

GABA高産生乳酸菌を用いた植物性飲料の開発

八十川大輔, 中川良二, 能登裕子

Novel GABA producing lactic acid bacterium and its application to functional vinegar fermentation.

Daisuke Yasokawa, Ryoji Nakagawa, Hiroko Noto

γ -Aminobutyric acid (GABA), a nonprotein amino acid, possesses well-known physiological functions such as neurotransmission, induction of hypotension, and diuretic and tranquilizer effects. Recently, GABA has been recognized as a strong secretagogue of insulin from the pancreas, which may prevent symptoms of diabetes. Because of these physiological effects, several functional foods incorporating GABA have been manufactured.

In our laboratory, the GABA-producing lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* was isolated from homemade vegetable pickles. From the isolate, we obtained a high GABA-producing mutant using streptomycin sulfate, by a method known as "ribosome engineering". The mutant strain No.5-2 produced more GABA than its parent strain for in a culture medium supplemented with L-glutamic acid. To utilize this advantageous property of the mutant in the food industry, we produced green tomato vinegar. In this report, we have described some properties of this mutant and the resulting vinegar.

γ -アミノ酪酸 (GABA) は、L-グルタミン酸からグルタメートデカルボキシラーゼ (Glutamate decarboxylase, GAD) による脱炭酸反応で生成する非蛋白性のアミノ酸である。GABA は高血圧症状の緩和に有効であることが知られている。また、最近ではストレスの抑制や寝付きの改善に効果があるという報告もあり、ギャバロン茶、胚芽米以外にも様々な健康食品が開発されるようになってきた。

GAD は様々な植物や微生物に存在することが知られており、当研究室でも天然界から様々な乳酸菌を分離・保存しているが、当研究課題では GAD 活性を有する乳酸菌を探索することとした。更に、当乳酸菌に変異処理を施し GABA 産生能を強化し、GABA 高産生変異株を入手することとした。

トマトは L-グルタミン酸が豊富に含まれる野菜で、

また、同時に GABA も多く含まれている。特に青い時期に摘果される未熟トマトには大量の GABA が含まれることが知られている。そこで、摘果された未熟トマトなどを原料とし、本 GABA 高産生変異株を用いて GABA を更に増強した健康酢を開発することとした。

1. 実験方法

(1) 使用菌株の分離

BCP 加プレートカウントアガール (日水製薬) および 1% 炭酸カルシウム加 MRS 寒天培地を乳酸菌の分離・選択培地として用いた。BCP 加プレートカウントアガールの場合は培地の黄変で、1% 炭酸カルシウム加 MRS 寒天培地ではハロー形成で選択した。菌の分離は道内で市販されている野菜発酵食品の他、野菜や果物からも試みた。更に、野菜の浅漬けを調製し、その中からも分離を試みた。

事業名：一般試験研究

課題名：野菜・果実発酵飲料用有用微生物の探索・育種
新規乳酸菌を利用した植物性発酵食品の開発

長島ら¹⁾の方法に準じて16SrRNA遺伝子の塩基配列を解読し、インターネットでNCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベースと照合 (Nucleotide-nucleotide BLAST) することにより菌株の同定を行った。

生理・生化学的性状は、主にAPI CHキット (bioMérieux社) を用いて分析した。

(2) GABA産生株のスクリーニング

MRS培地 (Difco Lactobacilli MRS Broth®, BD) にグルタミン酸ナトリウムを50mM以上となるように添加した培地に供試菌株を接種し、35℃で72時間培養し、上清を薄層クロマトグラフィー (HPTLC plates 10X10 cm Cellulose, MERCK) に展開した。展開溶媒はn-ブタノール：アセトン：酢酸：水の35：35：7：23を用いた。発色はニンヒドリン試薬で行った。

(3) GABA高産生変異株の分離・育種

GABA高産生突然変異株の分離はストレプトマイシン耐性変異株選抜法²⁾で行った。

(4) GABAの測定

培養上清中のGABAの定量分析はアミノ酸分析装置 (Amino Acid Analyzer L-8800, HITACHI) を用いた。

(5) トマト酢の試作

トマト酢の試作にあたり、酵母は清酒用協会701号を用いた。酢酸菌は *Acetobacter pasteurianus* IFO14814株を用いた。

(6) 乳酸、エタノール、および酢酸の測定

乳酸濃度および酢酸濃度は、それぞれF-キット (D-乳酸/L-乳酸 J.K. インターナショナル) およびF-キット酢酸で測定した。エタノール濃度はガスクロマトグラフィーで測定した。

2. 実験結果および考察

(1) GABA産生乳酸菌の分離

札幌市および江別市内で購入した野菜 (ナス、キュウリ、トウモロコシ、インゲン、ウリ、大根葉など) および果物 (ブドウ、ブルーベリーなど)、さらに自作の糠床に上記野菜を漬けた浅漬けなどからBCP加寒天培地で培地の黄変を示すコロニーおよび1%炭酸カルシウム加MRS寒天培地にてハロー形成を示すコロニーを分離した。Single Colony Isolationを行い、16SrRNA遺伝子の塩基配列を解読して *Lactobacillus casei*, *Lb. parakefiri*, *Leuconostoc citreum*, *Leuc. mesenteroides*, *Weissella paramesenteroides*, *Lb. fructivorans*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*, *Lactococcus lactis*, *Lc. garvieae*, *Pediococcus pentosaceus*, *W. kimchii*, *Leuc. garlicum*, *Lb.*

plantarum, *L. buchneri* の15種79株を分離・同定した。

発酵形式がヘテロ型の乳酸菌は植物性飲料を調製する際に風味に問題が発生する可能性が高いことから、これらを除外し、ホモ型の発酵形式を示す *Lb. casei*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*, *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *P. pentosaceus*, *Lb. plantarum* に属する45株についてGABA産生能を検討した。グルタミン酸を添加したMRS培地中で35℃、72時間培養後のそれぞれの培養上清を薄層クロマトグラフィーにかけた結果、*Lc. lactis* の2株の培養上清から、GABA標準品とほぼ同じ位置にニンヒドリン発色成分を検出した。

(2) GABA高産生変異株の分離

越智ら²⁾はストレプトマイシン耐性株中に二次代謝産物生産能力を亢進させた変異株が高頻度に存在することを報告している。そこで、分離されたGABA産生 *Lc. lactis* の2株についてストレプトマイシン耐性能を検討したところ、250μg/mlまで増殖可能であった。このため、その2倍濃度の500μg/mlとなるようにストレプトマイシンを添加したMRS寒天培地でコロニー形成した26株について、グルタミン酸添加MRS培地で培養し、培養上清を薄層クロマトグラフィーにかけた。その結果、GABA標準品とほぼ同じ位置のニンヒドリン発色スポットが親株より大きくなっている菌株10株を分離した。このことは、単純にストレプトマイシン耐性変異株を取得することにより、非常に高頻度 (38.5%) で二次代謝産物高産生型変異株が取得できることを示している。

当該変異株10株と親株を、グルタミン酸を100mM以上となるように添加したMRS培地で培養した。その培養上清をアミノ酸分析装置にかけGABAの定量を行ったところ、親株のグルタミン酸からGABAへの脱炭酸効率は約15%であったが、変異株は最大46.4%であった。(表1)。

培地中にGABAを最も多く蓄積する株を5-2株と命名し、その増殖とGABA生産を経時的に測定した。その

表1. 独自に分離したGABA産生野生株 *Lc. lactis* とそのGABA高産生型変異株 *Lc. lactis* 5-2株によるGABA産生

	親株		高産生変異株	
	mM	mg/ml	mM	mg/ml
グルタミン酸	90.9	13.4	58.5	8.6
GABA	16.4	1.7	50.7	5.2

培養条件：グルタミン酸が100mM以上となるように添加したMRS培地で35℃、4日間培養した。

結果、GABAの生産は増殖定常期以降に最大化していた(図2)。このことは越智ら³⁾の報告と一致し、ストレプトマイシンによりリボゾームS12サブユニットに変異が起きた株が選抜され、定常期における翻訳の活性化(酵素生産の活性化)、即ちGADの蓄積が起きているものと推定された。

(3) 青トマト酢の試作

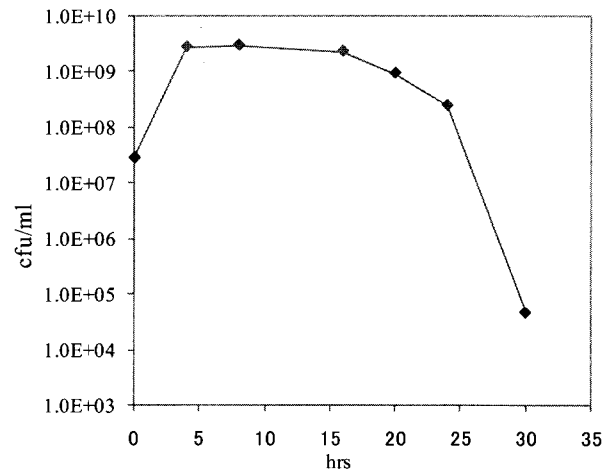
予備試験において、*Lc. lactis* 5-2株を摘果トマト果汁で培養したが、良好な増殖およびGABAの産生は認められなかった。また、摘果トマト果汁100%でアルコール発酵を行ったところ、生成されたエタノール濃度は2.53%と低く、この方法は酢製造には不適であった。そこで、予め通常ビール製造で使用する2倍濃度の麦汁を調製し、これに*Lc. lactis* 5-2株を接種し、GABAを生成させ、これに摘果トマト果汁を1:1(V:V)となるように混合してトマト酢を試作することとした。

まず、粉碎麦芽300gを700mlの温水(70℃)と混合し、70℃、1hr保温後、遠心分離により上澄みを回収し、麦芽抽出液を調製した。麦芽抽出液をオートクレーブで121℃、15分加熱(高濃度麦汁)、熱いうちにろ過して乳酸発酵に用いた。青トマト果汁は2重のガーゼでろ過した破碎搾液を85℃、30分間加熱殺菌して用いた。

GABA高産生変異株*Lc. lactis* 5-2株による麦汁の乳酸発酵は30℃で6日間、*Saccharomyces cerevisiae* 清酒用協会701号株によるエタノール発酵は30℃で5日間、*Acetobacter pasteurianus* IFO14814株による酢酸発酵は30℃、8日間、いずれも振盪培養で行った。6日間の乳酸発酵の後、等量の青トマト果汁を無菌的に混合し酵母を接種した。酵母によるエタノール発酵が終了した試料は無菌的に遠心して菌体等の沈殿物を除去し、70℃で加熱殺菌して放冷後、酢酸発酵に供した。

試験中の乳酸量の変化は図3(A)、エタノール量の増減は図3(B)、酢酸生成の様子は図3(C)、GABA濃度の変化は図3(D)に示した。乳酸量は、乳酸発酵終了後青トマト果汁で半分希釈されたため、不連続なグラフとなっている(図3(A))。エタノール量は酵母発酵中に6.5%まで増加し、酢酸発酵に伴い酢酸菌により消費された(図3(B))。GABA濃度は、*Lc. lactis* 5-2株を用いた発酵により0.14 mg/mlにまで増加し、GABAを大量に含んだ食材である青トマト果汁と共にアルコール発酵、酢酸発酵を経て0.83 mg/mlとなった(図3(D))。これは20 mlの摂取により高血圧抑制効果を得るのに十分な量であり⁴⁾、健康酢としての効果が期待できる濃度であった。

(A)



(B)

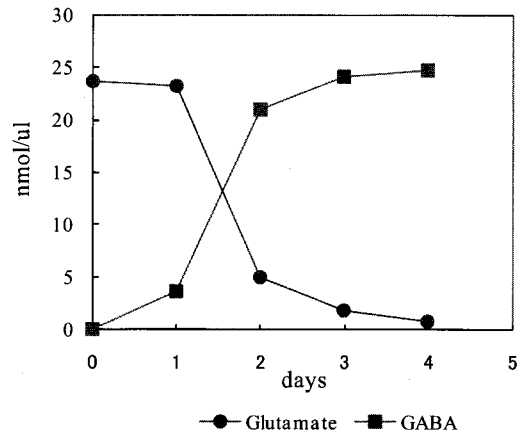


図1. *Lc. lactis* 5-2株の増殖とGABA生成量/グルタミン酸消費量の経時変化

グルタミン酸を20mM以上となるように添加したMRS培地に*Lc. lactis* 5-2株を接種、35℃で培養した。パネルAは増殖曲線、パネルBはその間の上清に含まれるGABA濃度およびグルタミン酸濃度を表す。

摘果青トマト果汁100%の原料や乳酸発酵後の100%麦汁では、それぞれ生成された酢酸濃度、GABA濃度は機能性酢としては十分な濃度ではなかったが、本研究で行った混合液を原料とする方法により商品と成りうるGABA濃度に高めることができた。

3. 要約

当センターで独自にGABA産生乳酸菌を分離し、その菌株からGABA高産生型変異株を育種した。当変異株*Lc. lactis* 5-2株を用いた青トマト酢の試作を通して、GABA濃度が充分高い酢を作る方法を見いだした。

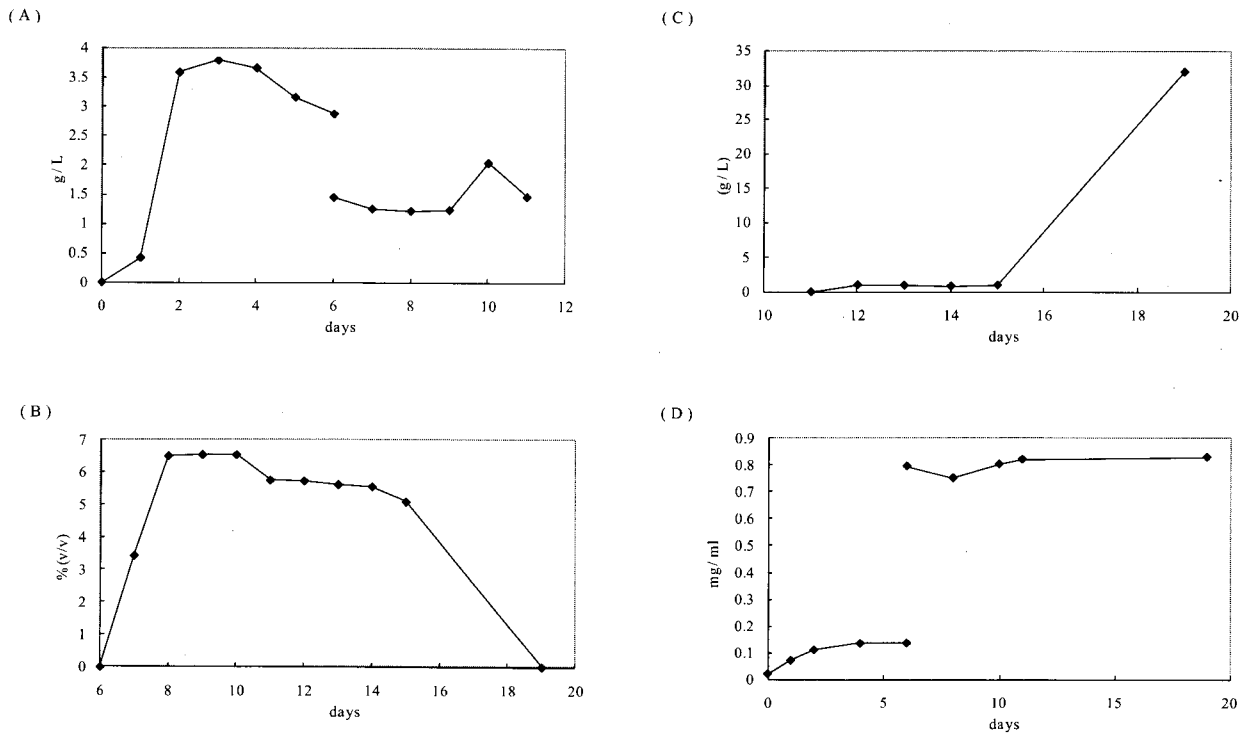


図2. *Lc. lactis* 5-2株を用いた青トマト酢試作時の各成分の濃度変化

パネル A は乳酸濃度, パネル B はエタノール濃度, パネル C は酢酸濃度, パネル D は GABA 濃度の経時変化を表す.

文 献

- 1) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸. 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフロー解析への応用 日本食品科学工学会誌, **45**, 58-65 (1998)
- 2) 越智幸三, 川本伸一, 岡本仁子. リボゾーム工学の構築とその応用 化学と生物, **37**, 731-737 (1999).
- 3) 越智幸三, 岡本晋. 「リボゾーム工学」による放線菌利用の新展開 日本農芸化学会誌, **78**, 1082-1085 (2004)
- 4) 梶本修身, 平田洋, 中川聡史, 梶本佳孝, 早川和仁, 木村雅行. GABA 含有発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).