の同定

グラム染色、細胞の形態観察、カタラーゼ試験、運動性試験、グルコースからのガス発生、初発pH、生育温度及び芽胞の形成試験は乳酸菌実験マニュアル⁵⁾のとおり行った。また、糖の資化性試験は、ビオメリュ社製アピ50CH+アピ50CHL培地(以下、アピキット)により行った。またS29、K14a及びK35株については16S rRNA配列解析により菌種の同定を行った。

2.6 菌数の測定

乳酸菌は日水製薬製BCP加プレートカウントアガール(30℃、48時間嫌気培養)、酵母はクロラムフェニコールを0.05%添加した日水製薬製ポテトデキストロース寒天培地(30℃、48時間培養)そして大腸菌は栄研化学製パールコアデスオキシコーレイト培地(35℃、20時間培養)を使用して、それぞれ計数した。また、標準寒天培地(60℃で10

分間湯煎後35℃、48時間培養)を使用し、生育したコロニーを計数し枯草菌等とした。

2.7 比較実験条件

既知のGABA高生産菌である*Lactobacillus brevis* NBRC12005(以下、*L.b.*)¹⁾との比較実験は以下のとおり行った。

培養はGYP液体培地を使用し、実験条件に応じてMSGや塩化ナトリウム(以下、NaCl)等を添加し、30℃、72時間の静置培養を行った。

生育速度は、アドバンテック東洋製振とう温度勾配培養装置TN-2612を使用し、生育速度を付属の濁度計(OD⁶⁶⁰nm)で自動測定した。

2.8 食品加工残渣への添加実験

2.8.1 標準条件

食品加工残渣に対して、GYP液体培地で1日間前培養した培養液を1%(V/W)及びMSG3%(W/W)添加し、30℃で72時間の静置培養した(ただし1日2回攪拌)。

2.8.2 食品加工残渣の調達

パンくずは小麦粉100gに対し、水60g、食塩2g、砂糖2g及び市販酵母(日清スーパーカメラ、以下同様)で発酵させ焼いたパンを使用した。

オカラは、市販の生オカラ(pH7.0、水分量77.2%(W/W)、枯草菌等10⁵CFU/g、大腸菌群不検出)を使用した。

2.8.3 パンの試作

小麦粉100gに対し、水60g、砂糖2g、市販酵母1g及びGABA高生産菌の前培養液1mLを添加し、28℃で48時間発酵させ培養液とした。次に、パンくず100gに対し水100mL、培養液30g及びMSG6gを添加し、28℃で72時間培養しGABA含有パン種とした。最後に、小麦粉100gに対し、GABA含有パン種5g、水55g、食塩2g、砂糖2g及び市販酵母で発酵させ、パンを焼いた。

3 結果及び考察

3.1 探索結果

発酵食品については、ぬか漬、キムチ、ヨーグルト等から、食品工場については、漬物、醤油製

造工場から採取した。また、過去に採取した当所保存の乳酸菌株も調査した。

その結果、試料数 171、分離菌株数約 2000 から、4 株の GABA 高生産菌を得た (表 1)。S29 は乳製品、K14a と K14b は生醤油そして K35 は醤油もろみ由来であった。

表 1 GABA 高生産菌の探索結果

由来	試料数	高生産菌数	分離菌株・命名
発酵食品	60	1	S29
食品工場 所有菌株	71	3	K14a, K14b, K35
合計	171	4	—

D-Xylose	+	+	+	+
β-Methyl-D-xyloside	-	+	+	-
D-Galactose	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+
D-Mannitol	-	+	-	-
α-methyl-D-glucoside	+	+	+	+
Amygdalin	-	+	-	-
Arbutin	-	+	-	-
Esculin	+	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+
Trehalose	-	+	+	-

*どの菌も資化しなかった糖は記載省略

3.2 同定結果

分離した GABA 高生産菌は、全てグラム陽性の短桿菌、カタラーゼ反応陰性、運動性なし、そしてグルコースから酸を生産する等、*Lactobacillus* 属乳酸菌の性質を示した (表 2)。また、グルコースを資化してガスを発生し、アルコールを生産することからヘテロ発酵性と推定された。

表 2 GABA 高生産菌の乳酸菌実験

特徴	S29	K14a	K14b	K35
グラム染色	+			
細胞形	short rod			
平均的なサイズ (μ m)	1.8 $\times 0.9$	1.4 $\times 0.7$	1.4 $\times 0.7$	1.2 $\times 0.6$
カタラーゼ反応	-			
運動性	-			
glucose からガス発生	+			
初発 pH	3.5			
15/45 °C での生育	+/-			
孢子形成	-			

次に、アピキットにより、糖の資化性がそれぞれ異なることが判った (表 3)。また、ApiWeb (同社の同定用データベース) により、高い確率で S29、K14a、K14b 及び K35 は *Lactobacillus brevis* 3 と同定された (表 4)。さらに、S29、K14a 及び K35 について 16S rRNA の塩基配列を分析したところ、*Lactobacillus brevis* と 100%一致した。ただし、各菌株は糖資化性や、後述するとおり生化学的性質が異なっていた。

表 3 GABA 高生産菌の糖資化性

炭水化物	S29	K14a	K14b	K35
L-Arabinose	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+

表 4 糖資化性による菌種の同定

菌名	分類群	一致率
S29	<i>Lactobacillus brevis</i> 3	99.1
K14a	↑	99.8
K14b	↑	98.8
K35	↑	96.3

3.3 GABA 高生産菌の性質

3.3.1 生育速度及び耐塩性の比較

各 GABA 高生産菌について、生育速度を比較した。菌液を 10^{-3} CFU/mL になるように培地に添加し培養を行った。その結果、K14a が最も速い生育を示した (図 2)。

次に、GABA 生産量を比較した。その結果、72 時間後は、全て 90% 以上の変換率であったが、36 時間後を比較すると、もともと生育速度の速かった K14a が最も変換率が高かった (図 3)。

また、初発 MSG に対し、72 時間後の MSG と GABA のモル分率の和を計算すると 97% 以上が保持されており、MSG のほぼ全量が GABA に消費されたことが判った (図 3)。

また、高塩濃度の食品加工残渣を想定し、耐塩性を比較した。培地の NaCl を 6%、菌液を 10^{-5} CFU/mL になるように添加し培養を行ったところ、K14a が最も耐塩性が高かった (図 4)。

GABA 生産に及ぼす NaCl の影響を比較した。その結果、K14a で 4.5%、S29 及び *L.b.* では 4% が高生産可能な上限であった (図 5)。

以上のことから、食品加工残渣には、生育速度・耐塩性が共に最も高かった K14a を用いて試作

等を行った。

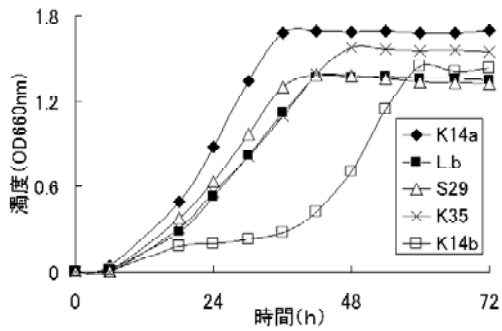


図2 GABA高生産菌の生育速度

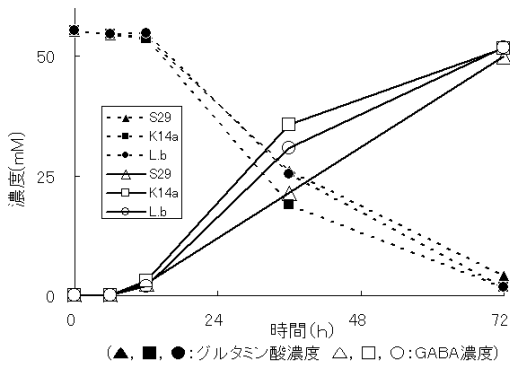


図3 GABAとグルタミン酸の相関性

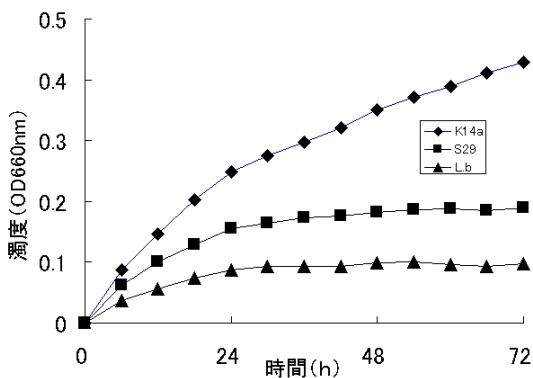


図4 生育に及ぼすNaClの影響 (濃度 6%)

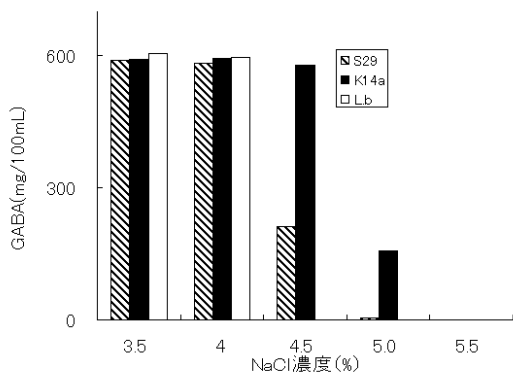


図5 GABA生産に及ぼすNaClの影響

3.4 培地の高pH化および対策

GABA高生産菌がMSGからGABAを生産する過程で培地のpHが上昇し、雑菌の生育を抑制できなくなる恐れがあった。そのため、GABA非生産乳酸菌との混合培養を検討した。そこで、ラッキョウの漬け汁から採取し、多くの糖を資化し(アピキット49種中24種、データ省略)、乳酸を多く生産した乳酸菌を選択した(以下、RA)。なお、RAの16S rRNAの塩基配列は、*Lactobacillus zae*と100%一致した。

K14aとRAを混合培養したところ、pHの上昇が抑制され(図6)、なおかつ、GABA生産能力に影響がないことが確認された(表5)。

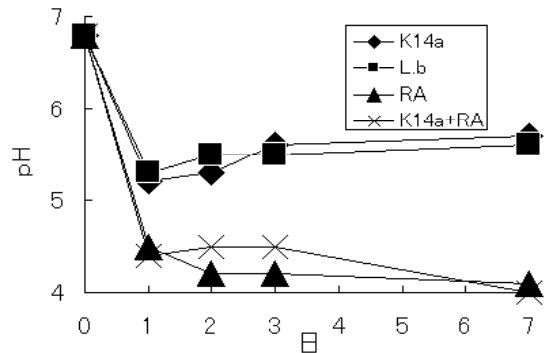


図6 pHの上昇抑制効果

表5 乳酸菌RA添加の影響

実験項目 (72時間後)	K14a	RA	K14a+RA
pH	5.6	4.2	4.5
乳酸菌数 (10 ⁹ CFU/mL)	2.1	2.5	4.3
GABA変換率 (%)	100	0	99
乳酸生産量 (g/100mL)	0.47	1.41	1.19

3.5 食品加工残渣への応用

3.5.1 パンくずへの応用と試作

標準条件(ただし、パンに水を同量添加)では、パンくずは資化されず、GABAもほとんど生産されなかった。そのため、酵母でパンくずを分解する方法を検討した。実験方法2.8.3のとおり、パンくずを利用してパン種を調製したところ、K14aのパン種において、MSGからGABAへの変換率はほぼ100%であった(表6)。

また小麦粉に対して5%(W/W)のK14aパン種

を添加してパンを試作したところ、GABAを48mg/100mg含有するパンができた。

表6 GABA含有パン種

実験項目 (72 時後)	K14a	<i>L.b.</i>
乳酸菌数 (10 ⁹ CFU/mL)	2.4	2.2
酵母数 (10 ⁷ CFU/mL)	2.7	2.5
枯草菌等	不検出	不検出
大腸菌群	不検出	不検出
pH	4.1	4.1
GABA (mg/100g)	1030	234
MSG (mg/100g)	<5	902

3.5.2 オカラへの応用

標準条件では、K14aにおいてGABAが*L.b.*より高い205mg/100g生産されたが、pHは中性で、強い悪臭を感じた。次に、RAを添加して同様に培養したところ、GABAの生産量が610mg/100gに上昇し、異臭も感じなかった。しかしながら、pHが6.1と高く、大腸菌群の生育は抑制できたが、枯草菌等の増殖は抑制できなかった。(表7)。したがって、簡易な方法でオカラにGABA生産菌を応用する場合、事前に加熱殺菌する等の対策が必要であった。

表7 GABA含有オカラ

実験項目 (72 時間後)	K14a	<i>L.b.</i>	K14a+RA
乳酸菌数 (10 ⁹ CFU/mL)	1.6	2.1	1.5
枯草菌等 (10 ⁷ CFU/mL)	2.2	1.7	0.9
大腸菌群 (10 ⁵ CFU/mL)	4.4	4.4	不検出
pH	6.9	6.9	6.1
GABA (mg/100g)	205	130	610

4 まとめ

(1)発酵乳、生醤油及び醤油もろみから4種のGABA高生産乳酸菌を分離した。これらは、全て*Lactobacillus brevis*であったが、K14aが最も高い生育速度と耐塩性を示した。

(2)分離したGABA高生産菌は、グルコースを資化し、MSGが無くても生育した。

(3)衛生管理上問題となるGABA生産時のpH上昇は、GABA非生産乳酸菌を同時添加することにより防げた。

(5)GABAを高生産する場合、食品加工残渣の性質に合わせた工夫が必要であった。

①パンくずに応用する場合、酵母を同時添加することが有効であった。

②オカラに応用する場合は、GABAの生産性を高めるにGABA非生産乳酸菌を用いることが有効であった。また、大腸菌群の抑制に効果的であったが、すでに枯草菌等が繁殖していた場合、効果がなかった。

本実験条件 (GYP液体培地、30℃で72時間静置培養)でのK14aのGABA生産能力は、*L.b.*についてはすでに報告²⁾されているように、MSGの濃度によらず100mM～120mM程度が上限であった。したがって、その性質を利用し、MSGとGABAの濃度の比率をコントロールする方法が考えられる。また、加熱殺菌等せずに、乳酸菌の生育条件を最適化し、雑菌の繁殖を抑える方法についても検討したい。

謝辞

本研究を行うにあたり、発酵食品を提供して下さった企業の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 早川 潔, 上野義栄, 河村眞也, 谷口良三, 小田耕平: 生物工学会誌, **75**,(1997)239
- 2) 上野義栄, 平賀和三, 森 義治, 小野耕平: 生物工学会誌, **85**,(2007)109
- 3) Stanton,H.C.: *Arch. Int. Pharmacod.*,**143** ,(1963) 195
- 4) 岡田忠司, 杉下朋子, 村上太郎, 村井弘道, 三枝貴代, 堀野俊郎, 小野田明彦, 梶本修身, 高橋 励, 高橋丈夫: 日食工誌,**47**,(2000)596
- 5) 小崎道雄, 内村 泰, 岡田早苗: 乳酸菌実験マニュアル, 朝倉書店 (1992)