

乳酸菌を用いた味噌における γ -アミノ酪酸の生成

岸本 憲明*・上武 誠**・藤田 藤樹夫*

*近畿大学大学院農学研究科応用生命化学専攻

**近畿大学農学部応用生命化学科

Production of γ -aminobutyric acid in Miso using a lactic acid bacterium

Noriaki KISHIMOTO*, Makoto KAMITAKE**, Tokio FUJITA*

* Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Kinki University

3327-204 Nakamachi Nara 631-8505, Japan

** Department of Applied Biological Chemistry, School of Agriculture, Kinki University

3327-204 Nakamachi Nara 631-8505, Japan

Synopsis

No salt-tolerant lactic acid bacteria which were capable of transforming L-glutamic acid to γ -aminobutyric acid were isolated from *Tetragenococcus halophilus*, the lactic acid bacteria isolated from Miso, and from the lactic acid consortia from Shoyu. A salt-nontolerant lactic acid bacterium *Lactobacillus brevis* NBRC 120005 was able to transform L-glutamic acid to γ -aminobutyric acid in a solution without NaCl, but no growth and no transformation were shown in a medium containing over 5.5% NaCl. However, the resting cells precultured in a medium supplemented by sodium glutamate were able to produce γ -aminobutyric acid from L-glutamic acid in a solution containing 12% NaCl. A lyophilized cell suspended solution (0.5 g/ml) was added to 8 g of commercial Miso supplemented by 80 mg of sodium glutamate and incubated at 28°C for 7 days and resulted in producing 6.9 mg of γ -aminobutyric acid per g of Miso.

緒言

γ -アミノ酪酸 (GABA) は、天然に広く存在する非タンパク性のアミノ酸で、ヒトなど哺乳動物の小脳などに存在して、抑制性神経伝達物質として機能している¹⁾。具体的には、血圧降下作用や精神安定効果などが注目されており、高血圧症や脳血流の改善による不眠や鬱などの予防、さらに腎機能改善効果が期待されている。一般にGABAは1日に20 mg以上摂取すると効果があると言われてしている²⁾。

茶 (*Camellia sinensis*) 葉を嫌気処理して作成したギャバロン茶³⁾には、通常のお茶の約30倍のGABAが含まれており、また玄米を水に浸漬して胚を発芽させると、GABA濃度が上昇することが報告されている^{4,5)}。最近ではGABA濃度を高めた乳酸菌発酵飲料が特定保健用食品として

認可され、注目を集めている⁶⁾。

著者らは、L-グルタミン酸脱炭酸酵素がL-グルタミン酸に働くとGABAが生成することから、グルタミン酸脱炭酸酵素活性の高い微生物とL-グルタミン酸を発酵食品に添加してインキュベートすれば、発酵食品中にGABAが生成、蓄積する考えた。

乳酸菌は古来より発酵食品や飲料の製造に関与し、乳酸発酵をおこなって食品に保存性と風味を付与してきた。乳酸菌の中からグルタミン酸脱炭酸酵素活性の高い株が単離されている。たとえば、ヨーグルトやキムチの製造に関わる非耐塩性乳酸菌 *Lactobacillus hilgardii*⁷⁾、*Streptococcus thermophilus* と *Lactobacillus delbrueckii*⁸⁾、*Lactobacillus brevis*⁹⁾ から高い酵素活性が検出されている。しかし、味噌や醤油など高濃度の食塩を含む発酵食品の製造に関与している耐塩性乳酸

菌 *Tetragenococcus halophilus* から、グルタミン酸脱炭酸酵素活性の高い株は報告されていない。

そこで本研究では、多くの市販味噌中の食塩濃度、12% (w/v) NaCl 存在下でも生育できる乳酸菌を耐塩性乳酸菌と定義し、味噌製造に使用されている *T. halophilus* と市販および自家製味噌から単離した耐塩性乳酸菌、醤油醸造用乳酸菌群を対象に、L-グルタミン酸を GABA に変換できる株をスクリーニングした。しかし、供試株の中から活性の高い株を見いだすことができなかった。

一方、高いグルタミン酸脱炭酸酵素活性をもつと報告されている非耐塩性乳酸菌 *L. brevis*⁹⁾ の休止菌体を 12% (w/v) NaCl を含む L-グルタミン酸 Na (L-Glu Na) 溶液中でインキュベートすると、GABA が生成されることを見いだした。そこで、L-Glu Na 添加培地で前培養した *L. brevis* 凍結乾燥菌懸濁液 (0.5 g/ml) と L-Glu Na (80 mg) を市販味噌 8 g に添加して7日間インキュベートしたところ、味噌 1 g あたり 6.9 mg の GABA が生産されたので、それらの結果を報告する。

材料および方法

供試株および供試試料

味噌醸造用耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* No.3 と *Lactobacillus brevis* NBRC 120005 は、長野県味噌工業協同組合連合会と National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (独立法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門, 千葉県) から分譲を受けた。また、醤油醸造用乳酸菌群は株式会社ビオック (豊橋市) から購入した。保存料 (アルコール) 無添加の市販味噌 6 点と自家製味噌 5 点から耐塩性乳酸菌を分離した。供試味噌の食塩濃度は 11 ~ 14% (w/v) であった。

供試培地

供試株の培養には *T. halophilus* No.3 の培養に用いられている PH 培地、乳酸菌の培養に使用される MRS 培地と大豆抽出液添加 MRS 培地を使用した (Table 1 ~ 3)。Polypepton は日本製薬 (株) (東京)、Yeast extract と MRS Broth は Becton, Dickinson and Company (USA) から購入した。

味噌抽出液平板培地を用いて味噌から耐塩性

乳酸菌を分離した。分離源の味噌 120 g に蒸留水を 180 ml 添加し均一に懸濁後、遠心分離で得た上清に NaCl を 12% (w/v) となるように添加した。この味噌抽出液 100 ml と 3% (w/v) 寒天溶液 100 ml を別々に高圧滅菌した後、混合しシャーレに分注して、味噌抽出液平板培地を作成した。培地中の食塩濃度は、食塩濃度測定用屈折計 S-28E (株式会社相互理化学硝子製作所、京都) を用いて測定した。

Table 1. Composition of PH medium

NaCl	120g
Glucose	10g
Polypepton	10g
K ₂ HPO ₄	5g
Yeast extract	5g
Dist. Water	1000ml
pH	7.0

Table 2. Composition of MRS medium

Distilled water	100ml
L-cystein	0.01g
MRS Broth	5.5g

Table 3. Composition of MRS medium supplemented by soy extracts

MRS Broth	5.5g
L-cystein	0.01g
Soy extracted solution*	100ml

*Preparation of soy extracted solution; Four hundred g of soy beans were incubated in 1600 ml of water at room temperature for 18 h, and then heated at 105°C for 60 min. The supernatant of filtrate was used as soy extracted solution.

供試味噌から耐塩性乳酸菌の単離

供試味噌 1 g を滅菌 6% (w/v) NaCl 溶液で 10 倍段階希釈した。希釈液を味噌抽出液平板培地に塗抹し、脱酸素剤 (三菱ガス化学 (株)) を入れた嫌気パックに平板を入れて 28°C で 6 日間培養した。得られたコロニーの中から独立したコロニーを味噌抽出液培地に移植し、28°C で 3 日間培養後、無菌的に遠心分離して集めた菌を -80°C で凍結保存した。

L-グルタミン酸を GABA に変換できる乳酸菌の探索

1% (w/v) グルタミン酸ナトリウムを添加した PH 培地、MRS 培地、大豆抽出液添加 MRS 培

地 10 ml に、 1.6×10^9 cfu/ml に調整した乳酸菌懸濁液を 100 μ l 接種し、スクリーコック付き試験管で、28°C で 6 日間静置培養した。2 日ごとに培養液をサンプリングし濁度を測定後、遠心分離 (12000 rpm, 10 min) した上清の pH とグルタミン酸濃度を測定した。グルタミン酸は F-キット L-グルタミン酸 (J.K. インターナショナル、東京) を用いて定量した。また、培養液上清を蒸留水で 100 倍希釈し、フィルター濾過したものをアミノ酸分析装置 (日立-8500、東京) で GABA と L-グルタミン酸を定量した。

L. brevis NBRC 12005 の耐塩性

1% (w/v) L-Glu Na と 0 ~ 6% (w/v) NaCl を含む大豆抽出液添加 MRS 培地 100 ml に *L. brevis* 懸濁液 (1.6×10^9 cfu/ml) を 1 ml 接種し、28°C で 6 日間静置培養した。2 日毎に培養液の濁度と上清の pH、L-グルタミン酸濃度を測定した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた L-グルタミン酸と GABA の検出

アルミシートセルロース F プレート (MERCK, Germany) に、標準品と 100 倍希釈試料をスポットし、2-Propanol : dist. Water : Acetic acid / 50:45:5 (v/v/v) で展開した。ニンヒドリン溶液を噴霧後、加熱して青紫色スポットを発色させた。

L. brevis NBRC 12005 による L-グルタミン酸から GABA への変換

1% (w/v) L-Glu Na を含む大豆抽出液添加 MRS 培地 100 ml に 1.6×10^7 cfu/ml となるように *L. brevis* を接種し、28°C で 6 日間静置培養した。培養液の pH が 5.0 以下に低下した後、再び 5.8 ~ 6.3 まで上昇してきた培養液を遠心分離 (8000 rpm, 10 min) して菌体を回収した。0, 6, 12% (w/v) NaCl を含む大豆抽出液添加 MRS 培地 100 ml に、前培養した菌懸濁液 (1.6×10^{10} cfu/ml に調整) を 1ml 接種し、3 日間静置培養した。経時的にサンプリングした培養液の濁度と L-グルタミン酸、GABA 濃度を TLC とアミノ酸分析計で測定した。

L. brevis NBRC 12005 の凍結乾燥菌体の調製

1% (w/v) L-Glu Na を含む大豆抽出液添加

MRS 培地 100 ml に *L. brevis* を 1.6×10^7 cfu/ml となるように接種し、28°C で 6 日間静置培養した。 1.6×10^{10} cfu/ml に調整した菌懸濁液 10 ml に凍結保護剤としてトレハロースと牛血清アルブミンをそれぞれ 0.2 g と 0.01 g 加え、凍結乾燥 (Asahi Techno Glass, 東京) した。コントロールとして、凍結保護剤無添加で凍結乾燥した菌体も調製した。

凍結乾燥菌体を用いた市販味噌における L-グルタミン酸から GABA への変換

5% (w/v) L-Glu Na を含む大豆抽出液添加 MRS 培地 1 ml に凍結乾燥菌体を 0.5 g 懸濁し、これを市販味噌 8 g に添加して 28°C で 7 日間保った。経時的に採取した味噌 0.3 g を滅菌蒸留水 10 ml に懸濁し、上清の 100 倍希釈液を TLC とアミノ酸分析した。

結果および考察

供試味噌から耐塩性乳酸菌の単離と L-グルタミン酸から GABA への変換能力が高い耐塩性乳酸菌の探索

供試味噌 11 点から 50 株の耐塩性乳酸菌を分離した。分離株 50 株と *T. halophilus* No.3、醤油醸造用乳酸菌群は、PH 培地や 12% (w/v) NaCl 添加 MRS 培地、12% (w/v) NaCl を含む大豆抽出液添加 MRS 培地に生育したが、非耐塩性乳酸菌 *L. brevis* NBRC 12005 は、これらの培地に生育できなかった。醤油醸造用乳酸菌群から特徴の異なる複数種のコロニーが出現したが、本実験では単離せずに群集として取り扱った。

分離株 50 株と *T. halophilus* No.3、醤油醸造用乳酸菌群は、1% (w/v) Glu-Na 添加 PH 培地、12% (w/v) NaCl と 1% (w/v) Glu-Na を添加した MRS 培地と大豆抽出液添加 MRS 培地いずれにもよく生育し、培養 7 日目で OD₆₆₀ が 0.8 ~ 1.0、培養液の pH は 4.5 ~ 5.0 まで低下した。しかし、いずれの培養液からも GABA のスポットを検出することができなかった。また、培養液中の L-グルタミン酸濃度も減少していなかった。これらの結果から、*T. halophilus* や味噌から分離した耐塩性乳酸菌、醤油醸造用乳酸菌群は、L-グルタミン酸を GABA へ変換する酵素を生産していないか、極めて弱い活性しか有していないと

考えられる。

Guido ら¹⁰⁾ は大腸菌が生産する L-グルタミン酸脱炭酸酵素の局在部位を調べ、酵素は細胞質内に局在することと、本酵素は細胞質を中性域に維持する機能を有すると述べている。また、石川と小幡¹¹⁾ は精製した L-グルタミン酸脱炭酸酵素活性が、高濃度の NaCl, NaNO₃, KCl, CaCl₂, CuSO₄ で阻害されたと報告している。たとえば、5% NaCl 存在下で 90 分間酵素反応させると、CO₂ 発生量が NaCl 無添加の 80% に低下したと記載している。これらの情報から、L-グルタミン酸脱炭酸酵素は菌体内酵素で、菌体外に単離すると 5% (w/v) 以上の NaCl で活性が阻害されると考えられる。

一方、非耐塩性乳酸菌の一部が L-グルタミン酸を GABA に変換できることは、すでに明らかにされている。早川ら⁸⁾ はヨーグルトから分離した *Streptococcus thermophilus* Y-1 と *Lactobacillus delbrueckii* Y-2 を混合培養すると、L-グルタミン酸から GABA が生産されたと述べている。また、Oh and Park⁹⁾ はキムチから分離した *L. brevis* OPK-3 を用いて GABA を高生産 (84,292 mg/L/h) する条件を確立するとともに、*L. brevis* OPK-3 の glutamate decarboxylase 遺伝子をクローニングしている。さらに塚本ら¹²⁾ は、L-Glu Na を添加した米糠に *L. brevis* IFO 120005 を 20℃ 以下の低温で 7 日間培養すると、100 mg/g 以上の GABA が生産されることを明らかにしている。

そこで、非耐塩性乳酸菌 *L. brevis* IFO 120005 を用いて glutamate decarboxylase 活性の高い休止菌体が、高濃度食塩存在下でも L-グルタミン酸を GABA に変換できるか検討した。

L. brevis NBRC 120005 の耐塩性と NaCl 添加培地における L-グルタミン酸から GABA への変換

L. brevis NBRC 120005 を 0 ~ 5.0% (w/v) NaCl を含む大豆抽出液添加 MRS 培地で培養すると、培養液の pH は低下し、培養 2 ~ 4 日目 pH 4.5 ~ 5.0 に達した。そしてその後、pH は上昇した。一方、NaCl を 5.5% (w/v) 以上添加した培地では、pH は 5.0 付近に低下したままで上昇しなかった (Fig. 1)。培養初期に培養液の pH が低下したのは、乳酸発酵によって乳酸が生成したため、培養後期に培養液の pH が上昇したの

は、L-グルタミン酸が glutamate decarboxylase で脱炭酸されて GABA に変換され、酸として働くカルボキシル基が 1 個減ったためと考えられる。

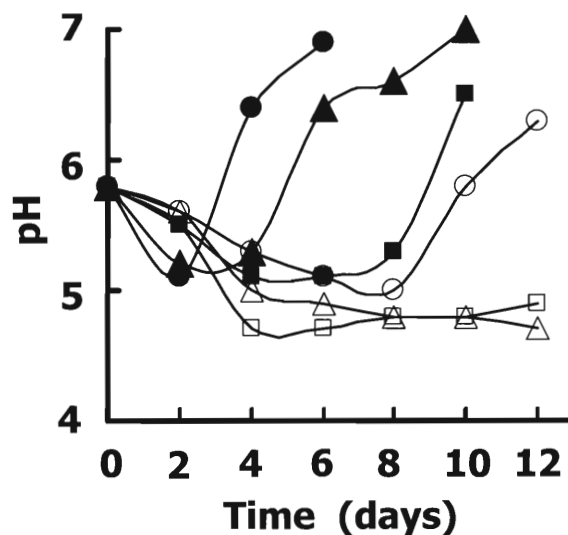


Fig. 1. pH of MRS culture solution containing soy extracts and 2.0 to 6.0% NaCl incubated with *L. brevis* NBRC 120005.

●; 2.0% NaCl, ▲; 3.0% NaCl, ■; 4.0% NaCl, ○; 5.0% NaCl, △; 5.5% NaCl, □; 6.0% NaCl

NaCl を 6.0% (w/v) 添加すると、NBRC 120005 はほとんど増殖しなかったことから、この株の耐塩性は 4.0% (w/v) と考えた (Fig. 2)。1% (w/v) L-Glu Na を含む大豆抽出液添加 MRS 培地に 4% (w/v) 以下の NaCl を添加して培養すると、培養液中の L-グルタミン酸は減少したが、5.5% (w/v) 以上添加すると減少しなかった (Fig. 3)。そして、2.0% (w/v) NaCl 添加培地では 8 日目で L-グルタミンのピークが検出できなくなり、220 μmol/ml (6 日培養) の GABA が、また 4.0% (w/v) NaCl 添加培養液からは 200 μmol/ml (10 日培養) の GABA が検出された。それぞれ L-Glu Na に対する GABA のモル変換率は 75% と 68% であった (Fig. 3)。

NBRC 120005 の生育は、6% (w/v) NaCl 存在下で阻害された。市販味噌には 11 ~ 14% (w/v) NaCl が含まれているので、NBRC120005 が市販味噌で増殖することは難しい。しかし、細胞膜が NaCl の透過を防ぐ障壁として機能し、高濃度食塩存在下でも細胞内の食塩を低濃度に維持できれば、菌体内酵素 L-グルタミン酸脱炭酸酵素の

活性低下は防ぐことができると予測した。そこで、NBRC 120005 休止菌体を用いて 12% (w/v) NaCl を含む大豆抽出液添加 MRS 培地で L-グルタミン酸から GABA への変換を検討した。

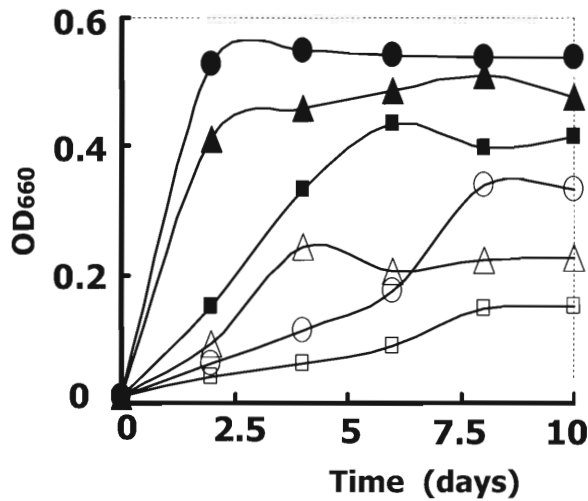


Fig. 2. Turbidity at 660 nm of MRS culture solution containing soy extracts and 2.0 to 6.0% NaCl incubated with *L. brevis* NBRC 120005. ●; 2.0% NaCl, ▲; 3.0% NaCl, ■; 4.0% NaCl, ○; 5.0% NaCl, △; 5.5% NaCl, □; 6.0% NaCl

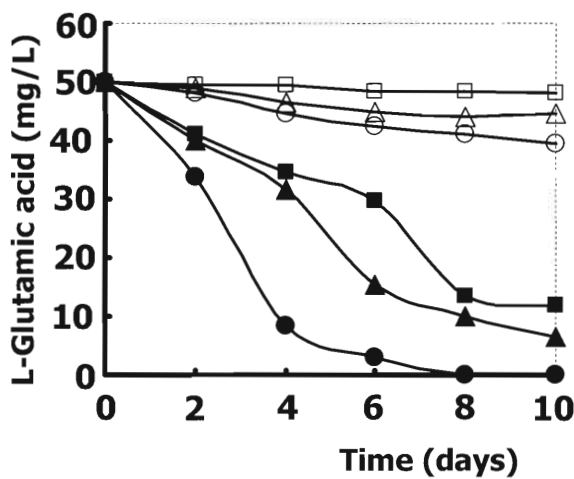


Fig. 3. L-Glutamic acid concentration of MRS culture solution containing soy extracts and 2.0 to 6.0% NaCl incubated with *L. brevis* NBRC 120005. ●; 2.0% NaCl, ▲; 3.0% NaCl, ■; 4.0% NaCl, ○; 5.0% NaCl, △; 5.5% NaCl, □; 6.0% NaCl

1% (w/v) L-Glu Na を含む大豆抽出液添加 MRS 培地で前培養した NBRC 120005 を、1%

(w/v) L-Glu Na と 12% (w/v) NaCl を含む大豆抽出液添加 MRS 培地に加え 28°C で静置した。培養液を経時的にサンプリングして TLC 分析したところ、12 時間から L-グルタミン酸スポットが薄くなり、GABA スポットが出現してきた (Fig. 4)。72 時間インキュベート後の GABA 濃度は 210 $\mu\text{mol/ml}$ で L-グルタミン酸に対するモル変換率は 71% であった。

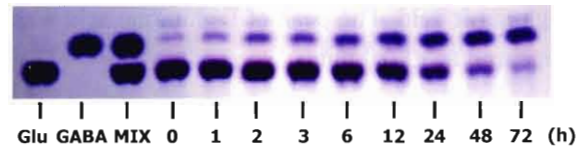


Fig. 4. TLC analysis of L-glutamic acid and GABA in the solution containing 12% NaCl and 1% L-glutamic acid incubated with *L. brevis* NBRC 120005. Glu; L-glutamic acid, GABA; γ -aminobutyric acid, Mix; L-glutamic acid and GABA, mobile phase; 2-propanol : dist.H₂O : acetic acid/50:45:5 (v/v/v).

L-Glu Na 添加培地で前培養した NBRC 120005 休止菌体は、12% (w/v) NaCl 存在下でも L-グルタミン酸を GABA に高変換することができた。この結果は、12% (w/v) 前後の食塩を含む市販味噌に NBRC120005 の休止菌体と L-Glu Na を添加すると、味噌に GABA が生成、蓄積されることを示唆している。

L. brevis NBRC 120005 凍結乾燥菌体と L-Glu Na を添加した市販味噌における GABA の生成

1% (w/v) L-Glu Na 添加培地で前培養した NBRC 120005 株の凍結乾燥菌体 0.5 g を 5% (w/v) L-Glu Na を含む大豆抽出液添加 MRS 培地 1 ml に懸濁した。この懸濁液を市販味噌 8 g に添加し 28°C で 7 日間保ったところ、味噌 1 g から 17 ~ 22 μmol の GABA が検出された (L-グルタミン酸に対するモル変換率は 46 ~ 60%) (Fig. 5, 6)。また、凍結保護剤無添加よりも添加した方が、保護剤の種類も牛血清アルブミンよりトレハロースに懸濁した凍結乾燥菌体が、高い変換率を示した。

味噌には麹カビの分泌するタンパク質分解酵素によって、大豆タンパク質が分解され、遊離アミ

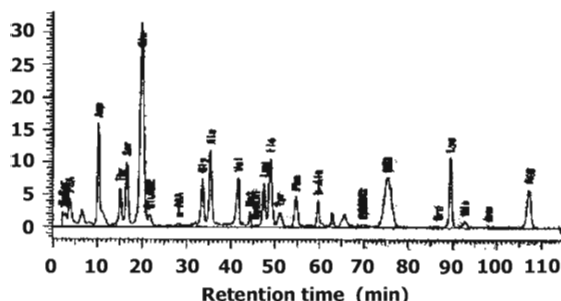


Fig. 5. Amino acid analysis of Miso containing L-glutamic acid. The peak of L-glutamic acid was appeared at r.t. 20 min.

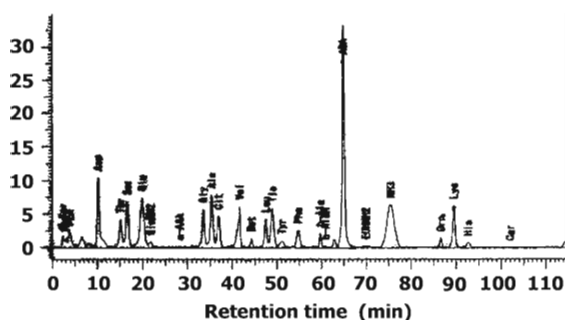


Fig. 6. Amino acid analysis of Miso containing *L. brevis* NBRC 120005 and L-glutamic acid. The peak of GABA was appeared at r.t. 65 min.

ノ酸とくにL-グルタミン酸が多く含まれていると期待した。そこで、味噌抽出液をアミノ酸分析したが、L-グルタミン酸の高いピークを検出することができなかった。綾部ら¹³⁾は、味噌麹よりも醤油麹で醸造した味噌の方が、グルタミン酸量が多かったと報告している。使用する麹カビの種類によって生産されるタンパク分解酵素の特性が異なり、これが製品中のグルタミン酸を決める大きな要因の一つと考えられる。したがって、味噌にGABAを生成、蓄積させるためには、GABAへの変換能力の高い乳酸菌とともにL-Glu Naも一緒に添加する必要がある。

凍結乾燥菌体の菌懸濁液ではなく、粉末を市販味噌に添加したところ、GABAの生成量は1/10以下に低下した。これは味噌の水分量が少なく、L-Glu Naと凍結乾燥菌体が味噌中で均一に混合できなかったことが原因と考えている。そこで、味噌8gに加える液量を検討したところ、1mlでGABAへの変換、蓄積が安定して認められ、それ以上添加しても変換率は大きく増加しなかった。一方、菌懸濁液を1ml加えた味噌は、すこ

し柔らかくなったものの、市販味噌の性状と大きな違いは認められなかった。

GABAは、ヒトなど哺乳動物の小脳に存在して、抑制性神経伝達物質として機能することから、GABAを含む食品が多く開発されている。たとえば、L-グルタミン酸からGABAへの変換能の高い非耐塩性乳酸菌を用いて、GABA濃度の高いキムチや発酵乳飲料などが市販されている。

一方、市販味噌には、食塩が11～14% (w/v)含まれていて、日本人が一日に飲むみそ汁から摂取する食塩量は1.9～2.6gと報告されている¹⁴⁾。高血圧を予防する観点から減塩が勧められているが、GABAには血圧を下げる効果もあることから、高濃度の塩分を含む味噌や醤油などの発酵食品にGABAが含まれていると、高血圧の予防に効果があると期待される。

謝 辞

Tetragenococcus halophilus No.3を供与いただきました長野県味噌工業協同組合連合会とアミノ酸分析計で試料中のL-グルタミン酸とGABAを定量していただきました近畿大学農学部水産学科安藤正史博士に深謝いたします。

参考文献

- 1) E. Robert and E. Eidelberd : Int. Rev. Neurobiol., 2, 279-332 (1970).
- 2) H. C. Stanton : Arch. Int. Pharmacodyn., 143, 195-204 (1963).
- 3) 大森正司、矢野とし子、岡本順子、津志田藤二郎、村井敏信、樋口満 : 農化, 61, 1449-1451 (1987).
- 4) N. Komatsuzaki and K. Tsukahara : In Pop. Am. Soc. Agric. Eng., p11 (2003).
- 5) Saikusa, Horino, and Mori : Biosci. Biotechnol. Biochem., 58, 2291-2292 (1994).
- 6) 相島知美、門松俊志、内田充郎、西祐一郎、土谷紀美、西村賢了 : 日本国公開特許公報 (A), 2006-25669 (2006).
- 7) A. Yu. M. M. Plohov, T. Gusyatiner, A. Yampolskaya : Applied Biochemistry Biotechnology, 88, 257-265 (2000).

- 8) 早川潔、上野義栄、河村真也、谷口良三、小田耕平：生物工学会誌、74(4), 239-244 (1997).
- 9) K. Park and S. Oh：Bioresource Technology, 98(2), 312-319 (2007).
- 10) C. Guido, D.B. Daniela, A. Caterina, G. Heinz, B. Francesco, G. Markus：EMBO Journal, 22(16), 4027-4037 (2003).
- 11) 石川芳典、小幡彌太郎：日本農芸化学会誌、29, 689-692 (1955).
- 12) 塚本研一、戸枝一喜、大久長範、船木勉：日本国公開特許公報(A)、2005-052103, (2005).
- 13) 綾部孝太郎、大貴恵美子、島崎須雅子、藤波寛子、海老根秀子：味噌の科学と技術、38(8), 273-279 (1990).
- 14) 後藤敦、橋本勉、柳川洋：臨床栄養、61(7), 805-811 (1982).