γ -アミノ酪酸 (GABA) を高生産する乳酸菌の選抜と 鶏肉発酵調味液の GABA 富化

侯 歌川, 藤川皓江, 荒川健佑, 宮本 拓*

岡山大学大学院環境生命科学研究科

Selection of Lactic Acid Bacteria with High Gamma-Aminobutyric Acid Productivity and Their Application to Fermented Chicken Sauce

Gechuan Hou, Hiroe Fujikawa, Kensuke Arakawa and Taku Miyamoto*

Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University,
1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-protein amino acid with several physiological functions, including hypotensive and tranquilizing effects. In this study, thin-layer chromatography was used to select 18 strains of lactic acid bacteria, out of 218 strains isolated from dairy products, for high GABA productivity. GABA production by the 18 strains was measured using HPLC, with strain 1056 showing the highest GABA productivity (6.95 mg/mL). This strain was identified as *Lactobacillus brevis* by morphological, physiological and genetic analyses. *Lb. brevis* 1056 produced GABA when it was cultured in media adjusted to an initial pH of 4.0–8.0, rather than 3.0. GABA production by strain 1056 increased with increasing amounts of glutamate (substrate) added to the medium (pH 5.0). It was also shown that GABA production by strain 1056 was faster than the other strains. These results suggest that *Lb. brevis* 1056 is a useful starter for GABA-rich functional foods. Lastly, as a model functional food, fermented chicken sauce was prepared using *Lb. brevis* 1056, and sufficient amounts (1.51 mg/mL) of GABA were produced in the sauce.

(Received Sep. 21, 2012; Accepted Dec. 7, 2012)

Keywords : lactic acid bacteria, gamma-aminobutyric acid (GABA), fermented chicken sauce, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus brevis*

キーワード : 乳酸菌, γ -アミノ酪酸 (GABA), 鶏肉発酵調味液, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus brevis*

γ -アミノ酪酸 (GABA) は、微生物から植物、動物に至るまで広く自然界に分布するタンパク質非構成アミノ酸であり、動物においては抑制性の神経伝達物質として知られている¹⁾。加えて、GABA には、血圧降下作用、利尿作用およびストレス緩和作用などの生理効果が知られており²⁾³⁾、近年、機能性食品やサプリメント等への利用からますます注目が集まっている。

乳酸菌は、古来よりヒトとの関わりが深く、安全な微生物として食品の発酵に用いられ、保存性の向上や風味の形成に役立てられてきた。近年では、乳酸菌がヒトに対する様々な生理機能を有することが明らかになっており、GABA の生産性もその 1 つに挙げられている⁴⁾。GABA を効率よく生産する乳酸菌には、*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* および *Lactococcus lactis* などが知られている⁵⁾。乳酸菌における GABA の生産は、グルタミン酸デ

カルボキシラーゼ (GAD, EC 4.1.1.15) によるグルタミン酸からの脱炭酸によって起こることがわかっており、いくつかの菌株では GAD が単離され、その機能もよく調べられている^{5)~7)}。

本研究では、世界の発酵乳製品より分離した乳酸菌株の中から GABA 生産活性の高い菌株を選抜・同定し、選抜菌株の活性に及ぼす影響要因について調べ、GABA 生産に適した培養条件の検討を行った。そして、GABA を富化した新たな機能性食品の 1 つとして、廃用鶏の有効活用を視野に入れ、選抜菌株を利用した鶏肉発酵調味液を作製することとした。

実 験 方 法

1. 供試菌株および培養条件

世界各地の発酵乳製品より分離した研究室保有の乳酸菌 218 菌株を供試菌株として用いた。全ての乳酸菌株は、GLYP 培地 (1L あたり; グルコース 5.0 g, ラクトース 5.0

〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 1-1-1

* 連絡先 (Corresponding author), tmnono@cc.okayama-u.ac.jp

g, 酵母エキス 10.0 g, ポリペプトン 5.0 g, 酢酸ナトリウム三水和物 2.0 g, 硫酸マグネシウム七水和物 0.2 g, 硫酸マンガ四水和物 0.01 g, 硫酸鉄七水和物 0.01 g および塩化ナトリウム 0.01 g; 121°C, 15 分間高压滅菌後 pH 6.8 に調整) にて 3 回前培養 (30°C, 24 時間) した後に, 本培養に供した. 本培養は, GLYP 培地にグルタミン酸ナトリウムを 10.0 mg/mL となるように添加した GABA 生産用培地を用い, 1% (v/v) 接種で 30°C, 72 時間行った. 菌の生育の有無は培養液の pH 測定により確認した. GABA 測定試料には, オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分間) した各培養液の遠心上清 (1700×g, 15 分間) を用いた.

2. GABA 高生産乳酸菌のスクリーニング

GABA 高生産乳酸菌のスクリーニングには, 薄層クロマトグラフィー (TLC) 法⁸⁾を用いた. すなわち, TLC ガラスプレート (シリカゲル 60, Merck) に試料 2 µL をスポットし, 展開溶媒 (n-ブタノール: 酢酸: 水=3:2:1) にて展開・乾燥した後, 0.7% (w/v) ニンヒドリン溶液を噴霧し, 乾熱オーブンで 100°C, 10 分間加熱することで GABA の発色を行った. 各乳酸菌株の GABA 生産活性の強弱は, 培養上清中の GABA 含量を 0.1–5.0 mg/mL の GABA 標準溶液を用いて比色定量することで判断した. GABA 生産活性の強弱は, GABA 標準溶液のスポットの発色強度と比較して, 5 段階 (–, 0.1 mg/mL 未満; ±, 0.1–0.5 mg/mL; +, 0.5–2.0 mg/mL; ++, 2.0–4.0 mg/mL; +++, 4.0 mg/mL 以上) で評価した.

3. GABA 生産活性の測定

それぞれの乳酸菌株の GABA 生産活性は, 各培養上清中の GABA 含量として, 逆相 HPLC を用いたポストカラム蛍光誘導体化法 (HPLC 法)⁹⁾ にて測定した. カラムは Shim-pack VP-ODS (150×4.6 mm I.D., 島津製作所) を用い, カラム温度は 45°C とした. 移動相には 10 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) を用い, 流速 0.8 mL/min でイソクラティック溶出した. 溶出液は反応液 [4.01% (w/v) 炭酸ナトリウム, 1.85% (w/v) 硫酸カリウム, 1.32% (w/v) ホウ酸, 0.10% (w/v) N-アセチル-L-システインおよび 0.08% (w/v) o-フタルアルデヒド; 流速 0.4 mL/min] を用いて誘導体化し, 蛍光にて検出 (Ex 350 nm, Em 450 nm) を行った. 注入試料には, 培養上清試料を 1000 倍希釈し, 孔径 0.2 µm のフィルター (Millipore) で無菌ろ過したものを用いた.

4. 乳酸菌種の同定

選抜した乳酸菌株の菌種は, 形態・生理および遺伝学的性質から同定した⁹⁾. すなわち, グラム染色による形態観察, 運動性試験, カタラーゼ試験, 温度生育性試験, ホモ/ヘテロ発酵型の識別, L-アルギニン塩酸塩からのアンモニア生成試験, 生成乳酸旋光性試験¹⁰⁾, API システム (API 50 CH, BioMérieux) を用いた糖類発酵性試験および 16S

rDNA の部分塩基配列の相同性解析の結果から乳酸菌種を同定した. なお, 16S rDNA の部分塩基配列は, 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') のプライマーを用いて Arakawa *et al.* (2008) の方法¹¹⁾ に従って決定し, DDBJ にて BLAST 法を用いて相同性検索を行った.

5. GABA 生産に及ぼす培地 pH の影響

初発 pH を 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 および 8.0 とした GABA 生産用培地 (10.0 mg/mL グルタミン酸ナトリウム含有) に選抜した供試菌 3 菌株をそれぞれ接種・培養 (30°C, 72 時間) した. 培養後の GABA 生産量を HPLC 法にて測定することにより, GABA 生産活性に及ぼす培地 pH の影響を検討した.

6. GABA 生産に及ぼす添加グルタミン酸ナトリウム濃度の影響

基質となるグルタミン酸ナトリウムの添加濃度をそれぞれ 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 および 100.0 mg/mL とした GABA 生産用培地を pH 5.0 に調整後, 選抜した 3 菌株を接種・培養 (30°C, 72 時間) した. 培養後の GABA 生産量を HPLC 法にて測定することにより, GABA 生産に及ぼすグルタミン酸ナトリウムの影響を検討した.

7. GABA 生産量の経時的な変化

10.0 mg/mL グルタミン酸ナトリウム含有 GABA 生産用培地 (pH 5.0) に選抜した 3 菌株をそれぞれ接種し, 30°C で培養した. 0, 24, 48, 72, 96 および 120 時間後の GABA 生産量を HPLC 法で測定することにより, GABA 生産の経時的な変化を測定した.

8. 鶏肉発酵調味液への応用

GABA を富化した機能性食品の一例として, 廃用鶏の有効活用を視野に入れ, 選抜した GABA 高生産乳酸菌株を用いた鶏肉発酵調味液を作製した.

まず, ミンチ状の親鶏肉 (モモ・ムネ混合) 280 g に食塩 35 g, グルコース 67 g および水 387 g を加え, 121°C, 15 分間の滅菌処理を行った. 次に, 2 種のタンパク質分解酵素 [ビオプレーゼ SP4 (ナガセケムテックス), デナチーム AP (ナガセケムテックス)] およびグルタミナーゼ (大和化成) をそれぞれ 0.28 g ずつ添加し, 50°C で 48 時間反応させた. 反応後, 1700×g で 15 分間遠心分離し, 遠心上清をろ紙ろ過することで鶏肉調味液を得た. 鶏肉調味液は孔径 0.20 µm のフィルターで滅菌処理し, 選抜した GABA 高生産乳酸菌株を 2% (v/v) 量で接種した. 熟成 (培養) は 30°C で 7 日間行い, 1 日ごとに鶏肉発酵調味液中の GABA 含量を HPLC 法にて測定した.

実験結果および考察

1. TLC 法による GABA 高生産乳酸菌のスクリーニング

TLC 法では, 供試した乳酸菌 218 菌株のうち, 82 菌株

Fig. 1 GABA concentrations (bar) in and pH (symbol) of the culture supernatants of selected strains

Each result represents the mean of three data points.

において、0.1mg/mL以上のGABA生産活性が確認された。4.0mg/mL以上の最も強いGABA生産活性（発色強度+++）が検出された菌株は1菌株であった。次いで、発色強度++（2.0-4.0mg/mL）、+（0.5-2.0mg/mL）および±（0.1-0.5mg/mL）のGABA生産活性を有する菌株は、それぞれ6、11および64菌株であった。一方で、GABAを生産しない、もしくは0.1mg/mL未満しか生産しない菌株（発色強度-）は136菌株で、GABA生産性が菌株依存的であることが明らかとなった。GABA非生産の乳酸菌株は、GAD遺伝子を保有していない（または変異している）、もしくは発現していないことが過去の知見より推測された⁵⁾¹²⁾¹³⁾。

GABA生産活性の認められた乳酸菌82菌株の中から、GABA生産量が0.5mg/mL以上（発色強度+++、++および+）の18菌株を選抜して、以下のHPLC法による定量分析に供した。

2. HPLC法によるGABA生産活性の測定

TLC法にてスクリーニングした18菌株のGABA生産活性は、培養上清中のGABA含量としてHPLC法を用いて測定した。培養上清におけるGABA含量とpHをFig.1に示す。最も高いGABA生産活性を有していたのは1056株で、6.95mg/mLであった。本生産活性は過去の報告と比較しても高い値であり⁵⁾、1056株がGABA生産乳酸菌として非常に優れていることが示された。また、2.0-4.0mg/mLおよび0.5-2.0mg/mLのGABA生産を示した菌株はそれぞれ6および11菌株であり、本結果はTLC法の結果と一致した。このことは、TLC法がGABA高生産乳酸菌の簡便なスクリーニング法として有用であることを示している。

培養上清（培養液）のpHは、培養菌株のGABA生産活性が高くなるほど高い傾向にあったが、明確な相関は見られなかった。一般的に、GABA合成にプロトンが消費され

る（そして、菌体外のグルタミン酸と菌体内のGABAが対向輸送される）ことから、GABA生産にともなって培養液のpHは上昇する（GABA合成による酸耐性機構¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、本結果（Fig.1）に見られるように、GABA生産活性が高いにも関わらず培養液pHが比較的低い菌株がいくつか（1007株や1037株など）存在したことから、培養液pHは菌株の酸生成能など他の要因によっても影響を受けることが示唆された。

次に、GABA高生産乳酸菌18菌株から、GABA生産活性および分離源の異なる3菌株を選抜し、以降の試験に供した。選抜した3菌株は、KM株（GABA生産量1.50mg/mL、ケニア共和国・マジワララ由来）、DH1株（GABA生産量2.64mg/mL、マレーシア・ダディヒ由来）および1056株（GABA生産量6.95mg/mL、中国内モンゴル自治区・ホロート由来）とした。

3. 同定試験

選択した3菌株の菌種同定を行うにあたり、それぞれの形態・生理および遺伝学性質を調べた。主な結果を基準株とともにTable1に示す。また、3菌株の16S rDNA部分配列をDDBJで相同性検索した後に、アクセッション番号AB759536（KM）、AB759535（DH1）およびAB759534（1056株）として登録した。以上の結果から総合的に判断し、KM株とDH1株を*Lc. lactis* subsp. *lactis*、1056株を*Lb. brevis*とそれぞれ同定した。いずれもGABA高生産乳酸菌種として広く知られる菌種であった⁵⁾。

4. GABA生産に及ぼす培地pHの影響

初発培地pHを3.0-8.0の範囲で変動させた10.0mg/mLグルタミン酸ナトリウム含有GABA生産用培地における選抜3菌株のGABA生産量をFig.2に示す。なお、図中のpHは培養後の培地pHを示している。

KM株とDH1株は、初発培地pH4.0以下のとき、培養液のpHにほとんど変化は見られず、十分な生育が確認さ

Table 1 Characteristics of selected strains

Strain	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KM	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DH1	<i>Lb. brevis</i> 1056	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NBRC 100933 ^T	<i>Lb. brevis</i> NBRC 107147 ^T
Source	Maziwa lala, Kenya	Dadih, Malaysia	Hurood, Mongolia	NBRC ¹	NBRC ¹
Form	Cocci	Cocci	Rods	Cocci	Rods
Gram stain	+	+	+	+	+
Motility	—	—	—	—	—
Catalase	—	—	—	—	—
Lactic acid isomer	L	L	L(D)	L ²	DL ³
Growth in 10°C	+	+	+	+	+
Growth in 15°C	+	+	+	+	+
Growth in 45°C	—	—	—	—	—
Homo/Hetero type	Homo	Homo	Hetero	Homo ²	Hetero ³
NH ₃ from arginine	+	+	+	+ ²	+ ³
Sugar fermentation					
Amygdalin	+	+	—	+	—
D-Arabinose	—	—	—	—	—
L-Arabinose	+	+	+	—	+
D-Cellobiose	+	+	—	+	—
Esculin	+	+	—	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+
Na-Gluconate	±	±	±	—	+
D-Lactose	+	+	+	+	±
D-Maltose	+	+	+	+	+
D-Mannitol	+	+	±	—	—
D-Mannose	+	+	—	+	—
D-Melezitose	—	—	—	—	—
D-Melibiose	—	—	±	—	+
L-Raffinose	±	—	—	—	—
L-Rhamnose	—	—	—	—	—
L-Ribose	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	—	+	—
D-Sorbitol	±	±	—	—	—
Sucrose	+	+	—	—	—
Trehalose	+	+	—	+	—
D-Xylose	+	+	+	+	+
L-Xylose	—	—	—	—	—
Glycerol	—	—	—	—	—
Erythritol	—	—	—	—	—
Adonitol	—	—	—	—	—
Methyl β-D-xylopyranoside	—	—	—	—	—
Methyl α-D-mannopyranoside	—	—	—	—	—
Methyl α-D-glucopyranoside	—	—	+	±	+
Sorbose	—	—	—	—	—
Dulcitol	—	—	—	—	—
Inositol	—	—	—	—	—
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	—	+	—
Inulin	—	—	—	—	—
Starch	±	±	—	±	—
Glycogen	—	—	—	—	—
Xylitol	—	—	—	—	—
Gentiobiose	+	+	—	±	—
D-Turanose	—	—	—	—	—
D-Lyxose	—	±	—	—	—
D-Tagatose	—	—	—	—	—
D-Fucose	—	—	—	—	—
L-Fucose	—	—	—	—	—
D-Arabitol	—	—	—	—	—
L-Arabitol	—	—	—	—	—
2-Ketogluconate	—	—	—	—	—
5-Ketogluconate	—	—	±	—	—

¹ Biological Resource Center, NITE, Japan.² Information from Hammes and Vogel (1995)¹⁶.³ Information from Teuber (1995)¹⁷.

Fig. 2 GABA concentrations (bar) in and pH (symbol) of the culture supernatants of strains KM (black), DH1 (white) and 1056 (gray) cultivated in media with initial pH 3.0-8.0
Each result represents the mean of three data points.

Fig. 3 GABA concentrations (bar) in and pH (symbol) of the culture supernatants of strains KM (black), DH1 (white) and 1056 (gray) cultivated in media supplemented with 1.0-100.0 mg/mL sodium glutamate
Each result represents the mean of three data points.

れなかった。また、GABA 生産も検出されなかった。両株の GABA 生産活性は初発培地 pH5.0 のとき最も高く、KM 株で 1.88mg/mL、DH1 株で 4.86mg/mL であった。また、両株は初発培地 pH が 5.0 から 8.0 にかけて高くなるにつれて、GABA 生産性は低下する傾向にあった。培養後の培地 pH が初発 pH の値 (5.0-8.0) に関わらず 4.5-5.0 付近に収束したことから考えると、両菌株の GAD 至適 pH は 4.5-5.0 付近であると推察される。この値は乳酸菌における一般的な GAD 至適 pH と一致している⁵⁾。

一方、1056 株は、KM 株および DH1 株と異なり、初発培地 pH4.0-8.0 で高い GABA 生産が確認され、初発 pH が高くなるにつれて GABA 生産量も高くなった (初発 pH8.0 で 7.34mg/mL)。また、初発/培養後培地 pH が 4.0/4.2 および 8.0/6.8 のいずれの場合でも高い GABA 生産性を示したことから、本菌株は *Lb. brevis* IFO12005⁶⁾ や *Lactobacillus paracasei* NFRI7415⁷⁾ で報告されているように比較的広範囲の pH で働く GAD を有している菌株であることが示唆さ

れた。

なお、以降の試験には、選抜した 3 菌株ともに GABA 生産活性が高かった初発培地 pH5.0 を用いることとした。

5. GABA 生産に及ぼす添加グルタミン酸ナトリウム濃度の影響

基質となるグルタミン酸ナトリウムの添加濃度を 1.0-100.0mg/mL で変動させた GABA 生産用培地 (pH5.0) における選抜 3 菌株の GABA 生産量および培養後培地 pH を測定した。その結果を Fig. 3 に示す。

KM 株では、1.0-5.0mg/mL の範囲内で添加グルタミン酸ナトリウム濃度に依存して GABA 生産量が増加したが、それ以上の濃度 (5.0-50.0mg/mL) では GABA 生産量が 1.88-3.59mg/mL と緩やかな上昇に留まった。DH1 株では、添加グルタミン酸ナトリウム濃度 1.0-10.0mg/mL で GABA 生産量の上昇が見られたが、それ以上の濃度 (10.0-50.0mg/mL) では GABA 生産量が 4.29-4.88mg/mL とほぼ一定であった。この結果は、KM 株と DH1 株の GABA 生産

Fig. 4 GABA concentrations (bar) in and pH (symbol) of the culture supernatants of strains KM (black), DH1 (white) and 1056 (gray) after 0-120 h of incubation
Each result represents the mean of three data points.

Fig. 5 GABA concentrations (bar) in and pH (symbol) of fermented chicken sauce using *Lactobacillus brevis* 1056
Each result represents the mean of three data points.

能に限界があることを示唆している。また、両菌株では、100.0 mg/mL グルタミン酸ナトリウム含有培地で GABA 生産の減少が確認された。

一方で、1056 株では、添加したグルタミン酸ナトリウム濃度に依存して GABA 生産量の増加が見られ、100.0 mg/mL グルタミン酸ナトリウムの添加で最大の GABA 生産 (46.32 mg/mL) が検出された。この値は、近年の総説⁵⁾に挙げられている乳酸菌の GABA 生産量のどの値 (最大で 345.83 mM = 35.66 mg/mL) よりも高く、本菌株が GABA 高生産乳酸菌として非常に有用であることが示された。また、培養後の培地 pH の上昇も大きく、添加グルタミン酸ナトリウム濃度が 100.0 mg/mL で pH 7.42 であった。このことは、1056 株の GABA 生産による酸耐性 (中和) 能が非常に優れていることを表していた。

6. GABA 生産量の経時的な変化

10.0 mg/mL グルタミン酸ナトリウム含有 GABA 生産用培地 (pH 5.0) に選抜した 3 菌株をそれぞれ 1% 接種して、

120 時間培養したときの GABA 生産量を経時的に測定した。その結果を Fig. 4 に示す。

KM 株と DH1 株では、培養 24 時間後でそれぞれ 0.40 および 2.31 mg/mL と低い GABA 生産量であったが、その後の時間の経過とともに培養上清中の GABA 含量が増加し、96 時間後にはそれぞれ 2.87 および 5.60 mg/mL に達した。そして、96 から 120 時間後にかけてはわずかな GABA 含量の上昇のみ確認された (KM 株で 2.93 mg/mL, DH1 株で 5.72 mg/mL)。GABA 生産菌には、対数増殖期から GAD を発現して GABA を生産するタイプと、定常期に入ってから GAD を発現して GABA 生産を開始するタイプが知られている¹⁴⁾¹⁸⁾が、Fig. 4 の結果から KM 株と DH1 株は後者のタイプであることが示唆された。

一方、1056 株は、培養 24 時間後ですでに 5.53 mg/mL と十分な GABA 生産を示し、その後 72 時間後に培養上清中の GABA 含量のピーク (6.56 mg/mL) を迎えるが、それほど大きな値の上昇は見られなかった。このことから、

1056 株は、対数増殖期から GAD を発現し、活発に GABA 生産を行うタイプと考えられた。

7. 鶏肉発酵調味液への応用

最後に、GABA を富化した新たな機能性食品の開発を目指し、選抜した GABA 高生産乳酸菌株を用いて、鶏肉発酵調味液の作製を試みた。1056 株による発酵 0-7 日後の GABA 生産量と調味液 pH の結果を Fig. 5 に示す。

KM 株と DH1 株では、鶏肉調味液の栄養成分が生育に適さなかったためか、培養前後の調味液 pH の変化はほとんどなく、GABA 生産も見られなかった（データ不掲載）。一方で、1056 株では培養前後で調味液 pH に変化が見られ、ゆっくりではあったが培養 4 日後まで GABA を生産し続けた。グルタミン酸ナトリウムを添加した GLYP 培地と比較すると、鶏肉発酵調味液中の GABA 含量は少なかったが、培養 4 日後で 1.51 mg/mL の GABA 生産が確認された。GABA の保健効果（血圧降下作用）が 10-20 mg 以上の摂取で認められるという過去の報告¹⁹⁾²⁰⁾を考慮すると、本結果は効果を期待できる十分な値と言えよう。また、本実験では生菌数およびグルタミン酸濃度を測定しなかったが、菌の生育や GABA 生産を促進するような成分、もしくは遊離のグルタミン酸量を増やすような酵素剤の選択・使用によって、より多量の GABA を含んだ調味液の開発が可能となると思われる。

本研究で選抜した乳酸菌株の中でも、特に *Lb. brevis* 1056 株は GABA 生産活性が高く（Fig. 1, 3）、短い培養時間で高濃度の GABA を生産した（Fig. 4）。また、pH4.0 のような酸性下や鶏肉調味液のような高塩濃度（約 4.5 % NaCl）下でも GABA 生産を行った（Fig. 2, 5）。以上のことから、1056 株は、様々な食品素材の発酵および GABA 生産に利用可能で、血圧降下やストレス緩和などの機能性を有する食品の開発に有用と思われる。さらに、本研究で作製した鶏肉調味液は、廃用鶏を有効活用した新たな特産品として地域産業にも貢献することが期待される。

要 約

GABA は、血圧降下作用やストレス緩和作用などの生理機能を有するタンパク質非構成アミノ酸である。本研究では、世界の発酵乳製品から分離した乳酸菌の中から GABA 生産活性の高い菌株を選抜し、GABA 生産活性に及ぼす諸要因について調べた。その結果、GABA 高生産乳酸菌として、*Lc. lactis* subsp. *lactis* KM、*Lc. lactis* subsp. *lactis* DH1 および *Lb. brevis* 1056 の 3 菌株を選抜した。中でも 1056 株は、GABA 生産活性が非常に高く、初発培地 pH4.0-8.0 の広い範囲で安定して GABA を生産した。また、1056 株は、基質となるグルタミン酸ナトリウムの濃度に依存して高くなる GABA 生産性を示し、さらに、培養後比較的短時間で多量の GABA を生産することが明らかとなった。これらの特徴は、1056 株が GABA を富化した機能性食品の

開発に有用であることを示している。1056 株で調製した鶏肉発酵調味液の GABA 含量（1.51 mg/mL）は、本菌株の食品利用への有用性をさらに支持するものであった。

本研究を遂行するにあたり、鶏肉調味液の調製に御協力頂いた岡山県農林水産総合センターの栗木隆吉氏に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Ueno, H., Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **10**, 67-79 (2000).
- 2) Jakobs, C., Jaeken, J. and Gibson, K.M., Inherited disorders of GABA metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **16**, 704-715 (1993).
- 3) Wong, C.G., Bottiglieri, T. and Snead O.C. 3rd., GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.*, **54**, S3-S12 (2003).
- 4) 藤澤倫彦, 中村康則, 早川和仁, 近藤しずき, 細野明義, 八村敏志, 保井久子, 福島浩平, 鈴木秀幸, 高橋賢一, 志田寛, 清水金忠, 榎本雅夫, 何 方, 原田 岳, 飯野久和, 信田幸大, 鈴木重徳, 五十君静信, プロバイオティクスの機能と利用, 「乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス」, 初版, 日本乳酸菌学会編, (京都大学学術出版会, 京都), pp. 495-559 (2010).
- 5) Li, H. and Cao, Y., Lactic acid bacteria cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*, **39**, 1107-1116 (2010).
- 6) Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S. and Oda, K., Purification and Characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1168-1171 (1997).
- 7) Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T. and Shima, J., Characterization of glutamate decarboxylase from a high gamma-aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 278-285 (2008).
- 8) Sethi, M.L., Enzyme inhibition XI: glutamate decarboxylase activity relationship with the reaction products as determined by the colorimetric and radioisotopic methods. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **19**, 847-854 (1999).
- 9) 内村 泰, 岡田早苗, 乳酸菌の同定実験法, 「乳酸菌実験マニュアル」, 初版, 小崎道雄編, (朝倉書店, 東京), pp. 21-124 (1992).
- 10) 大塚正盛, 岡田早苗, 内村 泰, 駒形和男, 乳酸菌同定のための生成乳酸タイプの簡易判定法: 高速液体クロマトグラフィー (光学分割カラム) による異性体の分割, 生物工学会誌, **72**, 81-86 (1994).
- 11) Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi, K. and Saito, T., Microbial community analysis of food-spoilage bacteria in commercial custard creams using culture-dependent and independent methods. *J. Dairy Sci.*, **91**, 2938-2946 (2008).
- 12) Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y. and Suzuki, I., Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 163-166 (1999).
- 13) Nomura, M., Kobayashi, M., Ohmomo, S. and Okamoto, T., Inactivation of the glutamate decarboxylase gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2235-2237 (2000).
- 14) Small, P.L. and Waterman, S.R., Acid stress, anaerobiosis and *gadCB*: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia*

- coli. Trends Microbiol.*, **6**, 214-216 (1998).
- 15) Ma, D., Lu, P., Yan, C., Fan, C., Yin, P., Wang, J. and Shi, Y., Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature*, **483**, 632-637 (2012).
- 16) Teuber, M., The genus *Lactococcus*. In "The genera of lactic acid bacteria," 1st ed., eds. Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H., Blackie Academic and Professional, pp. 173-234 (1995).
- 17) Hammes, W.P. and Vogel, R.F., The genus *Lactobacillus*. In "The genera of lactic acid bacteria," 1st ed., eds. Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H., Blackie Academic and Professional, pp. 19-54 (1995).
- 18) 早川 潔, 上野義栄, 河村真也, 谷口良三, 小田耕平, 乳酸菌による γ -アミノ酪酸の生産, 生物工学会誌, **75**, 239-244 (1997).
- 19) Stanton, H.C., Mode of action of gamma amino butyric acid on the cardiovascular system. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **143**, 195-204 (1963).
- 20) 梶本修身, 平田 洋, 中川聡史, 梶本佳孝, 早川和仁, 木村雅行, GABA 含有はっ酵乳製品の正常高値血圧者に対する降圧効果, 日本食品科学工学会誌, **51**, 79-86 (2004).

引用 URL

- i) <https://solutions.shimadzu.co.jp/cgi/ac?cmd=1&url=/solnavi/s/apl/a-news/1/1/1275.htm> (2012.9.4)

(平成 24 年 9 月 21 日受付, 平成 24 年 12 月 7 日受理)