大豆煮汁の乳酸菌による γ -アミノ酪酸の生産

古田正範, 黒田理恵子, 塚谷忠之, 樋口智子, 廣藤祐史[§],

宮川 浩*, 牟田誠一*, 州崎 収*

福岡県工業技術センター生物食品研究所

* ニビシ醤油株式会社古賀工場

Production of γ -Amino Butyric Acid by Lactic Acid Bacteria in Soybean Broth

Masanori Furuta, Rieko Kuroda, Tadayuki Tsukatani, Tomoko Higuchi, Yushi Hirofuji[§],

Hiroshi Miyagawa*, Seiiti Muta* and Osamu Suzaki*

Biotechnology and Food Research Institute Fukuoka Industrial Technology,

1465-5 Aikawa, Kurume, Fukuoka 839-0861

* Nibishi Soy Sauce Co., Ltd., Koga Factory, 3-2-1 Eki Higashi, Koga City, Fukuoka 811-3102

We examined the effective utilization of food waste soybean broth. Lactic acid bacteria added to the soybean broth were shown to produce γ -amino butyric acid (GABA). Lactic acid bacteria inoculants from the 1 500 stock strains maintained in our laboratory were tested for efficient production of GABA. Addition of the lactic acid bacteria that efficiently produced GABA to the soybean broth resulted in the production of 3.5 mM (36 mg/100 ml) GABA. In addition, high levels of GABA (46~79 mg/100 ml) were produced by adding glutamic acid to the soybean broth at 0.05~0.1% (w/v). In functional tests, soybean broth was shown to have high ACE inhibitory activity and DPPH radical scavenging ability, and also to have functionality of α -glucosidase inhibition activity and α -amylase inhibition activity. By experimenting with making bread with the addition of a lactic acid fermentation liquid that includes GABA, we tried to utilize this material as a food ingredient. (Received Dec. 25, 2007 ; Accepted Apr. 1, 2008)

Keywords : γ -amino butyric acid, Soybean broth, Lactic acid bacteria

キーワード : γ -アミノ酪酸, 大豆煮汁, 乳酸菌

食品リサイクル法の施行により, 食品製造業は食品廃棄物の発生抑制, 減量化, 又は食品循環資源の再利用への取組みが規定された。これに伴い食品製造業では自社で発生する食品加工副産物を未利用資源ととらえ, 有効利用しようとするニーズが顕著である。

本研究は, 味噌製造の蒸煮工程で副産され, 排水処理装置により処理, 廃棄されている大豆煮汁について, 機能性検索, 乳酸菌による GABA (γ -アミノ酪酸: 血圧降下をはじめ, 様々な健康効果をもたらすことが確認されている) の生成, 付加価値化を行い, 食品素材として利用法を検討した。早川 潔¹⁾らは醸造食品中の GABA 量を調べ GABA の生成に乳酸菌が関与していること, 特にキムチの GABA は乳酸菌により生成されること, また分譲機関の乳酸菌 43 株について GABA 生成を調べ, *L. brevis*, の 8 種中 4 種が多量に蓄積し, *L. plantarum*, *L. lactis*, *E. casseliflavus*, *S.*

thermophilus も GABA を生成蓄積することを報告している。そこで, 大豆煮汁の成分分析, 機能性 (in vitro) 検索を行うとともに, 当所で有する約 1 500 株乳酸菌ライブラリーより GABA を高率に生成する乳酸菌を選定し, 乳酸発酵により GABA を生成付加した大豆煮汁を調製し食品素材として利用を試みた。

実 験 方 法

1. 供試大豆煮汁成分

試験に供した大豆煮汁は, 県内の N 社味噌製造工場から提供を受けた。大豆を釜に入れ水を加え一晚浸漬後, 排水, 再び水を加え (大豆 1 600 kg に対し凡そ水 2.5 m³), 蒸気を吹き込み内部圧 1 kg で泡が吹くまで蒸煮加熱後排水された煮汁である。この煮汁について食品一般成分を分析した。

2. GABA 生産乳酸菌

GABA 高生産株のスクリーニングを行った。当所で有する乳酸菌株を規定濃度の MRS 培地 (Lactobacilli MRS Broth, Difco 社製) で 18 時間培養し, 培養上清を GABA

〒839-0861 福岡県久留米市合川町 1465-5

* 〒811-3102 福岡県古賀市駅東 3 丁目 2 番 1 号

[§] 連絡先 (Corresponding author), hirofuji@fita.pref.fukuoka.jp

測定サンプルとした。また GABA 高生産菌株として既知の NBRC12005 株を同様に培養した上清を対照サンプルとした。大豆煮汁に対する特異性試験については大豆煮汁 (pH 6.0 に調整) に各菌株を接種し、増殖が見られたものを陽性とした。GABA は酵素法により 96 穴マイクロプレートを用いた塚谷忠之らの測定法²⁾ により行った。

全ての菌株はグラム染色、顕微鏡観察、発酵形式、カタラーゼ活性の有無、運動性の有無の確認を行っている。特に有用であると考えられた菌株についてはさらに糖資化性テスト (APIsystem, ビオメリュー社)、初発 pH 試験 (pH 9.6)、生育温度試験 (10℃, 45℃, 50℃)、耐塩性試験 (6.5% (w/v) NaCl) を行った。

3. 大豆煮汁から乳酸発酵による GABA 生成試験

N 社味噌製造工場の協力をえて現地での GABA 生成試験を 3 回 (12 月～翌年 2 月) 行った。10 L 密閉タンクに煮汁を採取し煮沸殺菌後、選定した GABA 高生産乳酸菌株 3 株 (59-2, 59-23, 95-2) の各スターター (大豆煮汁に 2% (W/V) ショ糖を添加した培養基で前培養したもの) を 1% (v/v) 量添加、約 5 日間室内に放置し乳酸発酵状況を観察、GABA、有機酸等を測定した。2 回目の試験ではグルタミン酸添加量を 0.05% (w/v) とした。3 回目の試験ではグルタミン酸を 0.1% (w/v) 量添加し試験を行った。初発煮汁、発酵開始 1 日～2 日経過後、5 日経過後と数回サンプリングを行い、pH、ブリックス、菌数 (菌数計測盤により概数を測定) 及び顕微鏡観察等の他、有機酸、GABA を測定した。有機酸は島津有機酸分析システム LC10A により、GABA は前述の 96 穴マイクロプレートを用いた酵素法により一括測定した。

4. 機能性試験 (in vitro)

(1) DPPH ラジカル捕捉能

大豆煮汁のラジカル消去能を測定³⁾ した。対照として抗酸化性が高いと思われるカテキン (Catechin hydrate minimum) M.W. (290.27+18n) : 12.5~400 µmol 濃度溶液のラジカル消去能を測定し検量線より相当量を推定した。また、現地試験での初発煮汁、発酵後の煮汁について測定し比較した。

(2) ACE (アンジオテンシン変換酵素) 阻害活性

ACE 阻害活性は Lieberman 変法によって測定した。

Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) を基質とし、37℃ 60 min 反応後、ACE により生成された馬尿酸を酢酸エチルで抽出した。得られた馬尿酸は減圧乾燥後、食塩水に再溶解し、228 nm における吸光度を測定した。サンプルの代わりに蒸留水を添加した場合をコントロール (Control) とし、阻害率は以下のようにして求めた。

$$\text{阻害率}(\%) =$$

$$(\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.} \times 100$$

なお、以下の検討したすべての活性について、阻害率はこの式に準じて求めた。

(3) α-アミラーゼ阻害活性

豚膵臓由来 α-アミラーゼを酵素として、p-Nitrophenyl-α-D-maltopentaoside を基質として用い、リン酸緩衝液 (pH7) 中で反応させた。37℃ 60 min 反応後の生成物を 405 nm の吸光で測定した。

(4) α-グルコシダーゼ阻害活性

市販ラット腸管アセトンパウダーに 9 倍量のマレイン酸緩衝液 (pH 6) を加え、ガラスホモジナイザーを用いて均一化した。遠心分離後の上清を希釈したものを粗酵素液として用いた。基質は p-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside を用い、α-アミラーゼと同様に阻害活性を求めた。

5. 食品素材として利用

GABA を含有した大豆煮汁を使用してパンを試作し、発酵及び焼き上げによる GABA の損失について検討した。

パン 1 個 (強力粉 25 g, 砂糖 1.25 g, 塩 0.44 g, GABA 15.5 mg 含有大豆煮汁 (15 ml) を添加) 当たり、(a) パン酵母 0.48 g 添加発酵、焼き上げ (b) パン酵母添加無し、焼き上げ (c) パン酵母添加無し、練ったまま焼き上げせずの 3 種類サンプルを調製した。各サンプルに水 150 ml を加えホモジナイザーを用い約 2 分攪拌粉碎後抽出液を 0.45 µ フィルターでろ過し、ロ液中の GABA を測定し、焼き上げ及びパン酵母発酵による GABA の損失量を検討した。

実験結果および考察

1. 供試大豆煮汁成分

分析の結果、水分 96.5 (凍結乾燥法)、たんぱく質 0.9 (窒素定量換算法)、脂質 0.01 以下 (エーテル抽出法)、灰分 0.4 (直接灰化法)、炭水化物 2.2 (差し引き法算出) L-グルタミン酸 8 mg/100 ml (F-キット (ベーリンガーマンハイム (株))) であった。

2. GABA 生産乳酸菌

GABA 高生産菌株として既知の NBRC 12005 株の GABA 生成量は測定の結果 2.1 mM であった。そこで 2.1 mM 以上 GABA を生成する菌株をスクリーニングした。図 1 に結果を示す。更に大豆煮汁に対して特異性を示し、起源が食品由来の菌株で、発酵液の官能試験でも良好に思われた 59-2, 59-23, 95-2 の 3 株を選定した。

なお、乳酸菌の生物学的同定の結果、59-2 乳酸菌 : *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, 59-23 乳酸菌 : *Leuconostoc* 属 (*Leuc. paramesenteroides*/*Leuc. mesenteroides*ssp. *mesenteroides* DNA-DNA ホモロジーによる確認が必要)、95-2 乳酸菌 : *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* と分類された。

3. 大豆煮汁から乳酸発酵による GABA 生成

大豆煮汁の乳酸発酵による GABA 生成の現地試験では、大豆由来あるいは作業環境からと推察されるコンタミが若干見られたが、乳酸菌が主勢の発酵状況が観察された。今回煮汁は煮沸により殺菌されたが、単一乳酸菌による完全発酵を行うにはオートクレーブ等滅菌が必要と考え

られた。

水野時子⁴⁾らは、浸漬後放置した大豆の遊離アミノ酸総量が2.1~2.9倍となり、特にGABAの増加が顕著であることを報告している。今回の試験でもGABA測定の結果、大豆浸漬により生成したと考えられるGABAが煮汁に含まれていることが分かった。1回目採取の煮汁GABA測定結果は1.7mM、2回目は1.8mM、3回目1.9mM、で17~19mg/100mlのGABAが含まれていた。更に乳酸発酵によりL-グルタミン酸がGABAへ変換された。(図2)発酵5日後のGABA生成量はグルタミン酸無添加の煮汁では3.5mM(36mg/100ml)で、一方、グルタミン酸0.05%(w/v)添加で最大4.5mM(46mg/100ml)、0.1%(w/v)の添加

で最大7.7mM(79mg/100ml)であった。グルタミン酸からGABAへの変換率は乳酸菌59-2で87~90%(w/v)、59-23で84~85%(w/v)、95-2で78~84%(w/v)と計算された。有機酸の生成量(図3)は大豆煮汁そのものの発酵では1%(w/v)程、グルタミン酸の添加量が0.1%(w/v)では有機酸が1.5%(w/v)程に増加する結果が得られた。

4. 機能性試験結果 (in vitro)

(1) DPPH ラジカル捕捉能

機能性について大豆煮汁のDPPHラジカル消去能について、対照としてカテキン溶液についてDPPHラジカル消去能を測定、検量線を作成し相当濃度を求めた。その結果、カテキン溶液での検量線は $Y=0.1258X+3.294$ (Y:ラジカル消去能(%), X:カテキン μ M濃度)($R^2=0.9857$)となりこれより初発酵煮汁のDPPH消去能測定値は52%で0.39mMカテキン濃度溶液相当と推測され高い抗酸化性を有することがわかった。また5日経過後発酵煮汁のDPPH消去能測定値は平均57%で0.43mMカテキン濃度の溶液相当のDPPHラジカル補足能と推測された。発酵による有為差は認められなかったが、発酵後も高い抗酸化性を維持していることがわかった。

(2) ACE 阻害活性

次にACE阻害活性について血圧調節を司るレニン-アンジオテンシン系でのACEの阻害作用について検討した。原料である大豆煮汁と2回目の現地試験によって得られた発酵液サンプルについて測定を行った。各サンプルは100

図1 保有乳酸菌株1500株の各培養上清液サンプルのGABA濃度

図2 乳酸菌処理による大豆煮汁中のGABA生成経過

注 GS: グルタミン酸ソーダ添加

図3 乳酸菌処理による大豆煮汁中の有機酸生成経過

注 GS: グルタミン酸ソーダ添加

倍希釈して測定に用いた。100倍希釈した場合でも、大豆煮汁には80%程度の阻害活性が認められ、強い阻害効果を有していることが示唆された。また、発酵処理した場合も阻害効果の著しい低下は認められなかった。以上より大豆煮汁および発酵液サンプルについて、血圧上昇を抑制する効果が期待される。

(3) α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ阻害活性

次に糖の分解に関与している膵臓 α -アミラーゼと小腸 α -グルコシダーゼに対する阻害活性を検討した。その結果、初発煮汁の α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ阻害活性は各25.2%、17.2%で、発酵後は平均25.5%、16.9%であった。大豆煮汁には、 α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼともに阻害活性が確認され、乳酸発酵後も阻害活性の減少は見られないことがわかった。市販の健康茶(α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼの阻害活性が確認されており、食後の血糖上昇を抑制する効果が示されている。)の測定結果51.2%、9.3%と比較し、 α -アミラーゼ阻害活性は健康茶の半分程度であるものの、 α -グルコシダーゼ阻害活性は同等以上であることが示唆された。

以上より大豆煮汁および発酵液サンプルについて、血糖値の上昇を緩やかにする効果が期待され、その有効性については、さらに検討が必要である。その他にリパーゼ、ヒアルロニダーゼ、PEP(プロリルエンドペプチダーゼ)の各酵素に対する阻害活性の機能性を測定(実験方法の記述省略)したが認められなかった。

5. 食品素材として利用検討

次にGABAを生成させた大豆煮汁の応用例としたパンを試作し、発酵及び焼き上げによるGABAの損失を検討した。パン1個当たり、回収率を求めた結果、(a)パン酵母添加なしで練り上げたもの99.5%(w/v)(15.4mg)、(b)パン酵母添加なしで焼き上げたもの90.1%(w/v)(14mg)で焼き上げによる損失9.4%(w/v)、(c)パン酵母添加し焼き上げたもの60.7%(w/v)(9.4mg)で損失は38.8%(w/v)、これよりパン酵母の発酵により29.4%(w/v)損失したと計算された。一方、前述したように大豆煮汁にグルタミン酸を0.1%(w/v)の添加した試験では最大7.7mM(79mg/100ml)のGABAが生成され、パン1個に添加する乳酸菌発酵煮汁(練り水として)が15mlとすると11.8mgのGABAが含まれ、パン酵母発酵と焼き上げによる損失を40%(w/v)としてもパン2個を食すれば14mgのGABAを摂取出来ると計算された。

要 約

GABAは血圧が高めの人(軽症高血圧や正常高値の人)が毎日10mgの飲食を継続すれば血圧降下の効用があると言われている(特定保健用食品PR等)。本研究の大豆煮汁からは選定した乳酸菌株の使用により3.5mM(36mg/100ml)のGABAを乳酸発酵により生成でき、グルタミン酸の添加(今回0.05~0.1%(w/v)で試験)で更に多くのGABAを生成(46~79mg/100ml)できた。また煮汁その

ものに大豆浸漬により生成したと考えられる GABA が 1.7~1.9 mM (17~19 mg/100 ml) 含まれていた。更に大豆煮汁に高い ACE 阻害活性、DPPH ラジカル消去能があり、 α -グルコシダーゼや α -アミラーゼ阻害活性の機能性もあること、乳酸発酵後もその機能を有していること等を明らかにした。機能性食品素材として利用が大いに期待できるので実用をめざし検討を継続したい。

文 献

- 1) 早川 潔, 上野善栄, 河村真也, 谷口良三, 小田耕平: 生物工学, **75**, 4, 239-244 (1997).
 - 2) Tadayuki. Tsukatani *et al.* / *Analytica Chimica Acta* 540, 293-297 (2005).
 - 3) 宮川雄太他: 食科工, **50**, 531.
 - 4) 水野時子, 島田信二, 丹治克男, 山田幸二, 大豆の水浸漬による遊離アミノ酸の変動, 家政誌, **53**, 1197-1202 (2002).
- (平成 19 年 12 月 25 日受付, 平成 20 年 4 月 1 日受理)