

研究ノート

しば漬由来 γ -アミノ酪酸 (GABA) 産生乳酸菌の単離とその特性

平井啓理^{1*}、落合春奈¹、森勝史¹、瀧井幸男²

¹株式会社西利 (600-8581 京都市下京区西本願寺前)

²武庫川女子大学生活環境学部 (663-8558 西宮市池開町 6-46)

著者連絡先 E-mail : nishiri_lab@hotmail.com

(受取日 : 2006 年 4 月 20 日、受理日 : 2006 年 5 月 23 日)

要旨 : しば漬けより γ -アミノ酪酸 (GABA) 生成能の高い乳酸菌をスクリーニングし、2 つの乳酸菌 (SB1,SB2) を単離した。このうち SB1 は菌学的性質、生化学的特性および 16S rRNA 解析により、*Lactobacillus kefir* に属する乳酸菌と同定された。*L. kefir* SB1 を、グルタミン酸ナトリウム 3.0 %含有基本培地 (1.0 % GYP、pH5.0) で、34°Cで静置培養したとき、GABA がもっとも効率よく生成された。

キーワード : *Lactobacillus kefir*、GABA (γ -アミノ酪酸)、グルタミン酸ナトリウム、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD)

日本は成熟した高齢社会を迎え、中高年世代を中心に食と健康に対する関心はきわめて高い。厚生労働省は生活習慣病対策として2000年度から、「21世紀における国民健康づくり運動」を実施し、肥満抑止と高血圧症の発症予防を最優先課題として位置づけている。

一方、次世代を担う若年層では、糖質摂取の減少ならびに、脂質と動物性タンパク質摂取の増加傾向にあり、将来の生活習慣病発症に至るリスクを有することが懸念されている。

乳酸菌発酵食品には、アミノ酸類、ビタミン類に加えて、 γ -アミノ酪酸 (GABA) など、新規な機能性を有する物質が含まれ、バイオプリーザーティブとしての食品の保蔵機能のみならず、ヒト腸内の改善に役立つ食品素材として注目をあびるようになった [1]。

GABA はグルタミン酸デカルボキシラーゼ (L-glutamic acid decarboxylase : EC 4.1.1.15 : 以下、GAD と略) の脱炭酸作用によって、グルタミン酸から生成されるアミノ酸で、自然界の動植物や細菌に広く存在する、非蛋白質構成の遊離型アミノ酸である。GABA は哺乳類では抑制性の神経伝達物質として働く重要な物質と考えられている一方、植物では、種子の発芽時やストレス条件下での生育における GABA 含有量の変動等が報告されている [2]。微生物界では、GAD 活性を有する乳酸菌が数多く確認されている [1]。

本研究では、乳酸醗酵漬物であるしば漬から GABA 生成能を持つ乳酸菌の単離を試み、単離した乳酸菌における GABA 生成に最適と思われる培養条件を検討した。

1. 実験方法

1) 乳酸菌のスクリーニング、培養と菌数検査

乳酸菌のスクリーニングは、以下のように行った。当社で製造したしば漬を細かく破碎し、生理食塩水 (0.85% NaCl solution) を加えて懸濁後、得られた試料液を、指示薬 BCP を含む乳酸菌用寒天培地 (ニッスイ) に塗布した。同平板上で黄色く変色したコロニーを選択後、同培地上で 5 回、集積培養を繰り返して純化した。乳酸菌の同定には主として MRS 培地を用いた [3]。

GABA 生産能の検定には、細菌を混釈平板法で接種後、グルタミン酸ナトリウムを添加した GYP 基本培地 (1.0% glucose、1.0% yeast extract、1.0% peptone、3.0% agar) [3] を用い、34°C で静置培養した。

2) アミノ酸測定

24 時間ごとに採取した培養液を 100°C で 5 分間処理し、10,000rpm、室温で、10 分間遠心して得られた上清を検体とした。67mM クエン酸三ナトリウム緩衝液 (pH2.2) で希釈後、高速液体クロマトグラフィー (島津液体クロマトグラフ LC-9A) でアミノ酸測定を行い、GABA 生成値を決定した。

検体中のグルタミン酸は、ヤマサ L-グルタミン酸測定キット (生化学工業) を使用して決定した。

2. 結果と考察

1) 菌株の同定

分離株 SB1 は、円滑な先端をもつ桿状 (0.5-0.8 x 1.0-8.0 μ m) の細菌で、グラム陽性を示し、内生孢子を有しない。30°C で嫌氣的に生育するが、好氣的条件下でも生育することができる。運動性は観察されず、catalase 試験、oxidase 試験、KOH 試験、aminopeptidase 試験

は陰性であり、グルコースを資化し、酸を生じる。

以上の生理学的性質から SB1 を *Lactobacillus* 属の 4 種、*L.parabuchneri*、*L.parakefiri*、*L.buchneri* および *L.kefiri* に属する菌株とみなした [4-6]。さらに BLAST データベース検索および標準株間の 16S rRNA 解析 [7] を実施し、SB1 を *Lactobacillus kefir* Kandler and Kunath 1983^{VP} と同定した (Netherlands Culture Collection of Bacteria、Netherlands 未発表データ)。

本株は当初 *L.kefir* と命名されたが [5, 6]、現在では *L.kefiri* として統一されている [Bacterial Nomenclature Up-to-Date]。

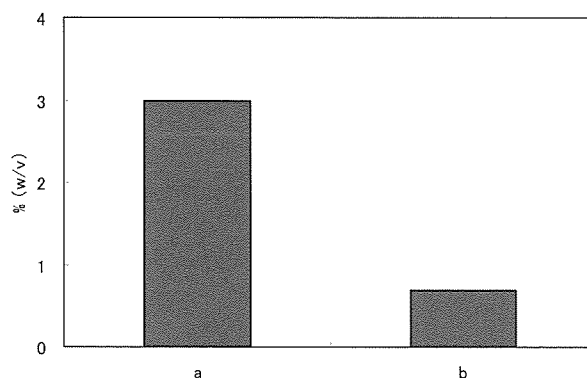


Fig.1 SB1 培養液中の Glu 濃度変化

a: 培養開始時のグルタミン酸量、b: 培養終了時のグルタミン酸量

2) *L.kefiri* による GABA の生産

1.0% GYP にグルタミン酸ナトリウムを 3.0% 添加した培地とグルタミン酸ナトリウムを添加していない培地で、34°C 静置培養を行い、SB1 が増殖することを確認した (開始時: 4.5×10^7 cfu/ml、72 時間培養後 8.8×10^8 cfu/ml)。

培養 120 時間後、培養液中のグルタミン酸は SB1 の増殖に伴い 3% から 0.7% に減少していた (Fig.1)。このことから SB1 は、グルタミン酸ナトリウムを基質として GAD により GABA を生成していることが示唆された。

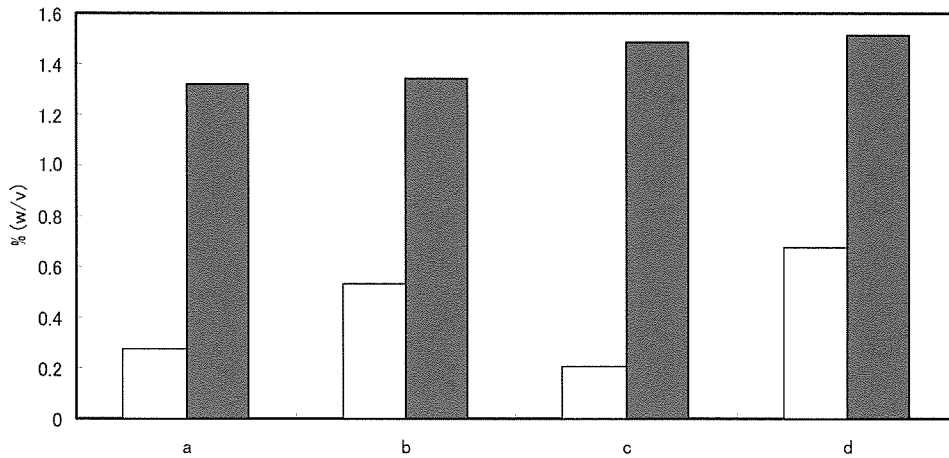


Fig.2 培地pHのGABA生成への影響

培養したときの培養液中のグルタミン酸(□)とGABA(■)の濃度
 a:培地pH4.5, b:培地pH4.7, c:培地pH5.0, d:培地pH6.0

培養初発 pH を 4.5～6.0 に調整し、グルタミン酸ナトリウムを 3.0%添加後、静止培養を行った。培養終了時の SB 1 の生菌数には初発 pH による差が出たもののピーク時の生菌数は、調整した範囲 (pH4.5～6.0) では影響しなかった。培養液中のアミノ酸を測定したところ、pH5.0 及び 6.0 に調整したものが同程度の GABA の生成量で、グルタミン酸ナトリウム

から GABA への変換率は 81.5%であった。(Fig.2)。

菌の増殖には初発 pH4.5～5.0 が良好で、GABA 生産は4.7から6.0までの間で増加した。

グルタミン酸ナトリウム添加試験では、基質濃度を5.0%とし、培養初発 pHを5.0 - 6.0に調整することが望ましいことがわかった (Fig. 3)。

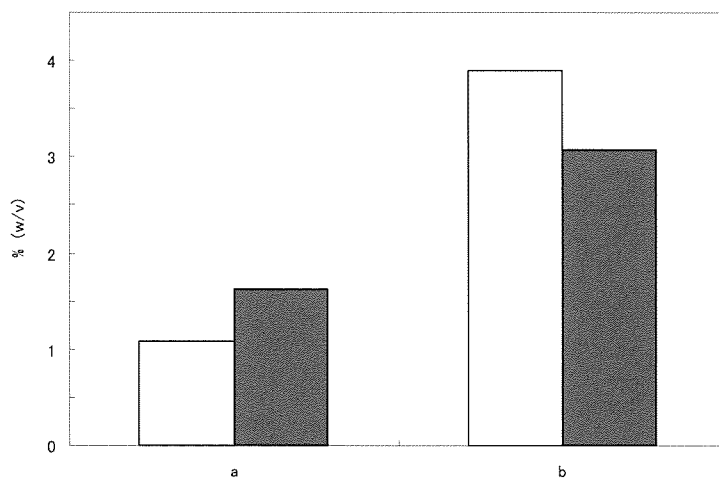


Fig.3 GABA生成量の基質に対する影響

基質であるグルタミン酸を調整し、SB1を培養したときの培養液中のグルタミン酸(□)とGABA(■)の濃度
 a:培地中のグルタミン酸濃度5% (w/w), b:培地中のグルタミン酸濃度10% (w/w)

GABA 培養液を食品に利用するときには、食品への利用範囲を広げるために GABA の生産効率を高めることが望まれる。しかし未変換

のグルタミン酸が残存することによる過剰な旨味は風味を害することが予測されること、さらに GABA を多量に摂取すると、かえって健

康阻害というリスクを生じることが報告されている [1]。

GABA が本来有すると考えられる肥満抑止、高血圧発症予防等の機能を活かすためには、適正な GABA 濃度を含有する漬物食品を日常の食事として摂取することがふさわしい。

今後は、1) *L.kefiri* SB1 で機能する GAD の酵素学的性質を検討して、GAD 機能発現の最適条件化を計ること、2) 漬物発酵におけるグルタミン酸と GABA の量比を調整すること、3) SB1 が保持する種々の酵素活性を検索することなどにより、健康維持と増進に適した GABA 含有漬物製品を開発していきたい。

4. 文献

1. 茅原 紘. GABA の機能解明と新素材開発の可能性. ジャパンフードサイエンス別冊 39-43 (2002)
2. 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 巻 239-244 (1997)
3. Handbook of Microbiological Media (R.M.Atlas,L.C.Parks eds.)CRC Press (1993).
4. M .Vescovo, F.Dellaglio, Y.Bottazzi and P.G.Sarra. Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Betabacterium* Orla-Jensen. *Microbiologia* 2:317-330 (1979).
5. Kandler,O and P.Kunath. *Lactobacillus kefir* sp.nov., a component of the microflora of kefir. *Syst.Appl.Microbiol.*4:286-294 (1983).
6. Kandler,O and W.Norbert. Regular, nonsporing Gram-positive rods. 1206-1234 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol.2 Williams &Wilkins (1986)
7. 上野雄靖、守弘栄一. 16S リボゾーム RNA 遺伝子を利用した乳酸菌の同定システム. 日本醸造協会誌、92 巻、182-187 (1997).

責任編集者：土井 裕司