γ-アミノ酪酸高含有カボチャ加工品製造と そのラット血圧上昇抑制作用

鶴澤昌好, 奥山知子, 村田真由美, 佐藤良二, 大森正司*

Development of Manufacturing Process of Squash Products Rich in γ-Aminobutyric Acid, and an Effect of the Products on the Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats

Masayoshi Uzawa, Satoko Okuyama, Mayumi Murata, Ryoji Sato and Masashi Omori*

Central Laboratory, LOTTE Co., LTD., 3-1-1, Numakage, Saitama-shi, Saitama 336-8601

* Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University, 12, Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8357

Glutamate decarboxylase (GAD: EC 4.1.1.15) exists widely in animals and plants, and it is contained much specially in animal's brain and in higher plants such as squash, carrot, and tomato. We found that the activity of squash GAD was the strongest in these plants. So we investigated about various nature of squash GAD in order to transform L-glutamic acid into γ-aminobutyric acid by using squash. In this study, it was found that reaction conditions of GAD and coenzyme, pyridoxal 5'-phosphate influenced on progress of L-glutamic acid transformation in squash. We examined the reaction conditions to make the transformation enough. Consequently, we found the best range of pH value, temperature, and the amount of L-glutamic acid for entire transformation using the activity of squash GAD fully. And we established the techniques of manufacturing squash products containing much γ-aminobutyric acid from squash with L-glutamic acid, or squash with casein hydrolysate containing L-glutamic acid. Furthermore, we confirmed an effect on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats of the products manufactured with these techniques.

(Received Nov. 2, 2001; Accepted Jun. 25, 2002)

γ-アミノ酪酸はGABAと略称され、神経抑制作用、精神安定などの機能を有していることがわかっている。さらに、血圧降下作用¹⁾、脳の新陳代謝促進作用²⁾、精神安定作用³⁾、腎機能改善作用等⁴⁾に効果がある物質としても近年注目され始めている。

食品中のγ-アミノ酪酸を増強した食品としては、1987年に農林水産省野菜・茶業試験場が、茶葉を嫌氣的に処理して得た茶を「ギャバロン茶」として開発している⁵⁾。この「ギャバロン茶」のγ-アミノ酪酸含有量は乾燥茶葉100g中100mg以上と、通常の茶の10~30mg/100gに

比較して非常に多くなっている。また、米胚芽を加工することによりγ-アミノ酪酸含量を大幅に増加できることが知られており⁶⁾、米や米胚芽を水に浸漬して、γ-アミノ酪酸を富化させる方法が開発されている⁷⁾。通常のコシヒカリはγ-アミノ酪酸含量が25~50mg/100g程度であるが、この方法で処理した結果、γ-アミノ酪酸含有量を約10倍に高めることができる⁸⁾。この他、γ-アミノ酪酸の含量を上げるために乳酸菌、酵母、クロレラ、麹など利用したγ-アミノ酪酸を高濃度含有する食品素材の製造方法なども研究されている⁹⁾¹⁰⁾。

株式会社ロッテ中央研究所 (〒336-8601 埼玉県さいたま市沼影3-1-1)

* 大妻女子大学家政学部 (〒102-8357 東京都千代田区三番町12)

γ -アミノ酪酸はグルタミン酸脱炭酸酵素の働きで、グルタミン酸から生成されることが知られており、市販のグルタミン酸脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.15, Glutamate decarboxylase) を用いれば、 γ -アミノ酪酸高含有素材の製造は簡単に達成されるが、酵素の活性保持のためには食品に使用できない合成品のピリドキサル 5'-リン酸 (以後 PLP と略) やメルカプトエタノールを添加する必要がある、現実的には食品への利用は難しい。

このグルタミン酸脱炭酸酵素は高等植物であるカボチャ、ニンジンなどに存在しており¹¹⁾、生野菜の粉碎物にグルタミン酸ナトリウムを混合して放置すれば γ -アミノ酪酸を生産させることが可能であると考えられるが、単純には γ -アミノ酪酸を高含有量にすることは出来ていない。そこで本研究では、野菜等の高等植物のグルタミン酸脱炭酸酵素活性、及び反応条件等を検討し、緑黄色野菜を原料として初めて γ -アミノ酪酸高含有素材を開発し、また、その素材の血圧上昇抑制効果を確認したので報告する。

実験方法

1. 各種野菜のグルタミン酸脱炭酸酵素活性測定法

西洋カボチャ (*Cucurbita maxima* Duch, 以後カボチャと呼ぶ)、キュウリ、ニンジン、ダイコン (以上市販品を購入) をフードプロセッサに約 10 秒間かけて約 1 mm 角以下になるまで粉碎し、各 5 g に 0.1% グルタミン酸溶液 10 ml を加え、40℃ で 2 時間振とうした。振とう前後の γ -アミノ酪酸含量をアミノ酸分析計 (日本電子 JLC-300) を用いて測定し、 γ -アミノ酪酸生成量を算出した。

2. カボチャのグルタミン酸脱炭酸酵素の分画法¹²⁾

カボチャ 1 kg に 0.01 mM PLP を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8: 以後 A 緩衝液と呼ぶ) 1.5 l を加えてフードプロセッサに約 10 秒間かけて約 1 mm 角以下になるまで粉碎後、ミキサーに約 15 秒かけて液状にし、さらに乳鉢で摩砕し、遠心分離 (10000×g, 20 分) した上清をろ過し、ろ液に A 緩衝液で平衡化させたイオン交換樹脂 (DEAE cellulose, 乾燥重量 100 g) を加えて 4℃ 30 分間攪拌して吸着させ、0.1 M 塩化ナトリウムを含む A 緩衝液 1 l で樹脂を洗浄後、0.3 M 塩化ナトリウムを含む A 緩衝液 1 l で樹脂から溶出した。溶出液を 70% 飽和硫酸沈殿させ、A 緩衝液で透析後、透析膜内液を凍結乾燥して粗酵素とした。

3. カボチャから抽出精製した粗酵素の活性測定法

(1) グルタミン酸脱炭酸酵素活性測定法¹²⁾

粗酵素 3-5 mg を冷水 1 ml に溶解した粗酵素液 20-100 μ l に 2 mM PLP 100 μ l を添加し、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) を加えて全容を 900 μ l の反応液とした。反応液を 40℃ 湯浴中で 3-5 分間加熱し、0.2 M グルタミン酸 100 μ l を加えて反応を開始し、1-20 分後に 4N 塩酸 50 μ l を添加して反応停止し、反応液中の γ -アミノ酪酸含量をアミノ酸分析計を用いて測定し、セミマイクロゲル法で測定したタンパク質含量を用いて比活性を算出した。

(2) 活性に及ぼす B₆ 補酵素の影響

蒸留水 50 ml に粗酵素 100 mg, PLP 12.3 mg または塩酸ピリドキシン 9.5 mg を添加して、40℃ 湯浴中で加熱し、グルタミン酸 1 g を加えて反応を開始させ、24 時間攪拌後の反応液中のグルタミン酸量、 γ -アミノ酪酸量をアミノ酸分析計を用いて測定した。

4. カボチャ粉碎液を使用したグルタミン酸変換反応効率化の検討

(1) カボチャ粉碎液調製法

カボチャの種子を除去し、蒸留水を加えてフードプロセッサに約 10 秒間かけて約 1 mm 角以下になるまで粉碎後、ミキサーに約 15 秒かけて液状にし粉碎液とした。

(2) カボチャ粉碎液を利用したグルタミン酸変換反応に対する pH、温度条件の検討

カボチャ粉碎液 (カボチャ 20 g, 蒸留水 40 ml を含む) にグルタミン酸 1 g を添加して攪拌しながら、0.3 N 塩酸を滴下して pH を一定に保持し (pH スタット法)、温度一定にて 16 時間変換反応を行なった。

(3) カボチャ粉碎液を利用したグルタミン酸変換反応における基質添加量の検討

カボチャ粉碎液 (カボチャ 15 g, 蒸留水 50 ml を含む) にグルタミン酸を添加し、25℃ で攪拌しながらグルタミン酸全てが γ -アミノ酪酸に変換するまで長時間変換反応を行なった。

(4) カボチャ粉碎液を利用したグルタミン酸変換反応における基質添加法の検討

i) 一括添加法

カボチャ粉碎液 (カボチャ 150 g, 蒸留水 500 ml を含む) にグルタミン酸 15 g を添加して室温 (25±1℃) で攪拌した。

ii) 分割添加法

カボチャ粉碎液 (カボチャ 150 g, 蒸留水 500 ml を含む) にグルタミン酸 1 g を添加して室温 (25±1℃) で攪拌し、グルタミン酸の添加により低下した pH が 6.0 ま

で上昇してから、次の1gを添加した。これを15回繰り返して合計15gのグルタミン酸を添加した。グルタミン酸を最初に添加した時点をスタートとし、最後にグルタミン酸を添加した後 γ -アミノ酪酸の生成によりカボチャ粉砕液のpHが6.2に上昇するまでの時間を反応時間とした。

(5) 反応後のカボチャ粉砕液からの水溶性成分分析法

反応後のカボチャ粉砕液を遠心分離(2,200×g, 10分間)して固形分を除去した上清を加熱後、不溶物を濾別(濾紙, ADVANTEC No. 1)して凍結乾燥した。なお、これらについて、グルタミン酸及び γ -アミノ酪酸含量をアミノ酸分析計を用いて測定した。

5. グルタミン酸供給源としてカゼイン加水分解物を使用した γ -アミノ酪酸高含有素材調製の検討

カボチャ粉砕液(カボチャ150g, 蒸留水400ml)を含むを攪拌し、カゼイン加水分解物50g(カゼインを塩酸で加水分解したグルタミン酸約20%含有するもので成分組成をTable 1に示す。)を一度に添加して、pHスタット法(1N塩酸使用)によりpHを5.8に保持しながら室温(25±1℃)にて16時間変換反応を行なった。

6. γ -アミノ酪酸高含有素材の血圧上昇抑制効果試験

(1) 試料

i) カボチャ加工品I

カボチャ粉砕液(カボチャ1500g, 蒸留水4.5lを含む)にグルタミン酸150gを分割して添加して攪拌し、室温(25±1℃)にて一定時間保持して、グルタミン酸のほぼ100%を γ -アミノ酪酸に変換させた。反応終了後、

反応液を遠心分離した上清液の加熱処理を行ない、ろ過後、ろ液にデキストリンを加えて噴霧乾燥した。

ii) カボチャ加工品II

カボチャ粉砕液(カボチャ2500g, 蒸留水4lを含む)に、カゼイン加水分解物400gを添加して攪拌し、室温(25±1℃)でpHスタット法によりpHを5.8に一定時間保持して、グルタミン酸のほぼ100%を γ -アミノ酪酸に変換した。反応終了後反応液を遠心分離した上清液の加熱処理を行ない、ろ過したろ液を凍結乾燥した。

iii) カボチャ加工品III

カボチャ粉砕液(カボチャ1250g, 蒸留水2lを含む)を95℃以上まで加熱した後、カゼイン加水分解物200gを添加して溶解した。これを再び加熱処理し、遠心分離した上清液をろ過したろ液を凍結乾燥した。

各カボチャ加工品の組成をTable 1に示した。

(2) 動物実験

i) 食塩負荷条件による血圧上昇抑制試験(食塩負荷加速試験)

高血圧自然発症ラット(以降SHR系ラットと呼称)雄4週齢(140~160g)を星野動物飼育所より購入し、日本クレア製CE-2を投与して予備飼育を行なった。2週間の予備飼育後、6週齢において、各群の血圧の平均値が同じになるように、1群6匹として4群に分けた。1群には対照区として粉末CE-2の5%セルロース含有飼料と飲料水を、2群には粉末CE-2の5%食塩含有飼料と飲料水を、3, 4群には粉末CE-2の5%食塩含有飼料とカボチャ加工品I, IIの0.5%水溶液をそれぞれ供与し、

Table 1 Composition of casein hydrolysate and squash products

	Energy (kcal/ 100g)	Water (g/100g)	Protein*			Fat (g/100g)	Carbo- hydrates (g/100g)	Minerals	
			Total (g/100g)	γ -Amino- butyric acid (g/100g)	L-gluta- mic acid (g/100g)			Total (g/100g)	Sodium (mg/100g)
Casein hydrolysate	344	3.7	82.9	0.0	20.4	0.1	2.8	10.5	5400
Squash products									
Sample I	384	2.3	12.1	10.0	0.0	0.0	83.9	1.7	25
Sample II	324	6.0	61.0	10.0	0.5	0.0	20.0	13.0	2218
Sample III	322	4.8	60.5	0.2	0.5	0.0	20.0	12.5	2035

Casein hydrolysate was made from casein by acid hydrolysis. Sample I was made by the reaction of squash and L-glutamic acid mixture, and γ -aminobutyric acid contents was adjusted to 10% by the addition of the dextrin solution. Sample II was made by the reaction of squash and L-glutamic acid mixture, and γ -aminobutyric acid contents was adjusted to 10% by the casein hydrolysate. Sample III was made from sterilized squash and casein hydrolysate mixture. *Protein contains free amino acids.

Table 2 The amount of γ -aminobutyric acid formed by glutamate decarboxylase in various vegetables

Vegetables	γ -Aminobutyric acid (mg/100 ml)		
	Before incubation ^a	After incubation ^b	Amount formed ^{b,a}
Squash	18.2	72.5	54.3
Cucumber	4.9	63.3	58.4
Carrot	20.1	25.5	5.4
Radish	10.4	20.7	10.3

Homogenates of vegetables were incubated in 0.1% L-glutamic acid solution for 2 hours at 40°C. γ -Aminobutyric acid in the solution was measured using an amino acid analyzer.

自由摂取とした。ラットは個別ケージを用いて温度 22±2°C、湿度 55±2%、1 日 12 時間の昼夜サイクル下の空調動物室で飼育した。

試験期間は 6 週齢から 10 週齢（約 1 ケ月）までとし、血圧変化を測定した。また毎週 1 回、体重、飲料量、血圧の測定を行なった。血圧測定はラット尾静脈でのプレチモグラフィを応用したテイルカフ法で行なった。測定にはヴェダアヴァンセ(株)製プレチモ式ラット血圧計 UR・5000 を用いた。観察終了後屠殺解剖し、臓器所見、臓器重量測定、臓器アミノ酸分析を行なった。

ii) 血圧上昇抑制試験

SHR 系雄ラット 5 週齢（140～160 g）を星野動物飼育所より購入し、日本クレア製 CE-2 を投与して予備飼育を行なった。2 週間の予備飼育後、7 週齢において各群の血圧の平均値が同じになるように、1 群 5 匹ずつ 3 群に分けた。1 群には飲料水を、2 群にはカボチャ加工品Ⅱの 0.1% 溶液を、3 群にはカボチャ加工品Ⅲ 0.1% 溶液を供与し、それぞれ自由摂取とした。ラットは個別ケージを用いて温度 22±2°C、湿度 55±2%、1 日 12 時間の昼夜サイクル下の空調動物室で飼育した。

試験期間は 7 週齢から 15 週齢（約 2 ケ月）までとし、血圧変化を測定した。体重、飲料量、血圧の測定は i) と同様に行ない、観察終了後、屠殺解剖し、臓器所見、臓器重量測定、測定は臓器アミノ酸の分析を行なった。また、この実験計画及び実施にあたっては、“実験動物の飼育及び保管等に関する基準”¹³⁾ を遵守して行なった。

実験結果及び考察

1. 各種野菜のグルタミン酸脱炭酸酵素活性の比較

グルタミン酸脱炭酸酵素は高等植物の野菜ではカボチャ、キュウリ、ニンジン、ダイコン、トマトなどに多

く含まれる。そこでカボチャ、キュウリ、ニンジン、ダイコンのグルタミン酸脱炭酸酵素活性を γ -アミノ酪酸生成量として測定し、Table 2 において結果を比較した。カボチャ、キュウリの γ -アミノ酪酸生成量はニンジン、ダイコンよりも多く、高いグルタミン酸脱炭酸酵素活性を示した。

2. カボチャのグルタミン酸脱炭酸酵素の性質

各種野菜と比較してグルタミン酸脱炭酸酵素活性が高く、 γ -アミノ酪酸含量が最も多くなったカボチャについて粗酵素を抽出、精製し、その性質を調べた。

(1) 抽出酵素の性質

Table 3 に示すように、カボチャ粉砕液を遠心分離した上清である粗抽出液をイオン交換 DEAE Cellulose 処理すると、グルタミン酸脱炭酸酵素の比活性は 5.5 倍に、透析・凍結乾燥後の粗酵素では 18 倍となった。粗酵素の至適 pH は 5.8、至適温度は 60°C であり、文献値と一致した¹⁴⁾。

(2) 酵素反応時の補酵素の影響

カボチャのグルタミン酸脱炭酸酵素は補酵素として酵素 1 分子当たり平均 3.8 分子の PLP を持つピリドキサル酵素であり、pH が高くなると PLP が離脱し、酵素活性が低下することが知られている¹²⁾。

今回抽出した粗酵素も、抽出操作で補酵素が一部離脱したと思われ、酵素反応の際には補酵素を添加しなければ酵素活性は低かった。グルタミン酸脱炭酸酵素を食品に加えて、食品中の γ -アミノ酪酸含量を増加させるためには、酵素活性を維持しなければならないが、食品の製造には食品や食品添加物以外は使用できない。そのため、添加する補酵素として、食品添加物として許可されていない PLP の代わりに、食品添加物である塩酸ピリドキシンが使用できないかどうかを検討した。

Table 3 Summary of purification of squash glutamate decarboxylase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Yield (%)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)
Crude extract	12505	3155	100.0	0.25	1.0
DEAE-cellulose treatment fraction	861	1183	37.5	1.37	5.5
Crude enzyme	147	673	21.3	4.58	18.2

Glutamate decarboxylase activity was assayed by measuring γ -aminobutyric acid using an amino acid analyzer. The reaction mixture contained 70–78 mM phosphate buffer, pH 5.8, 20 mM L-glutamic acid, 0.2 mM pyridoxal 5'-phosphate, and enzyme solution in a final volume of 1.0 ml. The mixture was incubated at 40°C. Enzyme unit was defined as micromoles of γ -aminobutyric acid produced per 1 min.

カボチャから抽出した粗酵素を PLP または塩酸ピリドキシンとともにインキュベートして、グルタミン酸を添加して酵素反応を行ない、24 時間後のグルタミン酸量および γ -アミノ酪酸量を測定して酵素活性を比較した。その結果、Table 4 に示すように、塩酸ピリドキシン添加時のグルタミン酸量は PLP 添加時と比較して多く、一方塩酸ピリドキシン添加時の γ -アミノ酪酸量は、PLP 添加時より少なかった。このように PLP 添加では、グルタミン酸が γ -アミノ酪酸に変換されたが、塩酸ピリドキシン添加ではグルタミン酸はほとんど γ -アミノ酪酸に変換されずに残存しており、酵素活性は低かった。このことから、酵素活性を維持するためには B₆ 補酵素が必要であるが、その補酵素形は PLP であり、塩酸ピリドキシンでは代用できないことが分かった。このことは、データは示していないが、カボチャ粉砕液から残渣を遠心除去した抽出液を用いてグルタミン酸の変換反応を行った場合も同様であり、PLP を添加することにより γ -アミノ酪酸生成量は増加したが、塩酸ピリドキシンでは変化しなかった。

これらの結果から、カボチャから抽出したグルタミン酸脱炭酸酵素に、補酵素として塩酸ピリドキシンを添加して γ -アミノ酪酸高含有素材を製造することはできないことがわかり、カボチャ中の PLP を保持してグルタミン酸の変換反応を行なう条件を検討した。

3. カボチャ粉砕液を使用したグルタミン酸変換反応効率化の検討

(1) pH スタット法により測定したカボチャ粉砕液の至適 pH

粗酵素液では酵素反応の至適 pH は 5.8 であったが、カボチャ粉砕液を使用してグルタミン酸を γ -アミノ酪酸に変換する場合、グルタミン酸変換率 (γ -アミノ酪

Table 4 Effect of vitamins on the amount of L-glutamic acid and γ -aminobutyric acid after the enzyme reaction

Vitamins	L-Glutamic acid (mg)	γ -Aminobutyric acid (mg)
Pyridoxal 5'-phosphate	246	709
Pyridoxine hydrochloride	958	168

The reaction mixture contained 50 ml of distilled water, 100 mg of crude enzyme, and 12.3 mg of pyridoxal 5'-phosphate or 9.5 mg of pyridoxine hydrochloride. The mixture was incubated at 40°C, and the reaction started after addition of 1 g of L-glutamic acid to the mixture as a substrate. After 24 hours, L-glutamic acid and γ -aminobutyric acid in the mixture were measured using an amino acid analyzer.

酸生成量 $\times 100$ / 反応前のグルタミン酸全量から生成する γ -アミノ酪酸生成量) が最も高くなる至適 pH を室温 (25 $\pm$ 1°C) にて pH スタット法によって調べた。

Fig. 1 に示すように、カボチャ粉砕液によるグルタミン酸の γ -アミノ酪酸への変換率は、pH 5.7–5.9 で最も高かった。

(2) 反応温度によるグルタミン酸変換率の違い

粗酵素液では酵素反応の至適温度は 60°C であったが、カボチャ粉砕液を使用してグルタミン酸を γ -アミノ酪酸に変換する場合、グルタミン酸変換率が最も高くなる至適温度を調べた。反応中の pH は、カボチャ粉砕液によるグルタミン酸変換率が pH 5.7–5.9 で最も高かったため、pH スタット法により 5.8 に保持した。その結

Fig. 1 Effect of pH value on the conversion ratio of L-glutamic acid

Twenty gram of crushed squash were incubated with 40 ml of distilled water containing 1 g of L-glutamic acid for 16 hours at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). The incubation was performed at various pH value (5.4, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.2) individually. The conversion ratio of L-glutamic acid was calculated by measuring γ -aminobutyric acid of the mixture using an amino acid analyzer.

Table 5 Effect of reaction temperature on the conversion ratio of L-glutamic acid

Reaction temperature	The conversion ratio of L-glutamic acid (%)
25°C	46.2
30°C	39.2
40°C	20.8

The reaction mixtures contained 40 ml of distilled water and 20 g of squash. The mixture was incubated at 25, 30, 40°C individually, and the reactions started after addition of 1 g of L-glutamic acid to the mixtures as substrate. The pH value of the mixtures were maintained at 5.8 by addition of 0.3N HCl during the reactions. After 16 hours, L-glutamic acid and γ -aminobutyric acid in the mixtures were measured using an amino acid analyzer, and the conversion ratio of L-glutamic acid was calculated.

果, Table 5 に示すようにグルタミン酸変換率は反応温度が高くなるに従って低下した。

(3) 基質 (グルタミン酸) 添加量の検討

これまでの検討の結果, カボチャ粉砕液を使用した変換反応におけるグルタミン酸変換率は, pH の保持, 反

応温度の調節によって向上することが分かった。カボチャを利用して γ -アミノ酪酸高含有素材を製造するに当たって, 一定量のカボチャがグルタミン酸をどれだけ γ -アミノ酪酸に変換可能であるか調べた。その結果, Table 6 に示すようにカボチャ 15 g に対してグルタミン酸を 1.0 g 添加した場合も, 1.5 g 添加した場合もグルタミン酸変換率はほぼ 100% に達していた。また, 反応後のカボチャ粉砕液水溶性成分の凍結乾燥物中の γ -アミノ酪酸含量は, グルタミン酸を 1.0 g 添加した場合 19.4%, 1.5 g 添加した場合は 34.4% であった。しかし, グルタミン酸を 2.0 g 以上添加した場合は変換が不充分 (グルタミン酸変換率 60% 未満) で, 反応後もグルタミン酸が残存していた。この結果から, 15 g のカボチャを用いた場合, 1.5 g 以下のグルタミン酸は完全に γ -アミノ酪酸に変換可能であることが分かった。

(4) 基質添加法の検討

これまでの検討の結果, カボチャ粉砕液を使用してグルタミン酸の γ -アミノ酪酸への変換反応を行なう場合, 反応液の pH を 5.7-5.9 に保持するよう pH 調整すると, 変換効率が高くなることが分かった。グルタミン酸添加量が少ない場合は γ -アミノ酪酸生成による pH の上昇を抑えるために酸の滴下が必要であった。前項の検討により, カボチャ 15 g に対してグルタミン酸を 1.5 g 添加できることが分かったが, 多量のグルタミン酸を一度に

Table 6 Effect of the adding amount of L-glutamic acid on the concentration of γ -aminobutyric acid in squash product

The adding amount of L-glutamic acid (g)	The conversion ratio of L-glutamic acid (%)	The concentration of γ -Aminobutyric acid (%)
1.0	99.7	19.4
1.5	99.8	34.4

The reaction mixtures contained 50 ml of distilled water and 15 g of squash. The mixtures were incubated at 25°C, and the reactions started after addition of 1 g of L-glutamic acid to the mixtures as substrate. After the reactions, the mixtures were centrifuged for 10 min. at 2200×g, and then the supernatants were freeze-dried. L-Glutamic acid and γ -aminobutyric acid in the dried supernatants were measured using an amino acid analyzer, and the conversion ratio of L-glutamic acid was calculated.

加えることによる pH の低下を緩和するため、水酸化ナトリウム等のアルカリ溶液を滴下して pH 調整する必要があった。しかし、塩の形成による製品の呈味への影響と、 γ -アミノ酪酸の血圧上昇抑制作用を検討する場合のナトリウムの阻害作用が問題と思われた。そこで、酸を滴下せず、基質であるグルタミン酸の添加方法を工夫することにより pH を調整する方法を検討した。

カボチャ粉砕液の pH は通常 7.0 付近であり、カボチャ粉砕液にグルタミン酸を加えると溶液の pH は低下する。グルタミン酸が酵素変換されて出来る γ -アミノ酪酸は弱アルカリ性のアミノ酸であるため、変換反応の進行に伴い pH は上昇する。pH が上昇したときにグルタミン酸を加えると pH は低下する。このようにグルタミン酸を少量ずつ添加することによって pH 調整が可能であると考えられ、グルタミン酸による pH 調整を試みた。

なお、グルタミン酸は水への溶解度が低く、水溶液として添加するには多量の溶液を必要とするので粉体のまま投入し、カボチャ粉砕液中で攪拌しながら徐々に溶解させた。また、グルタミン酸分割添加の場合、グルタミン酸を全量添加後も γ -アミノ酪酸が生成すると pH が上昇するが、この時のカボチャ粉砕液の pH とグルタミン酸変換率の関係を調べた結果、pH が 6.2 以上でグルタミン酸はほぼ 100% γ -アミノ酪酸に変換され、それ以上 pH が上昇するまで攪拌を続けてもグルタミン酸変換率はほとんど変化しなかったことから、pH が 6.2 になった時点で反応終了とした。

カボチャ 150 g 分のカボチャ粉砕液に、グルタミン酸

Table 7 Effect of the way of L-glutamic acid addition on the conversion ratio of L-glutamic acid

The way of L-glutamic acid addition	The conversion ratio of L-glutamic acid (%)
Addition collective	24.6
Addition in steps	99.4

The reaction mixtures contained 500 ml of distilled water and 150 g of squash. The mixtures were incubated at room temperature (25±1°C), and the reactions started after the first addition of L-glutamic acid to the mixtures. After 17 hours, the mixtures were centrifuged for 10 min. at 2200×g, and then the supernatants were freeze-dried. L-Glutamic acid and γ -aminobutyric acid in the dried supernatants were measured using an amino acid analyzer, and the conversion ratio of L-glutamic acid was calculated.

15 g を 1 g ずつ分割して、pH 6.0 になる毎に加えてグルタミン酸変換反応を行なった結果、pH の低下は少なく、最低でも 5.0 以上であった。また、グルタミン酸を全量添加し終わってからカボチャ粉砕液の pH が 6.2 になるまでの時間（反応時間）は 17 時間であり、グルタミン酸変換率は Table 7 に示すように 99.4% であった。一方、カボチャ 150 g 分の粉砕液に、グルタミン酸 15 g を一度に添加した場合は、pH が 4.0 以下に低下してほとんど

Table 8 Effect of the squash products on the food intake, water intake and body weight gain of spontaneously hypertensive rats (SHR) dosed with NaCl

	Food intake (g/day)	Water intake (ml/day)	Body weight		Gain (g/day)
			Initial (g)	Final (g)	
i) SHR					
Control rats (CE-2)	20.9±3.1	24.0±3.0	226±10.1	284±10.6	2.1
CE-2 containing 5% NaCl	21.0±2.2	59.7±5.0*	236± 8.6	296± 5.5	2.1
CE-2 containing 5% NaCl and 0.5% sample I	17.9±3.6	50.0±8.9*	240± 2.0	300± 6.8	2.2
CE-2 containing 5% NaCl and 0.5% sample II	18.5±2.9	42.9±6.8*	242± 9.3	299± 7.9	2.0
ii) SHR					
Control rats (CE-2)	19.5±3.0	25.1±2.8	158± 7.5	314±15.0	2.8
CE-2 and 0.1% sample II	20.0±2.9	23.9±3.1	157±13.2	307±16.5	2.7
CE-2 and 0.1% sample III	18.8±3.4	24.2±3.5	159±10.1	308±18.0	2.7

Each value is presented as the mean±SD for 6 males in i) SHR, and 5 males in ii) SHR.

The feeding periods were 4 weeks for i) SHR, 8 weeks for ii) SHR.

*P<0.05 compared with the control rats in each group of water intake.

上昇せず、分割添加の反応が終了した、反応開始 17 時間後のグルタミン酸変換率は 24.6% であった。

このように、カボチャ 150 g 分の粉砕液にグルタミン酸 15 g を添加して変換反応を行なった場合、グルタミン酸を分割添加すると pH を 5.0-6.0 の間に維持することができ、グルタミン酸をほぼ 100% γ -アミノ酪酸に変換できた。この場合の反応後の水溶性成分凍結乾燥物の γ -アミノ酪酸含量は 36.3% と高濃度になっていた。

pH を 5.0-6.0 に維持した結果、反応時間が短縮され、かつグルタミン酸変換率が高くなったのは、カボチャのグルタミン酸脱炭酸酵素の補酵素 PLP が保持され、酵素活性が維持されたためと思われる。

なお今までの実験結果では、最も酵素活性が高いカボチャを使用して、最適条件下でグルタミン酸変換反応を行なった場合、反応時間は 5 時間であった。

4. カゼイン加水分解物を使用した γ -アミノ酪酸高含有素材の調製

前項において、カボチャ中の酵素を用いてグルタミン酸を γ -アミノ酪酸に変換し、 γ -アミノ酪酸を 35% 以上の高濃度で含有する素材を製造する方法を確立した。この素材をデキストリン溶液で希釈して乾燥させ、 γ -アミノ酪酸を 10% 含有する γ -アミノ酪酸高含有素材を調製し、これをカボチャ加工品 I とした。また同様に、グルタミン酸の代わりにカゼイン加水分解物（グルタミン酸ナトリウムをグルタミン酸として 20% 含有）を使用し

て、 γ -アミノ酪酸高含有素材を製造する方法を検討した。カゼイン加水分解物を使用した場合、添加時の反応液の pH 低下が起こらないため、基質は一度に添加し pH スタット法により pH を 5.8 に保持して反応を行なった。その結果、カゼイン加水分解物中のグルタミン酸のほぼ全量 (98.3%) を γ -アミノ酪酸に変換することができ、また、カボチャ粉砕液の反応後の水溶性成分凍結乾燥物の γ -アミノ酪酸含量は 10.0% となった。（カボチャ加工品 II）このように、グルタミン酸を含むカゼイン加水分解物を使用した場合でも、カボチャ中のグルタミン酸脱炭酸酵素を用いてグルタミン酸を γ -アミノ酪酸に変換し、 γ -アミノ酪酸高含有素材を製造することができた。

5. γ -アミノ酪酸高含有素材の血圧上昇抑制効果

上記の γ -アミノ酪酸高含有素材（カボチャ加工品 I 及び II）を用いて、SHR に対する血圧上昇抑制効果の確認を行なった。

(1) 食塩負荷 SHR 系雄ラットに対する血圧上昇抑制効果

Table 8 に全実験期間中のラットの摂取量、飲水量、体重の変化を示した。摂取量、体重の変化については各群間に有意の差は認められなかった。しかし、飲水量においては食塩負荷により、いずれの群においても有意に増加した。Table 9 に実験期間中の試験区（試料供与群）ラットと対照区（水供与群）ラットの血圧の変化を示し

Table 9 Effect of the squash products on the blood pressure level in SHR dosed with NaCl and basal diet

	Systolic blood pressure		Rise in the systolic blood pressure (mmHg/28 days)
	Initial (6 weeks old) (mmHg)	Final (10 weeks old) (mmHg)	
i) SHR			
Control rats basal (CE-2)	142±10.0	185± 8.6	43± 9.3
CE-2 containing 5% NaCl	142± 6.8	220± 9.0* ¹	78± 7.9* ¹
CE-2 containing 5% NaCl and 0.5% sample I	142± 7.4	190± 5.6* ¹	48± 6.5* ¹
CE-2 containing 5% NaCl and 0.5% sample II	142± 9.6	208± 6.3* ¹	66± 8.0* ¹
	Initial (7 weeks old) (mmHg)	Final (15 weeks old) (mmHg)	Rise in the systolic blood pressure (mmHg/56 days)
ii) SHR			
Control rats (CE-2)	184± 8.5	235±12.4	51±10.5
CE-2 and 0.1% sample II	184± 8.2	223± 6.6* ²	39± 7.4* ²
CE-2 and 0.1% sample III	184±10.4	235± 9.3	51± 9.9

Each value is presented as the mean±SD for 6 males in i) SHR, and 5 males in ii) SHR.

^{*1} P<0.05 compared with the CE-2 diet containing 5% NaCl, ^{*2} P<0.05 compared with the CE-2 with 0.1% sample III.

た。群分けした時点での平均血圧は試験区、対照区の各群共 142 mm Hg と同じであった。試験を開始してから 4 週後の 5% 食塩含有 CE-2、水自由摂取群の血圧は対照区 (CE-2、水自由摂取群) よりも 35 mmHg の血圧上昇が認められ、食塩の負荷が血圧上昇に影響を及ぼしていることが示された。一方、5% 食塩含有 CE-2、水自由摂取群に対して、カボチャ加工品 I 溶液自由摂取群では 30 mm Hg、カボチャ加工品 II 溶液自由摂取群では 12 mm Hg の血圧上昇抑制が認められた。カボチャ加工品 I 溶液自由摂取群と比較して、カボチャ加工品 II 溶液自由摂取群では、血圧上昇抑制が半分以下であった。カボチャ加工品 II にはカゼイン加水分解物由来の食塩が多く含まれているが (Table 1)、飼料由来の食塩と比較すると約 200 分の 1 と微量であるため、血圧への影響は無視できると思われる。従って、カボチャ加工品 I と比較して、カボチャ加工品 II の血圧上昇抑制効果が低かった原因は、カボチャ加工品 II 中の食塩以外の成分と考えられた。

なお、臓器重量、臓器所見、及び臓器中の遊離アミノ酸含量は各試験区間に顕著な差は認められなかった。

(2) SHR 系雄ラットに対する血圧上昇抑制効果

Table 9 に実験期間中の試験区 (カボチャ加工品 II 溶液供与群) と対照区 (水供与群、カボチャ加工品 III 溶液

供与群) の血圧の変化を示した。群分けした時点での平均血圧は試験区、対照区の各群共 184 mm Hg と同じであった。試験を開始してから 8 週間後の対照区の水供与群およびカボチャ加工品 III 溶液供与群の血圧は 235 mm Hg と同一であり、カボチャ加工品 II 溶液供与群では 223 mm Hg と、12 mm Hg の血圧上昇抑制が認められた。

カボチャ加工品 II には血圧上昇抑制効果が認められたが、カボチャ加工品 II とは γ -アミノ酪酸含量以外の成分組成が等しいカボチャ加工品 III には血圧上昇抑制効果が認めらなかったことから、カボチャ加工品によるラットの血圧上昇抑制効果は、カボチャ加工品中の γ -アミノ酪酸が主として作用していることが示唆された。しかしながら、カボチャ加工品 II の製造工程では、カボチャ中のグルタミン酸脱炭酸酵素が中心に作用しているが、カボチャ粉砕液を用いていることから、一部副産物が生成していることも考えられ、この点については検討が必要と思われる。

なお、臓器重量、臓器所見、及び臓器中の遊離アミノ酸含量は各試験区間に顕著な差は認められなかった。

要 約

グルタミン酸脱炭酸酵素は動植物界に広く存在する酵

素であり、高等植物ではカボチャ、キュウリ、ニンジン、トマトなどに多く含まれる。これらの高等植物の中では、カボチャが最もグルタミン酸脱炭酸酵素活性が強いことがわかり、カボチャのグルタミン酸脱炭酸酵素活性を利用した γ -アミノ酪酸高含有素材の製造法を検討した。

カボチャによるグルタミン酸の γ -アミノ酪酸への変換反応では、グルタミン酸脱炭酸酵素の補酵素であるピリドキサル 5'-リン酸が、 γ -アミノ酪酸生成量に影響していることがわかった。また、 γ -アミノ酪酸生成の最適な温度、pH 等の条件について検討した結果、カボチャとグルタミン酸だけで、10% 以上と高含有量の γ -アミノ酪酸をカボチャに付加することができた。このカボチャ粉砕液の水溶性成分を乾燥したカボチャ加工品には、高血圧自然発症ラット (SHR) に対する血圧上昇抑制効果があることを確認した。

文 献

- 1) Takahashi, H., Sumi, M. and Koshino, F.: *Jpn. J. Physiol.*, **11**, 89 (1961).
- 2) 塚田裕三: 日本医師会雑誌, **42**, 8, 55 (1959).
- 3) 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, 食科工, **47**, 8, 596 (2000).
- 4) 林 智, 齊藤ひろみ, 大森正司, 猪股智夫, 加藤みゆき, 澤井祐典, 深津修一, 袴田勝弘, 家政誌, **51**, 4, 265 (2000).
- 5) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 岡本順子, 農化, **61**, 7, 817 (1987).
- 6) 中川紀代司, 小野田明彦, 食品と開発, **31**, 9, 43 (1996).
- 7) 農林水産省中国農業試験場長, 特許第 2590423 号 (1996).
- 8) Saikusa, T., Horino, T. and Mori, Y., *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1122 (1994).
- 9) 農林水産省食品総合研究所長: 特許第 2891296 号 (1999).
- 10) 宮間浩一・岡本竹己, 栃木県食品工業指導所研究報告, **14**, 10 (2000).
- 11) 松本恭郎, 大野一仁, 平岡芳信, 愛媛県工業技術センター研究報告, No. 35 (1997).
- 12) Matsumoto, T., Yamaura, I. and Funatsu, M., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 5, 889 (1996).
- 13) 実験動物の飼育及び保管等に関する基準, 総理府告示第 6 号, 栄食誌, **54**, 68 (2001).
- 14) Matsumoto, T., Yamaura, I. and Funatsu, M., *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 6, 1413 (1986).

(平成 13 年 11 月 2 日受付, 平成 14 年 6 月 25 日受理)