乳酸菌休止菌体を用いた味噌における γ -アミノ酪酸の生成

近年、 γ -アミノ酪酸 (GABA) は、抑制性の神経伝達物質で、血圧降下作用や精神安定効果など、様々な健康効果をもたらすことが確認されている。このため、GABA 含量の多いキャバロン茶、発芽系米、乳酸菌発酵飲料等も注目されている。今回、著者には、味噌に乳酸菌休止菌体を用いて GABA を生成させる方法について、詳しく解説いただいた。

岸 本 憲 明

はじめに

γ -アミノ酪酸 (GABA) は天然に広く存在する非タンパク性のアミノ酸で、ヒトなど哺乳動物の小脳などに存在して、抑制性神経伝達物質として機能している¹⁾。具体的には、血圧降下作用や精神安定効果などが注目されており、高血圧症や脳血流の改善による不眠や鬱などの予防、さらに腎機能改善効果が期待されている。一般に GABA は 1 日に 20 mg 以上の摂取で効果があると言われている²⁾。

茶 (*Camellia sinensis*) 葉を嫌気処理して作成したギャバロン茶³⁾には、通常のお茶の約 30 倍の GABA が含まれており、また玄米を水に浸漬して胚を発芽させると、GABA 濃度が上昇することが報告されている⁴⁻⁵⁾。最近では GABA 濃度を高めた乳酸菌発酵飲料が特定保健用食品として認可され、注目を集めている⁶⁾。

L-グルタミン酸脱炭酸酵素が L-グルタミン酸を GABA に変換することから、著者は L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性の高い微生物と L-グルタミン酸を発酵食品に添加してインキュベートすれば、発酵食品中に GABA が生成、蓄積すると考えた。

乳酸菌は発酵食品や飲料の製造に深く関わっていて、古来より人は乳酸発酵を行わせて食品に保存性と風味を付与してきた。これら乳酸菌の中から L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性の高い株が単離されている。たと

えば、ヨーグルトやキムチの製造に用いられている *Lactobacillus hilgardii*⁷⁾, *Streptococcus thermophilus* と *Lactobacillus delbrueckii*⁸⁾, および *Lactobacillus brevis*⁹⁾ からは高い酵素活性をもつ株が分離されているが、味噌や醤油などの製造に関与している耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* からは、L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性の高い株はまだ報告されていない。

そこで本研究では、多くの市販味噌とほぼ同じ塩分、つまり 12% (w/w) NaCl 存在下でも生育できる乳酸菌を耐塩性乳酸菌と定義し、まず味噌製造に使用されている *T. halophilus* と市販および自家製味噌から単離した耐塩性乳酸菌、市販の醤油醸造用乳酸菌群を対象に、L-グルタミン酸を GABA に変換できる株をスクリーニングした。しかし、供試株の中から変換活性の高い株を見いだすことができなかった。

つぎに、高い L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性をもつと報告されている非耐塩性乳酸菌 *L. brevis*⁹⁾ の休止菌体を 12% (w/v) NaCl を含む L-グルタミン酸 Na (L-Glu Na) 溶液中でインキュベートすると、GABA が生成されることを見いだした。そこで、L-Glu Na 添加培地で前培養した *L. brevis* 凍結乾燥菌懸濁液 (0.5 g/ml) と L-Glu Na (80 mg) を市販味噌 8 g に添加して 7 日間インキュベートしたところ、味噌 1 g あたり 1.8~2.3 mg の GABA が生産されたので、それらの結果を紹介する。

Production of γ -aminobutyric acid using resting cells of a lactic acid bacterium in Miso
Noriaki KISHIMOTO (Department of Applied Biological Chemistry, School of Agriculture, Kinki University)

1. 味噌醸造用乳酸菌と味噌から単離した乳酸菌のL-グルタミン酸脱炭酸酵素活性

供試味噌 11 点（アルコール無添加市販味噌 6 点と自家製味噌 5 点）から 50 株の耐塩性乳酸菌を分離した。供試味噌はいずれも赤色辛系の米味噌で、NaCl 濃度は 11~14% (w/w) であった。*T. halophilus* No. 3 と醤油醸造用乳酸菌群は長野県味噌工業協同組合連合会と株式会社ピオックから分譲を受けた。供試株はいずれも 12% (w/v) NaCl 添加 Lactobacilli MRS Broth (MRS 培地, Difco 社製) と 12% (w/v) NaCl を含む大豆抽出液添加 MRS 培地に生育できなかった。大豆抽出液添加 MRS 培地は次のように調製した。大豆 400 g を水 1600 ml 中に 18 h 浸漬後、105°C で 60 min 間加熱し、ろ液を遠心分離 (8000 rpm, 20 min) した。この上清を大豆抽出液とし、これに NaCl と Lactobacilli MRS Broth を添加して大豆抽出液添加 MRS 培地とした。醤油醸造用乳酸菌群からは、特徴の異なる複数のコロニーが出現したが、本実験では単離せずに多種類の微生物が混在している微生物群集として取り扱った。

分離株 50 株と *T. halophilus* No. 3, 醤油醸造用乳酸菌群は、12% (w/v) NaCl と 1% (w/v) Glu-Na を添加した MRS 培地と大豆抽出液添加 MRS 培地いずれにもよく生育し、培養 7 日目で OD₆₆₀ が 0.8~1.0, 培養液の pH は 4.5~5.0 まで低下した。しかし、いずれの培養液からも TLC で GABA スポットを検出することができなかった。また、培養液中の L-グルタミン酸濃度も減少していなかったことから、供試した耐塩性乳酸菌は供試培地に生育できるが、L-グルタミン酸脱炭酸酵素は生産していないか、極めて弱い活性しか発現していないことを明らかにした。

Guido ら¹⁰⁾ は大腸菌が生産する L-グルタミン酸脱炭酸酵素は細胞質内に局在し、カルボキシ基を 2 個もつグルタミン酸を 1 個の GABA に変換することによって細胞内を中性域に保つ働きをしていると述べている。また、精製した L-グルタミン酸脱炭酸酵素は、高濃度の NaCl, NaNO₃, KCl, CaCl₂, CuSO₄ で活性が阻害されたと石川ら¹¹⁾ は報告している。たとえば、5% (w/v) NaCl 存在下で 90 分間酵素反応させたときの CO₂ 発生量は、NaCl 無添加時の 80% に低

下したと述べている。

一方、一部の乳酸菌が L-グルタミン酸を GABA に変換することは、すでに明らかにされている。早川ら⁸⁾ はヨーグルトから分離した *S. thermophilus* Y-1 と *L. delbrueckii* Y-2 を混合培養すると、L-グルタミン酸から GABA が生産されたと述べている。また、Oh and Park⁹⁾ はキムチから分離した *L. brevis* OPK-3 を用いて GABA を高生産 (84,292 mg/L/h) する条件を確立するとともに、*L. brevis* OPK-3 の L-グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子をクローニングしている。さらに塚本ら¹²⁾ は、L-Glu Na を添加した米糠に *L. brevis* IFO 120005 を 20°C 以下の低温で 7 日間培養すると、100 mg/g 以上の GABA が生産されることを明らかにしている。しかし、GABA 生産が報告されたこれらの乳酸菌は、いずれも非耐塩性で 6.5% (w/v) NaCl 存在下では生育できない。

そこで、GABA を生産する耐塩性乳酸菌を探索するのではなく、L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性の高い非耐塩性乳酸菌の耐塩性と 12% (w/v) NaCl 存在下でも L-Glu Na を GABA に変換できるか検討した。

2. 非耐塩性乳酸菌 *L. brevis* NBRC 120005 の耐塩性と NaCl 添加培地における L-グルタミン酸 Na から GABA への変換

L. brevis NBRC 120005 を 0~5.0% (w/v) NaCl を含む大豆抽出液添加 MRS 培地で培養すると、培養 2~4 日目まで培養液の pH は低下し、その後上昇した。一方、NaCl を 5.5% (w/v) 以上添加した培地では、pH は 5.0 付近に低下したまま上昇しなかった (Fig. 1)。培養初期に培養液の pH が低下したのは、乳酸発酵によって乳酸が生成したためで、培養後期に培養液の pH が上昇したのは、乳酸菌が大豆抽出物中の物質を塩基性物質に変換あるいは分解生成したためと考えられる。

NaCl を 6.0% (w/v) 添加すると、NBRC 120005 株はほとんど増殖しなかった (Fig. 2)。*Lactobacillus* 属と同じ乳酸菌グループに含まれる *Streptococcus* 属や *Leuconostoc* 属は、6.5% (w/v) NaCl 存在下では生育できないと報告¹³⁾ されており、NBRC 120005 株の耐塩性はこれらの結果と一致していた。

1% (w/v) L-Glu Na を含む大豆抽出液添加 MRS 培地で NBRC 120005 株を培養した。4% (w/v) 以

Fig. 1 PH of MRS culture solution containing soy extracts and 2.0 to 6.0% NaCl. *L. brevis* NBRC 120005 was incubated at 28°C with static culture. ●; 2.0%, ▲; 3.0%, ■; 4.0 %, ○; 5.0%, △; 5.5%, □; 6.0% NaCl

Fig. 2 Growth of *L. brevis* NBRC 120005 in MRS medium containing soy extracts and 2.0 to 6.0% NaCl. The bacteria was incubated at 28°C with static culture. ●; 2.0%, ▲; 3.0 %, ■; 4.0%, ○; 5.0%, △; 5.5%, □; 6.0 % NaCl

下のNaCl添加培養液では、L-グルタミン酸濃度は低下したが、5.5% (w/v) 以上NaClを添加した培養液ではL-グルタミン酸濃度は低下しなかった。たとえば、2.0% (w/v) NaCl添加培養液からは8日目でL-グルタミン酸ピークが検出できなくなり、培養6日目で2.3mg/mlのGABAが蓄積された。また、4.0% (w/v) NaCl添加培養液からも2.1mg/ml (10日培養) のGABAが検出された。これらの結果

Fig. 3 L-Glutamic acid or GABA concentrations in MRS culture solution containing soy extracts and 2.0 to 6.0% NaCl.

L. brevis NBRC 120005 was incubated at 28°C with static culture. L-Glutamic acid and GABA were drawn with straight line and broken line, respectively. ●; 2.0%, ▲; 3.0%, ■; 4.0%, ○; 5.0%, △; 5.5%, □; 6.0% NaCl

から、4% (w/v) 以下のNaClは、NBRC 120005株の生育とGABAへの変換を阻害しないことを明らかにした (Fig. 3)。

NBRC 120005株は6% (w/v) NaClで生育が阻害された。しかし、乳酸菌の細胞膜がNaClの透過を防ぐ障壁として機能すれば、高濃度NaCl存在下でも細胞内のNaCl濃度を低濃度に維持することができるはずである。あるいは、グルタミン酸脱炭酸酵素が高い耐塩性をもっていれば、非耐塩性乳酸菌は12% (w/v) NaCl存在下でも酵素活性を発現できると予測した。そこで、NBRC 120005株休止菌体が12% (w/v) NaClを含む大豆抽出液添加MRS培地でL-Glu NaをGABAに変換できるか検討した。

1% (w/v) L-Glu Naを含む大豆抽出液添加MRS培地で前培養したNBRC 120005株の菌体を、1% (w/v) L-Glu Naと12% (w/v) NaClを含む大豆抽出液添加MRS培地に加え28°Cでインキュベートした。培養液を経時的にサンプリングしてTLC分析したところ、12時間後からL-グルタミン酸スポットが薄くなり、2時間後からGABAスポットが出現した (Fig. 4)。そして、72時間後のGABA濃度は2.2 mg/mlに達した。

Fig. 4 TLC analysis of L-glutamic acid and GABA in the MRS culture solution containing 12% NaCl and 1% L-glutamic acid. *L. brevis* NBRC 120005 was incubated at 28°C with static culture. Glu; L-glutamic acid, GABA; γ -aminobutyric acid, Mix; L-glutamic acid and GABA, solid phase; silica gel 60 F₂₅₄, mobile phase; 2-propanol: dist. H₂O: acetic acid/50:45:5 (v/v/v), detection: ninhydrine.

この結果は、NBRC 120005 株は12% (w/v) NaCl 添加培地には増殖できないが、L-Glu Na を GABA に変換できることを示している。また、市販味噌に NBRC 120005 株休止菌体と L-Glu Na を添加すると、味噌熟成中に GABA を生成、蓄積させることが可能であることを示唆している。

3. *L. brevis* NBRC 120005 凍結乾燥菌体と L-Glu Na を添加した市販味噌における GABA の生成

1% (w/v) L-Glu Na 添加培地で前培養した NBRC 120005 株の凍結乾燥菌体 0.5g (凍結保護剤を約 98% 含有) を 5% (w/v) L-Glu Na を含む大豆抽出液添加 MRS 培地 1ml に懸濁した。この懸濁液を 2 種類の市販味噌 (いずれも赤色辛米味噌) 8g に添加し 28°C で 7 日間保ったところ、味噌 1g から 1.8~2.3mg の GABA が検出された (Fig. 5, 6)。

凍結乾燥休止菌体の調製には凍結保護剤が必須で、保護剤の種類も牛血清アルブミンよりトレハロースで調製したものが GABA を多く生産した。凍結乾燥菌懸濁液ではなく、凍結乾燥菌体粉末を市販味噌に添加したところ、GABA 生成量は 1/10 以下に低下した。この原因は味噌の水分量が少ないので、L-Glu Na と凍結乾燥菌体を味噌の中で均一に混合できなかったためと考えている。そこで、味噌 8g に加える菌懸濁液量を検討したところ、1ml で安定した GABA 生成が認められ、それ以上添加しても変換率は大きく増加しなかった。菌懸濁液を 1ml 加えた味噌は、すこし軟らかいものの、市販味噌と性状に大きな違いは認められなかった。

最近、水谷ら¹⁴⁾は 12% (w/v) NaCl と 4.9%

Fig. 5 Amino acid analysis of Miso containing L-glutamic acid. The peaks of 1 to 16 were identified by their retention time compared with standard amino acids.

Peak 1: Asp, 2: Thr, 3: Ser, 4: Glu, 5: Gly, 6: Ala, 7: Val, 8: Met, 9: Ile, 10: Leu, 11: Tyr, 12: Phe, 13: b-Ala, 14: NH₃, 15: Lys, 16: Arg

Fig. 6 Amino acid analysis of Miso after incubating with *L. brevis* NBRC 120005 and L-glutamic acid. The peaks of 1 to 14 were identified by their retention time compared with standard amino acids.

Peak 1 : Asp, 2 : Thr, 3 : Ser, 4 : Glu, 5 : Gly, 6 : Ala, 7 : Val, 8 : Ile, 9 : Leu, 10 : Tyr, 11 : Phe, 12 : GABA, 13 : NH_3 , 14 : Lys

(w/v) L-Glu Naを添加した醤油に *L. brevis* YS 1403 (自社株) を接種して10~14日間培養すると、3.2% (w/v) のGABAが生産されたと報告している。報告にはYS 1403株の同定結果と乳酸菌数の増加が示されていないが、この報告は12% (w/v) NaCl溶液中で増殖でき、かつL-Glu NaをGABAに変換できる乳酸菌 (*L. brevis*) が存在していることを示唆している。

米飯と味噌汁の組み合わせは、和食の献立の根幹をなすもので、日本人の食にとって味噌汁は欠くことができないメニューである。今回供試した市販味噌には、食塩が11~14% (w/w) 含まれていて、日本人が一日に飲む味噌汁から摂取する食塩量は1.9~2.6gと報告されている¹⁵⁾。一方、食塩の過剰摂取は高血圧発症の原因の一つに挙げられており、高血圧を予防する観点から減塩が勧められている。また、GABAはヒトなど哺乳動物の小脳に存在して、抑制性神経伝達物質として機能することから、血圧降下作用や精神安定効果などが注目されている。

最近、GABAを含む食品が多数開発されている。GABAを含む嗜好食品を積極的に摂取することも一案だが、GABA含量の高い発芽玄米とGABAを蓄積させた味噌汁を毎日摂取する食生活が、伝統的な和食

をおいしく食べながら、生活習慣病を予防できる健康食材を用いた和食のスタイルとなることを期待している。

最後に、本稿で紹介させていただいた研究は近畿大学農学部藤田藤樹夫教授、上武誠氏、安藤正史准教授、三笠産業株式会社佐伯誠氏と山根文夫氏との共同研究で実施したものである。また、*Tetragenococcus halophilus* No. 3は長野県味噌工業協同組合連合会から供与いただいた。この場を借りて深謝の意を述べたい。

<近畿大学農学部>

文 献

- 1) E. ROBERT and E. EIDELBERG : *Int. Rev. Neurobiol.*, **2**, 279-332 (1970)
- 2) H. C. STANTON : *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **143**, 195-204 (1963)
- 3) 大森正司, 矢野とし子, 岡本順子, 津志田藤二郎, 村井敏信, 樋口 満 : *農化*, **61**, 1449-1451 (1987)
- 4) N. KOMATSUZAKI and K. TSUKAHARA : *In Pop. Am. Soc. Agric. Eng.*, p. 11 (2003)
- 5) T. SAIKUSA, T. HORINO, and Y. MORI : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2291-2292 (1994)
- 6) 相島知美, 門松俊志, 内田充郎, 西祐一郎, 土

- 谷紀美, 西村賢了: 日本国公開特許公報(A), 2006-25669 (2006)
- 7) A. YU. M. M. PLOHOV, T. GUSYATINER and A. YAMPOLSKAYA: *Appl. Biochem. Biotech.*, **88**, 257-265 (2000)
 - 8) 早川 潔, 上野義栄, 河村真也, 谷口良三, 小田耕平: *生物工学*, **74**, 239-244 (1997)
 - 9) K. PARK and S. OH: *Bioresource Technology*, **98**, 312-319 (2007)
 - 10) C. GUIDO, D. B. DANIELA, A. CATERINA, G. HEINZ, B. FRANCESCO, and G. MARKUS: *EMBO Journal*, **22**, 4027-4037 (2003)
 - 11) 石川芳典, 小幡彌太郎: *農化*, **29**, 689-692 (1955)
 - 12) 塚本研一, 戸枝一喜, 大久長範, 船木 勉: 日本国公開特許公報(A), 2005-052103, (2005)
 - 13) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, p. 1043-1234 (1986)
 - 14) 水谷寛明, 三宅崇文, 松本裕子, 木村幸信: 日本国公開特許公報(A), 2006-246840 (2006)
 - 15) 後藤 敦, 橋本 勉, 柳川 洋: *臨床栄養*, **61**, 805-811 (1982)

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

岸本憲明<Noriaki KISHIMOTO>

昭和26年11月20日生まれ<勤務先とその所在地>近畿大学農学部, 〒631-8505 奈良市中町3327-204 <略歴>昭和49年岡山大学農学部卒業, 昭和51年京都大学大学院農学研究科修了, 平成4年京都大学博士(農学), 大塚製薬, 美作女子大学, 作陽短期大学, くらしき作陽大学を経て平成12年近畿大学助教授, 平成18年近畿大学教授, 現在に至る。<抱負>微生物および微生物酵素を用いたもの造りを追求したい。<趣味>散策と温泉めぐり。

中森俊宏<Toshihiro NAKAMORI>

1963年1月12日生まれ<勤務先とその所在地>不二製油株式会社蛋白加工食品カンパニー蛋白素材部門蛋白開発部, 〒598-8540 大阪府泉佐野市住吉町1番地<略歴>1988年3月北里大学大学院薬学研究科卒業, 同年4月不二製油(株)入社, 基礎研究グループ配属, 1992~95年企画室勤務を経てたん白質開発室へ, 1997年より現在まで大豆ペプチドの開発に従事。<抱負>大豆ペプチドの新しい分野を開拓していくこと。<趣味>ガーデニング。

北川さゆり<Sayuri KITAGAWA>

<勤務先とその所在地>不二製油株式会社フードサイエンス研究所, 〒300-2497 茨城県つくばみらい市絹の台4-3 <略歴>1992年3月筑波大学第二学群農林学類卒業, 1994年3月京都大学大学院農学研究科食品工学科修了, 同年4月不二製油(株)入社, たん白開発・製菓製パン素材開発を経て, 2005年10月より半年間, ビール系飲料について勉強するため, 酒類総合研究所へ出向, 2006年5月より現職。<抱負>酵母と醸造についてもっと知りたい/世界中の色々なビールを飲み尽くしたい。<趣味>バレーボール。

神戸大朋<Taiho KAMBE>

昭和46年5月1日生まれ<勤務先とその所在地>京都大学大学院生命科学研究科, 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町<略歴>平成7年京都大学農学部食品工学科卒, 平成10年京都大学大学院農学研究科助手, 平成11年同大学大学院生命科学研究科助手, 平成20年同大学大学院生命科学研究科准教授, 現在に至る。<抱負>亜鉛の関与する生命現象の分子メカニズムを明らかにしていきたい。<趣味>スポーツ観戦, 旅行。