米糠水抽出物を用いた γ -アミノ酪酸の 生産に関する基礎的検討

高橋 博^{1*}・亀山 智明¹・昌子 智由²・千葉 圭亮³・斎藤 博³・
天野 康誠³・京極 勝夫⁴・奥田 正樹⁴・成田 幹寿⁵

Fundamental Study on Production of γ -Aminobutyric Acid using Rice-bran Extract

Hiroshi TAKAHASHI^{1*}, Tomoaki KAMEYAMA¹, Tomoyoshi SHOJI², Keisuke CHIBA³,
Hiroshi SAITO³, Kousei AMANO³, Katsuo KYOGOKU⁴, Masaki OKUDA⁴ and Kanjyu NARITA⁵

¹Graduate School of Engineering and Science, Akita University, Akita 010-8502, Japan

²Cooperative Research Center, Akita University, Akita 010-8502, Japan

³Amano Corporation, Akita 010-0341, Japan

⁴Yuwa Promotion Agency Co., Ltd., Akita 010-1223, Japan

⁵The Akita Center to Implement Vigorous Enterprises, Akita 010-8572, Japan

Abstract

Production of γ -aminobutyric acid (GABA) was investigated using rice-bran extract for effective utilization of agricultural resources. In the experiments using L-glutamic acid as substrate and rice bran extract as an additive including enzyme, the GABA production reaction stoichiometrically proceeded. The optimum conditions of pH and temperature for GABA production were at pH 5.5 and 30~40°C. The kinetic parameters of rice-bran extract using L-glutamic acid as a substrate were also evaluated by a mathematical model that considered the material balances of L-glutamic acid and GABA, and reaction rate expressed by Michaelis-Menten's equation. The model successfully explained the concentration profiles of experimental data.

Key words: rice bran, γ -aminobutyric acid, glutamic acid, enzyme reaction, rice-bran extract

1. 緒 言

日本人の主食である米は現在年間約 800 万トン程度が国内で生産され、その大部分は精米後白米として消費されている。しかしその一方で精米の過程において年間 80 万トン前後の米糠も生成することから、この米糠を資源として有効に利用することも重要である。このような観点から、米糠は古くから米油等の原料として利用¹されてきたが、その後、ビタミン、ミネラル、タンパク質、フィチン酸などの有用成分²、さらには酵素の存在も徐々に明らかとなり、現在では米胚芽³さらには麦類の糠^{4,5}も

含め様々な観点から有効な利用法が検討されている⁶。

その中で、Saikusa et al.⁷や Ohno et al.⁸は、米粒を糠層近傍から中心近傍まで研磨して得た粉末を水に浸漬して種々のアミノ酸の動的な挙動を追跡する過程で、粉末に含まれる L-グルタミン酸 (Glu) がグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) により γ -アミノ酪酸 (GABA) に転換されることを報告している。また、Ohtsubo et al.⁹も、米胚芽を含む米糠にグルタミン酸を含む水溶液を浸漬すると共にさらに補酵素を加えることで、GABA の生成速度が増加することを報告している。これらの手法は、近年生理調節作用がある事が明らかとなった GABA^{10,11} を簡便な手法により短時間で生産することが可能であることから、新たな米糠の利用法の一つとして有効であると考えられる。しかし、米糠¹²、米胚芽さらには麦ふすま¹³などを用いて GABA を得る研究の多くは、酵素源となる物質を少量用いて主に基本原理の確認を行ったものが多く、物質生産への応用の可能性を図るためには工学的な視点からの検討も必要であると考えられる。しかしながら、工学的視点からの研究例に関しては米油の生

キーワード: 米糠, GABA, グルタミン酸, 酵素反応, 米糠水抽出物

¹ 秋田大学大学院理工学研究科

² 秋田大学産学連携推進機構

³ (株) アマノ

⁴ (株) 雄和振興公社

⁵ 公財 あきた企業活性化センター

2019 年 8 月 23 日受理

*e-mail: jr7mlf@ac5.as.akita-u.ac.jp

産および周辺技術の開発に関する報告以外はほとんど見当たらず¹⁴、基礎的な研究データの蓄積が望まれる。

そこで本研究では、農産資源の一つである米糠の有効利用を目的とした研究の一環として、米糠を用いた GABA の生産の可能性を検討することを目的とし、米糠を用いた場合の GABA の生成反応を追跡し、最適な反応操作、操作条件等に関する基礎的な実験を行うとともに、あわせて物質生産への応用の可能性について検討を行う。

2. 実験方法

2.1 実験試料

実験試料は秋田県内のスーパーマーケット敷地内に設置されている業務用精米機から排出される一般的な米糠であり、使用に際し、篩を用いて平均径 1680 μm , 640 μm , 370 μm の 3 種類に分級し、これらを冷蔵保存して用いた。本実験で基質として使用した L-グルタミン酸はナカライテスク社製の特級試薬を、また、酵素反応の停止あるいは溶液の pH 調整には、同社製の硫酸、水酸化ナトリウムの特級グレードの試薬を用いた。

2.2 実験操作

(1) 酵素源の調製 米糠を用いる酵素反応実験では、米糠をそのまま用いる方法と、米糠を水で抽出して得られる溶液を凍結乾燥して得られる粉末を用いる 2 種類の方法で実験を行った。米糠水抽出液の調製では、所定量の米糠を容器に仕込み、さらに米糠と水の重量比が 1:2 となるように蒸留水を加えて攪拌し、10 分後常温にて抽出液をろ過することで米糠水抽出液を得た。その後、保存性を保つために抽出液を凍結乾燥し、得られた粉末を酵素源として使用した。Table 1 に代表的な酵素源の調製条件と乾燥粉末の収率を示す。

(2) 酵素反応実験 酵素反応実験は、米糠を直接用いる場合には内容積が 500 ml の容器を、また乾燥粉末を用いる場合には内容積が 100 ml の容器の 2 種類の邪魔板無し攪拌槽を用いて回分操作の下で行った。実験にあたり、所定の濃度に調整したグルタミン酸水溶液ならびに米糠あるいは乾燥粉末を仕込み、所定の温度、pH、攪拌速度 400 rpm の下で行った。実験時間中、一定の間隔で米糠を含むスラリーを 1 ml サンプルングし、孔径 0.45 μm

のメンブランフィルターで吸引ろ化後 0.25 kmol/m^3 の硫酸水溶液を 154 μl 添加して酵素反応を停止させ、さらに 10000 rpm の下で 10 分間遠心分離後 0.5 kmol/m^3 の NaOH 水溶液を加えて中和を行い、希釈後アミノ酸分析用の溶液として供した。

(3) 分析方法 アミノ酸の分析は、JASCO 社製高速液体クロマトグラフィー 2020 シリーズを用い、OPA プレカラム誘導体化法によるグラジエント溶離逆相クロマトグラフィーにて分析を行った。カラムは SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ (内径 4.6 mm, カラム長 25 cm) を、また溶離液としては 50 mM 酢酸ナトリウム/メタノール (体積比 10:90) と、水/メタノール溶液 (体積比 10:90) の 2 種類を用いて時間と共に両溶離液の混合比を変えて分析を行った。なお、検出器は JASCO FP2020 plus を用い、励起波長 340 nm, 蛍光波長 450 nm の下で測定を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 米糠の反応特性

Fig. 1 に米糠を用いてグルタミン酸を基質として GABA を生成させた実験の一例として、グルタミン酸の濃度 C_{Glu} を 1.2 mol/m^3 , pH を 5.5, 温度 40°C の下で、粒子径 1680 μm の米糠を粒子濃度 $C_s = 1 \text{ w/v\%}$ 添加して実験を行った場合の、液相中に存在するアミノ酸の代表としてグルタミン酸、GABA、アスパラギン酸、アラニン濃度の経時変化を示す。図より、時間の経過と共に基質であるグルタミン酸の濃度が減少し、これに対応するように GABA の濃度が増加していることが分かる。この結果より、グルタミン酸脱炭酸酵素が関与して進行する次式で表される反応の量論はほぼ 1:1 で進行していることが確認された。

Fig. 1 Time courses of concentrations of glutamic acid, GABA, aspartic acid, and alanine. Conditions: $C_{\text{Glu}} = 1.2 \text{ mol/m}^3$, pH = 5.5, Temp = 40°C.

Table 1 Properties of bran extract

Weight of rice bran [g]	Volume of water [ml]	Weight of freeze drying powder [g]	Yield [wt%]
15	30	2.24	14.9
20	40	3.26	16.3

また、この他にアスパラギン酸やアラニンも若干液中に存在するが、これらのアミノ酸の濃度は反応開始直後に増加するものの、その後濃度はほとんど変化しないことが分かる。したがって、アスパラギン酸、アラニンなどのアミノ酸は元来、米糠中に存在していたアミノ酸が溶液中に浸出したものと推測される。この他、図には示さないが、米糠を 180°C で 3 時間熱処理を行うことで酵素を失活させて同様の実験を行ったが、この場合には GABA の生成反応は進行しなかった。これらの結果より、米糠を用いてグルタミン酸から GABA を生成する反応は、米糠由来のグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) によるものと推測された。

Fig. 2 に、グルタミン酸濃度 1 mol/m^3 、pH 5.5、粒子濃度 $1 \text{ w/v\%}$ の下で、GABA の生成速度に与える反応温度の関係を種々の粒径の米糠を用いて調べた結果を示す。なお、GABA の生成速度は初速度として算出した。図より、いずれの粒径の米糠を用いた場合においても、GABA の生成速度は反応温度が $30^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ の間で最大値を示し、また、粒径の大きな米糠の方が粒径の小さな米糠に比べ反応速度が速いことが分かる。また、 30°C において $1680 \mu\text{m}$ の米糠粒子を用いた実験を基に米糠中の GAD 酵素量を算出すると、約 0.5 U/g-bran 程度であった。なお、 1 U は基質であるグルタミン酸が 1 分間あたり $1 \mu\text{mol}$ 変化する時の酵素量と定義した。

Fig. 3 に、Fig. 2 と同じ条件の下で、GABA の生成速度に与える溶液の pH の影響を調べた結果を示す。図より、いずれの粒径の米糠を用いた場合においても GABA の生成速度は pH が 5.5 付近で最大値を示し、pH 4.5 あるいは pH 6.5 付近では、生成速度は約 1/2 に低下するこ

Fig. 2 Effect of reaction temperature on GABA production rate. Conditions: $C_{\text{Glu}} = 1 \text{ mol/m}^3$, pH = 5.5, $C_s = 1 \text{ w/v\%}$.

Fig. 3 Effect of solution pH on GABA production rate. Conditions: $C_{\text{Glu}} = 1 \text{ mol/m}^3$, Temp. = 40°C , $C_s = 1 \text{ w/v\%}$.

とが分かる。これら Figs. 2, 3 で得られた結果を Saikusa et al.⁷ が米糠中のアミノ酸の動的挙動を追跡したデータと比較すると、最大反応速度を示す温度、pH と本実験で得られた値とほぼ同じ値を示した。一方、乳酸菌由来の GAD の反応特性を調べた Ueno et al.¹⁵ の値と比較すると、乳酸菌由来の GAD の至適温度ならびに至適 pH はそれぞれ 30°C 、4.2 であり、これらは本研究で得られた値よりも低い値を示している。

また、上述の Figs. 1 ~ 3 の実験では、米糠を基質溶液に直接投入して実験を行ったが、酵素量を増やすことを目的として高粒子濃度下で運転を試みる場合には、吸湿性に富む米糠が増加することでスラリー粘度の増加が生じ、攪拌が困難となる状況が予測された。そこで米糠粒子濃度 $20 \text{ w/v\%}$ 程度の条件の下で攪拌を試みたところ、米糠の吸湿性の高さ、低嵩密度 (約 0.3 g/cm^3 程度) が主な原因でスラリー粘度が高くなり、液中に米糠を均一分散させることは困難であった。また、反応時間が長くなると、米糠から液への糠臭などのにおい移りも著しく、このことから糠を直接用いることなく液相の均一系に近い形で反応を行う手法の開発が望まれた。

ところで、一般に均一系に近い形で酵素反応を行うには、液相に基質と酵素源がほぼ溶解した形で存在する必要がある。そこで、はじめに米糠を水で抽出し、抽出液中における酵素の存在を調べた。その結果、粒子濃度 $1 \text{ w/v\%}$ の下で水抽出を行った液相中の総タンパク質濃度の時間変化をローリー法により追跡したところ、タンパク質の濃度は浸出開始と共に $500 \mu\text{g/ml}$ 程度まで増加しその後はほぼ一定の値を示した。次に、新たな水抽出液を調整してさらに 1 mol/m^3 相当のグルタミン酸を添加したところ、時間の経過と共にグルタミン酸の濃度の減少と GABA の濃度の増加が確認され、米糠水抽出物中

にもグルタミン酸脱炭酸酵素の存在が推測された。そこで、先の 2.2 (1) に記された手法で水抽出物の乾燥粉末を得、以降、粉末を用いて GABA 生成反応の追跡を行った。

3.2 乾燥粉末の酵素反応特性

Fig. 4 にグルタミン酸の濃度が 0.8 mol/m^3 、温度 40°C 、pH 5.5 の下で、乾燥粉末を 0.75 g 添加して酵素反応を行った場合のグルタミン酸と GABA の濃度の時間変化を示す。図より、時間の経過と共にグルタミン酸の濃度が減少すると共に、これに対応して GABA が生成し Eq. (1) で表される反応が量論通りに進行していることが分かる。また、本実験では溶液が乳白色を呈しほぼ均一系での操作が可能となった。なお、GABA の生成初速度から算出した酵素濃度は、 $3.8 \times 10^{-2} \text{ U/ml}$ であり、また GABA の初濃度は乾燥粉末中に存在していた GABA の濃度である。ここで、図中の各線は後に示すモデル解析による計算結果を示しているが、実験結果の傾向をほぼ説明づけていることが分かる。

Fig. 5 に溶液の温度を変えその他の条件は Fig. 4 の実験条件と同一として実験を行った場合の、酵素反応速度に及ぼす温度の影響を示す。この場合も先の Fig. 2 における実験結果と同様に温度 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ の間で反応速度は最大値を示すことが分かる。

Fig. 6 に GABA の生成速度に及ぼす溶液の pH の影響を示す。図より pH が 5.5 付近で最大値を示す傾向は Fig. 2 の結果と同様であるものの、pH の影響を受ける範囲が狭くなり、pH に対する感度が上昇する傾向を示した。

Fig. 7 に基質であるグルタミン酸の濃度と GABA の生成速度との関係を示す。図より、グルタミン酸の濃度の増加に伴い GABA の生成速度も徐々に増加する傾向を

Fig. 4 Time courses of concentrations of GABA and L-glutamic acid using rice-bran extract. Conditions: $C_{\text{Glu}} = 0.8 \text{ mol/m}^3$, Temp = 40°C , pH = 5.5, $C_s = 0.75 \text{ w/v\%}$. The lines were calculated by the mathematical model.

Fig. 5 Effect of reaction temperature on GABA production rate using rice-bran extract. Conditions: $C_{\text{Glu}} = 1 \text{ mol/m}^3$, pH = 5.5, $C_s = 0.75 \text{ w/v\%}$.

Fig. 6 Effect of solution pH on GABA production rate. Conditions: $C_{\text{Glu}} = 1 \text{ mol/m}^3$, pH = 5.5, $C_s = 0.75 \text{ w/v\%}$.

Fig. 7 Relationship between GABA production rate and substrate concentration. Conditions: pH = 5.5, Temp = 40°C , $C_s = 0.75 \text{ w/v\%}$. The lines were calculated by the mathematical model.

Table 2 Kinetic parameters used in Eq. (4)

$V_{\max}$ [mol/(m ³ ·min)]	K_m [mol/m ³]
1.74×10^{-1}	5

示した。そこで、ここで得られた結果を基に、Eq. (1) で示される反応が、Michaelis-Menten の式で表されると仮定し、Curve fitting 法により各定数を決定した。

本実験は回分操作で反応を行っていることから、グルタミン酸と GABA に関して反応の量論を考慮に入れて物質収支を考えると、Eqs. (2) ~ (4) を得る。

$$\frac{dC_{\text{Glu}}}{dt} = -r_{\text{Glu}} \quad (2)$$

$$\frac{dC_{\text{GABA}}}{dt} = r_{\text{GABA}} \quad (3)$$

$$-r_{\text{Glu}} = r_{\text{GABA}} = \frac{V_{\max} C_{\text{Glu}}}{K_m + C_{\text{Glu}}} \quad (4)$$

ここで、 C_{Glu} 、 C_{GABA} 、 t はそれぞれグルタミン酸と GABA の濃度 [mol/m³]、反応時間 [min] を表し、またグルタミン酸の減少速度ならびに GABA の生成速度 r_{Glu} 、 r_{GABA} [mol/m³min] は (4) で表される Michaelis-Menten の式で与えられると仮定する。ここで、 $V_{\max}$ は最大反応速度 [mol/m³min]、 K_m は Michaelis 定数 [mol/m³] である。したがって、これら Eqs. (2) ~ (4) を Eq. (5) の初期条件の下で Runge-Kutta-Gill 法により数値積分することで各成分の濃度の変化を計算することができる。

$$\text{at } t = 0, C_{\text{Glu}} = C_{\text{Glu},0}, C_{\text{GABA}} = C_{\text{GABA},0} \quad (5)$$

Table 2 に計算に使用した各パラメーターの値を、また Fig. 4 ならびに Fig. 7 中に解析パラメータを用いてモデルにより計算を行った結果を実線で示す。図より、各計算値は、実験結果の傾向を比較的良好に説明づけていることが分かる。しかし、得られたパラメーターの値に関しては、測定範囲が比較的狭くかつ測定点が少ないこと、ならびに限られたロットの米糠を用いての推算値であることを考慮すると、あくまでも目安的な値として捉えるのが望ましいと考えられる。これらの結果より、本実験系は、天然物由来の物質を扱うため系内で様々な相互作用が生じていると推測されるものの、GABA の生成速度は Michaelis-Menten 型の反応速度式で表現できることが明らかとなった。

3.3 GABA 生産に関する課題の抽出

これまでの結果から、酵素源として米糠を直接用いずに米糠水抽出物を用いることでほぼ均一な系で反応操作

を行うことが可能になり、酵素源の安定性と操作性の向上がある程度達成することができたと考えられる。しかし、本手法で生産される GABA を、今後食品分野への応用を図る場合には、1) 反応溶液の pH 調整を行う手法、2) 糠臭、糠味の除去 の 2 つの課題をクリアする必要があると考えられる。

1) の pH 調整に関しては、食品添加物として認可されている物質を用いて調整する必要がある。そこで基質であるグルタミン酸をグルタミン酸とグルタミン酸ナトリウムの混合物として供給し、これらの緩衝効果により pH をコントロールすることを試みた。図には示さないが、初発の pH を 4.5 程度になるようにグルタミン酸ナトリウムとグルタミン酸を混合して酵素反応を行ったところ、反応の進行に伴い pH が徐々に上昇し、その結果、反応速度の極端な低下を招くことなく GABA が生産されることが確認された。よって、pH のコントロールは基質であるグルタミン酸とグルタミン酸ナトリウムとの混合で得られる緩衝溶液を使用することで対応が可能であることが分かった。

一方 2) の生成物からの糠臭、糠味の除去であるが、これは米糠を利用する上では避けて通れない課題であると考えられる。しかし、近年、著者らはイオン交換法を用いて糠臭、糠味を除去する技術¹⁶の開発に成功した。この手法は、糠味、糠臭の素となる原因物質をイオン交換法とイオン交換樹脂への疎水性吸着により液中から除去する技術であり、今後、この手法を用いることで糠味、糠臭が低減された経口摂取に適する中間製品の開発が可能になり、用途に応じた生産が期待される。

4. 結 論

米糠の有効利用を目的とし、米糠と基質としてグルタミン酸を用いて GABA の生成反応を行うと共に、反応操作における最適な条件の検討を行い、以下の結論を得た。

米糠を用いてグルタミン酸を基質とした GABA の生成反応を追跡したところ、グルタミン酸から GABA の生成反応は量論的に進行した。次に、1680 μm 、640 μm 、370 μm に分級した米糠粒子を用いて GABA の生成反応を追跡した結果、いずれの粒子径においても GABA の生成反応は温度 30 ~ 40°C、pH 5.5 の条件の下で最大値を示し、また、粒子径が大きな粒子ほど GABA 生成速度が高くなる傾向を示した。

均一系での反応操作を目的とし、酵素源として米糠水抽出物を用いて GABA の生成反応に与える反応温度、溶液の pH の影響について調べた。その結果、実験結果は米糠を用いて行った場合の結果の傾向とほぼ一致し、

均一系においても反応は良好に進行することが明らかとなった。また、あわせて GABA の生成反応が Michaelis-Menten の式で表されると仮定して反応速度解析を行ったところ、実験結果の傾向をほぼ良好に表現できることが明らかとなった。

References

1. K. Yamada and N. Tanimura: *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, **25**, 93–96 (1967).
2. M. Kadota: *Journal of the Vitamin Society of Japan*, **79**, 509–511 (2005).
3. S. Ohtsubo, S. Asano, K. Sato, I. Matsumoto: *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 208–211 (2000).
4. T. Iimure, M. Kihara, N. Hirotsu, T. Zhou, K. Hayashi, K. Ito: *Food Research International*, **42**, 139–323 (2009).
5. A. Moongngarm and N. Saetung: *Food Chem.*, **112**, 782–788 (2010).
6. H. Taniguchi, H. Hashimoto, A. Hosoda, T. Kometani, T. Tsuno, S. Adachi: *Nipponshokuhinkagakukougakukaishi*, **59**, 301–318 (2012).
7. T. Saikusa, T. Horino, Y. Mori: *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1122–1125 (1994).
8. T. Ohno and S. Takahashi: *Nipponshokuhinkagakukougakukaishi*, **61**, 552–554 (2014).
9. S. Ohtsubo, S. Asano, K. Sato, I. Matsumoto: Japan Patent Kokai 2000-201651 (2006.07.25).
10. H. Ushio, R. Nagasaka, H. Maehara, S. Kanemoto, K. Mouri, M. Hori: *Bimigijutsukenkyukaishi*, **12**, 21–25 (2008).
11. M. Yoshizawa, M. Inoue, T. Okuda, H. Nakamura: *Memoirs of Osaka Kyouiku University*, **48**, 123–130 (2000).
12. L. Wang, D. Xu, Y. Gao, H. Zhang: *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 1027–1033 (2010).
13. W. Jin, M. Kim, K. Kim: *J. Food Sci.*, **78**, 1376–1382 (2013).
14. H. Takahashi, T. Kameyama, K. Kikuchi: *J. Ion Exch.*, **20**, 64–69 (2009).
15. Y. Ueno, K. Hayakawa, S. Takahashi, K. Oda: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1168–1171 (1997).
16. H. Takahashi and K. Kikuchi: Japan Patent JP4537486, 2010-06-25.