

乳酸菌による γ -アミノ酪酸の生産

早川 潔*
上野 義栄**
河村 眞也***
谷口 良三****
小田 耕平*****

(要 旨)

市販の食品中のGABAを測定した。キムチ、ヨーグルト、酒類、野菜ジュース等多くの食品でGABAが検出された。市販ヨーグルトから分離した2種の乳酸菌、*S. thermophilus*、*L. delbruekii*は混合培養することにより多量のGABAを生成した。一方、キムチから分離したGABA生産菌は*Lactobacillus*属と推定された。分譲乳酸菌、43菌株についてGABAの生成を調べたところ、*L. brevis*、*L. plantarum*、*L. lactis*、*E. casseliflavus*、*S. thermophilus*がGABAを蓄積することが判明した。特に、*L. brevis*の場合、8菌株中の4菌株が多量のGABA生成能を持ち、7日間で59 mMのMSGを40～50 mMのGABAに変換した。菌体中のGAD活性の比較では、K-3は対数増殖期の菌体中にGAD活性を持ちGABAを培地中に蓄積し始めるのに対し、*L. brevis* IFO 2005は対数増殖期の菌体中にはGAD活性はなく、定常期になり初めてGAD活性が現れGABAの蓄積が始まった。

1. 緒 言

γ -アミノ酪酸(GABA)は、非タンパク質アミノ酸であり、微生物に広く分布するグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)の作用によりグルタミン酸が脱炭酸されて生成する。GABAは、高等動物の神経の抑制性伝達物質であり、血圧降下作用や利尿作用を持つ¹⁻⁵⁾ことが知られている。食品においては、紅こうじ^{6,7)}やギャバロン茶⁸⁻¹⁰⁾

に含まれているGABAが血圧降下作用を示すことが明らかにされた。

また、米の浸漬でGABA含量が増大し、降圧効果の得られることも最近報告された¹¹⁾。

微生物によるGABAの生成は大腸菌¹²⁾、ライ菌¹³⁾、海洋性*Pseudomonas*¹⁴⁾、キノコ¹⁵⁾、乳酸菌¹⁶⁻²¹⁾などにおいて報告されているが、醸造微生物による報告はない。GABAは多くの動、植物中にあり、GADが微生物中に存在するので、それらを原料や加工手段とする食品中にも当然含有されていると考えられる。

著者らは、醸造食品を中心にそのGABA含量を調べるとともに、菌株分譲機関の保存菌株も含めて、GABA生産菌の分離、検索等を行ったので報告する。

* 京都府中小企業総合センター
応用技術課 主任研究員
** 同 技師
*** 同 主任
**** (株)福寿園
***** 京都工芸繊維大学

2. 実験方法

2.1 供試食品

市販の漬物、ヨーグルト、納豆、酒類などを用いた。

2.2 アミノ酸の分析

食品を0.2 Nクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2) で100倍に希釈後、固形物をろ過し、測定試料とした。アミノ酸分析は(株)島津製作所液体クロマトグラフLC-9Aで強酸性陽イオン交換樹脂カラム Shin-pack Isc-07Na型 (スルホン基を持つスチレンジビニールベンゼン共重合体) を用いて分析した。

2.3 菌の分離

ホモゲナイザーカップに食品 1 gと99 mlの滅菌水を入れ、5000 rpmで5分間懸濁処理し、その懸濁液を希釈し、乳酸菌分離用培地 (日水製薬製 BCP加プレートカウントアガール) で、30 又は 37 で平板培養し、生育したコロニーを分離した。

2.4 菌の培養とGABAの測定

ヨーグルトより分離した菌については10%スキムミルク培地、その他の乳酸菌については、GYP液体培地 (Glucose 1g, yeast extract 1g, polypeptone 0.5 g, Na-acetate \cdot 3H₂O 20 mg, MgSO₄ \cdot 4H₂O 1 mg, FeSO₄ \cdot 7H₂O 1 mg, NaCl 1 mg, H₂O 100 ml, pH 6.8) にそれぞれL-グルタミン酸モノナトリウム塩 (以下MSGと略す) を10 g/l 添加して使用した。これらの培地に前培養した各菌を接種し、静置培養後、グルタミン酸の減少とGABAの生成量を測定した。

2.5 菌体のGAD活性の測定

培養液30 mlから菌体を5000 rpm、10分間で遠心回収し、20 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 30 mlで2回洗浄し、最終液量を10 mlにし、超音波処理 (トミー精工) により菌体を破碎し、その遠心上清 (5000 rpm、10分間) を測定用酵素液とした。基質溶液 (20 mM MSG, 0.4 M NaCl, 0.2 M Pyridin-HCl, pH 4.6) 1.3 ml、4M硫酸アンモニウム0.1 ml 及び酵素液0.1 mlを混合し、37 で60分間反応を行った。5分間煮沸して反応を停止した後、生成したGABAを測定した。上記条件下で、1分間に1 μ molのGABAを生産する酵素量を1単位 (U) とした。

3. 結果

3.1 食品中のGABAの含有量とMSG添加によるGABAの生産

市販の各種食品中のGABA量を調べた (表1)。GABAは、ヨーグルトの一部、清酒、ワイン、ビール等の酒類、酢、漬物、キムチ、野菜ジュース等、多くの食品に含有されていた。特に、キムチでは6試料全てに0.3 mg/g以上、最大で5.8 mg/gが検出された。食品中のGABAは、野菜ジュースについては原料の野菜に由来するものと考えられるが、他の食品は醸造食品なので微生物により生産された可能性がある。

GABA生産における微生物の関与を調べる目的で、ヨーグルトとキムチを選び検討した。即ち、GABAが検出されたヨーグルトとキムチにMSGを10 mg/gの濃度で添加し、1週間培養した。その結果を表1に示す。GABA含量が顕著に増大するものが検出された。興味あることに、GABA含量が少なかったヨーグルトにおいて、MSGを添加して培養すると、GABAが顕著に増加するものが現れた。これは、ヨーグルト中にGABA生産菌が存在していても、原料乳中には遊離のグルタミン酸

表1 各種食品中におけるGABA及びグルタミン酸含量

Food	(mg/g)			
	Initial		After incubation	
	GABA	Glu	GABA	Glu
Kimuchi A	0.79	7.65	5.20	0.27
Kimuchi B	0.38	4.32	4.16	0.22
Kimuchi C	0.27	8.33	0.52	8.06
Kimuchi D	0.58	10.67	2.30	1.06
Kimuchi E	5.80	<0.01	7.78	0.17
Kimuchi F	1.05	21.05	4.02	10.05
Yoghurt A	<0.01	0.09	<0.01	8.83
Yoghurt B	<0.01	0.06	<0.01	9.05
Yoghurt C	0.07	0.16	4.00	0.16
Yoghurt D	<0.01	0.11	<0.01	9.52
Yoghurt E	<0.01	<0.01	<0.01	7.63
Yoghurt F	<0.01	0.21	<0.01	9.26
Yoghurt G	<0.01	<0.01	<0.01	8.93
Yoghurt H	<0.01	0.06	<0.01	7.70
Yoghurt I	<0.01	0.05	<0.01	8.62
Yoghurt J	0.01	0.01	0.40	8.29
Yoghurt K	<0.01	0.07	<0.01	9.43
Yoghurt L	<0.01	<0.01	0.10	9.20
Yoghurt M	<0.01	0.20	<0.01	9.54
Yoghurt N	<0.01	0.03	<0.01	9.32
Yoghurt O	<0.01	0.06	<0.01	8.93
Yoghurt P	0.02	<0.01	1.16	6.42
Yoghurt Q	0.02	<0.01	4.01	0.53
Yoghurt R	0.03	<0.01	2.51	4.49
Suguki	0.37	5.73	-	-
Shibazuke	0.08	7.18	-	-
Natto	<0.01	1.35	-	-
Sake	0.02	0.15	-	-
Wine	0.06	<0.01	-	-
Beer	0.05	<0.01	-	-
Rice vinegar	0.15	0.17	-	-
Vegetable juice	0.56	2.92	-	-

がほとんどなく、そのためにGABAの生成がなかったと考えられる。

3.2 ヨーグルトからGABA生成に関与する乳酸菌の分離

MSGの添加により顕著なGABA生成量の増加が認められたヨーグルトより、その生成菌の分離を

表2 Y-1、Y-2及びK-3株の性質

Property	Y-1	Y-2	K-3
Cell form	Core	Rod	Short Rod
Cell arrangement	Strepto	Single	Single
Gram staining	+	+	+
Motility	-	-	-
Growth at: 15	-	-	+
20	±	±	+
40	+	+	-
45	+	+	-
Growth in NaCl: 4%	-	-	+
Initial pH for growth	6.0~8.5	4.5~7.5	4.0~7.5
Fermentation type	Homo	Homo	Homo
Optical form of lactic acid	L(+)	D(-)	L(+)
Catalase reaction	-	-	-
Hydrolysis of gelatin	+	+	-
Nitrate reduction	-	-	-
Gas-production from glucose	-	-	-
Sugar fermentation:			
Glucose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Gluconic acid(Na)	-	-	+
L-Alabinose	±	±	+
Xylose	±	±	+
Ribose	-	+	+
Mannitol	±	±	+
Rafinose	±	±	+
Sorbitol	±	±	+

試みた。連鎖状球菌と桿菌の2種類の乳酸菌Y-1、Y-2を分離した。これらの菌は、表2に示す形態や性質からヨーグルト生産によく用いられる乳酸菌、*Streptococcus thermophilus* (Y-1) と *Lactobacillus delbrueckii* (Y-2) と同定された(図1 A, B)。それぞれの分離菌を10 g/100mLのMSGを含有した10%スキムミルク培地(以下、MSG添加スキムミルク培地と略す)で個別に培養したところ、両菌株共に生育は良好であったが、GABA生成量は非常に低く、Y-1株のみが微量のGABAを生成した。Y-2株は全くGABAを生成しなかった。

そこで、GABAの大量蓄積が認められたヨーグルト中での両乳酸菌の生育状況を想定して、分離した2種類の乳酸菌Y-1、Y-2を同一のMSG添加ス

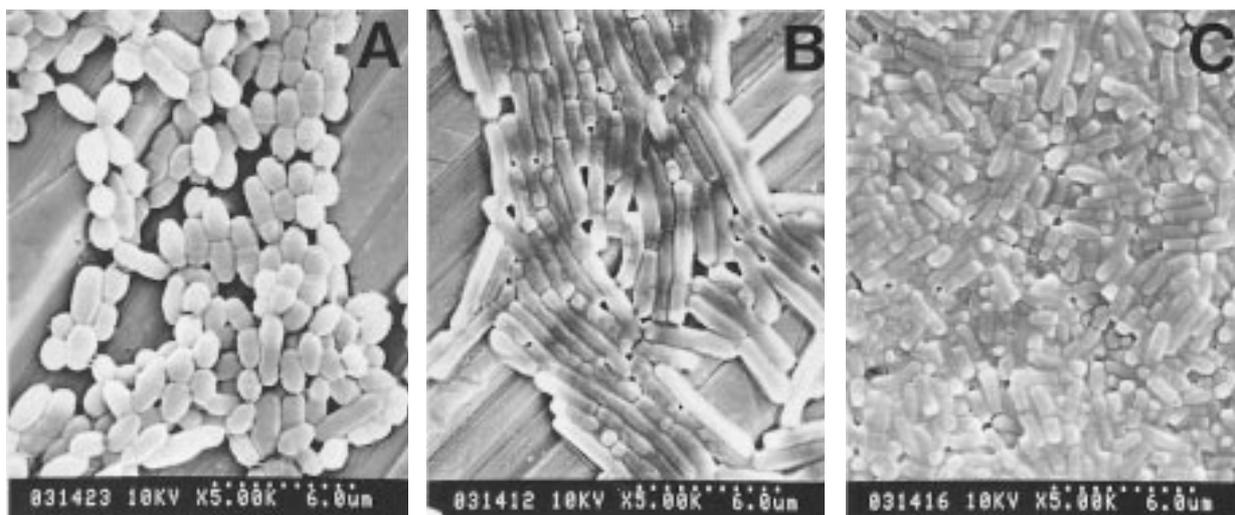


図1 Y-1(A)、Y-2(B)、K-3(C)の走査電子顕微鏡像

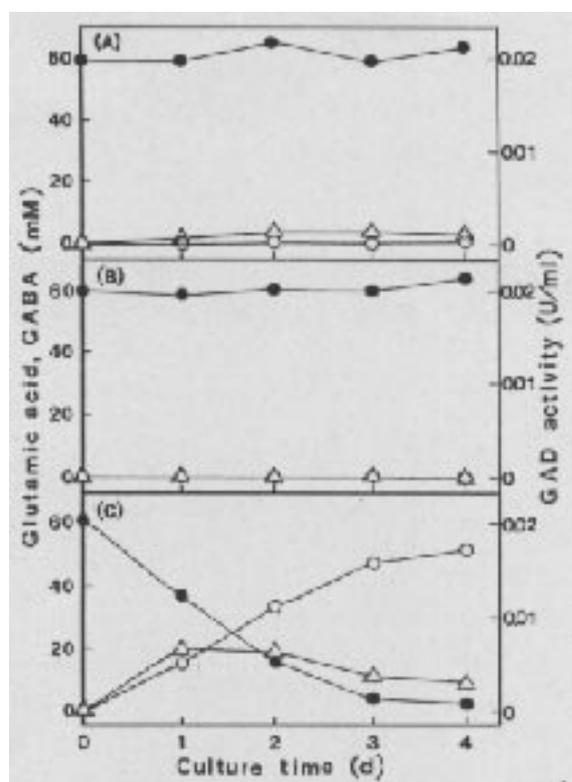


図2 培養時におけるGABA、グルタミン酸とGAD活性の変化

(A) : Y-1、(B) : Y-2

(C) : Y-1とY-2の混合培養

○ : GABA、△ : グルタミン酸

● : GAD活性 (培養液中の菌体)

キムミルク培地に接種し、混合培養を試みた。その結果、図2に示すように、両者の混合培養では多量のGABAを生成することが判明した。また、培養液当たりの菌体中のGAD活性については、個別の培養ではY-1株にのみ微量の活性が認められたが、Y-2株との混合培養の菌体中では活性が飛躍的に増大した。

3.3 キムチからGABA生成に關与する乳酸菌の分離

醸造食品の中で、特にGABA含量の多かったキムチよりGABA生産菌の分離を試みた。即ち、MSGを添加培養したキムチを分離源として、乳酸菌分離用のBCP加プレートカウントアガール培地を用いて行った。分離菌を10 g/lのMSGを含有したGYP液体培地で培養し、GABA生成量を調べた。その結果、3種類のGABA生産菌が得られた。これらの菌株のうち特にK-3株はMSGを速やかに変換した。K-3株によるGABAの生成は、菌体の増殖と平行して進行し、24時間で培地中のグルタミン酸はGABAへと転換された(図3)。培養液当たりの菌体中のGAD活性も菌の増殖初期(培養16時間)から菌体中に高く存在し、培養後期

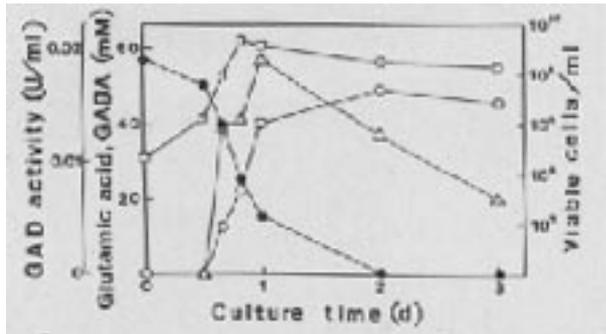


図3 K-3株培養時におけるGABA、グルタミン酸、GAD活性と生菌数の変化

○ : GABA、 □ : グルタミン酸、
△ : GAD活性、 ◇ : 生菌数

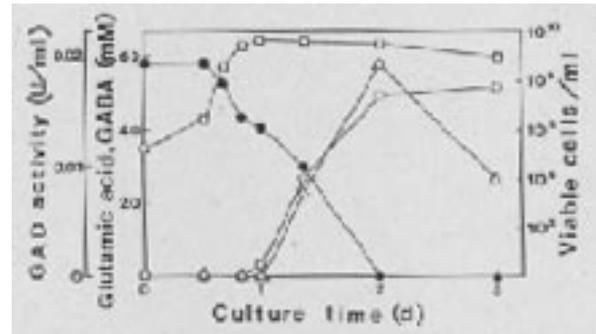


図4 *L. nrevis* IFO 12005培養時におけるGABA、グルタミン酸、GAD活性と生菌数の変化

○ : GABA、 □ : グルタミン酸、
△ : GAD活性、 ◇ : 生菌数

表3 乳酸菌によるGABAの生産

Lactic acid bacterium	GABA(g/l)
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO 3345	4.84
<i>L. brevis</i> IFO 3960	3.80
<i>L. brevis</i> IFO 12005	5.16
<i>L. brevis</i> IFO 12520	4.48
<i>L. brevis</i> IFO 13109	0.32
<i>L. brevis</i> IFO 13110	0.27
<i>L. brevis</i> IAM 1318	0.04
<i>L. brevis</i> IAM 10075	0.09
<i>L. japonicus</i> IAM 10068	0.04
<i>L. plantarum</i> IFO 3070	0.29
<i>L. plantarum</i> IFO 3074	<0.01
<i>L. plantarum</i> IFO 12006	0.36
<i>L. plantarum</i> IFO 12519	0.50
<i>L. plantarum</i> IAM 1041	0.35
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IFO 12007	0.75
<i>E. casseliflavus</i> IFO 12256	0.20
<i>Streptococcus thermophilus</i> IFO 13957	0.11

(培養72時間)には減少した。本菌株は図1 C及び表2に示すようにグラム陽性の桿菌であり、カタラーゼ活性を持たず、GYP培地によりホモ発酵で乳酸を生成し、ラクトースを発酵する乳酸菌であった。本菌株は、現在、同定中である。

3.4 分譲乳酸菌を対象としたGABA生産菌の検索

醸造食品中から分離したGABA生産菌が乳酸菌であることから、分譲機関の保存乳酸菌を対象にMSG添加GYP培地を使用してGABA生成菌を検索した。その結果、表3に示すように、*L. brevis*、*L. plantarum*、*Lactococcus lactis*、*Enterococcus casseliflavus*や*S. thermophilus*がGABAを培地中に蓄積し、GABAの生産菌は乳酸菌中に比較的広く分布することが判明した。これらの乳酸菌の中でも、*L. brevis*は検討した8菌株中4菌株に高いGABA生産性が見られ、*L. brevis* IFO 3345、IFO 3960、IFO 12005、IFO 12520において約40~50 mMのGABAを蓄積した。しかし、*L. brevis* IAM 1318や*L. brevis* IAM 10075のようにGABAの生産が極めて低いものも見られた。また、*L. brevis*以外の乳酸菌は比較的GABAの生産性が低かった。

L. brevis IFO 12005による菌体の増殖、グルタミン酸の減少とGABAの蓄積及び菌体中のGAD活性を図4に示した。本菌株は、キムチからの分離菌K-3よりGABAの蓄積が遅く、定常期で初めて菌体中のGAD活性が認められ、培地中にもGABAの蓄積が始まった。また、本菌は振とう培養でもよ

く増殖するが、ほとんどGABAを蓄積しなかった。GABAの生成には静置培養が必要であった。

4. 考 察

GABAはお茶などの食品にも多く含まれている。しかし、醸造食品中のGABA含有量、および醸造微生物によるGABA生成の研究報告はほとんどない。そこで、本研究では醸造食品中でのGABA量を調べると共に、乳酸菌によるGABA生成について調べた。

まず、市販の各種食品中のGABAを測定した。多くの食品でその存在が認められた。ヨーグルトとキムチ等の醸造食品では、それらの食品に含まれる微生物がGABAの生成への関与が強く示唆された。そこで、ヨーグルトとキムチからGABA生成に関与する乳酸菌を分離し、醸造食品、特にキムチのGABAは乳酸菌によって生成されることが明らかになった。

MSG添加によりGABAを蓄積したヨーグルトからの分離菌、Y-1とY-2は各々*S. thermophilus*、*L. delbrueckii*と同定されたが、これらの菌は単独ではGABAを生成せず、混合培養によりはじめてGABAを生成した。ヨーグルトの生産においては、*S. thermophilus*と*L. delbrueckii sub. bulgaricus*の2菌を混合してスターターとして用いることが多く、混合培養により両菌の生育速度が速くなり、ヨーグルトの質も向上するといわれている。GABA生成に関しては、原料乳中に遊離のグルタミン酸が少ないために市販のヨーグルトではほとんど検出されなかった。これら2種のヨーグルト生産菌が、通常のヨーグルト原料乳中には存在しないような多量の遊離グルタミン酸添加乳中で何等かの相互作用を発揮し、GABAの大量蓄積を引き起こしたことは非常に興味深く、その生成機構の解明が急がれる。

次に、菌株分譲機関の乳酸菌43株についてGABAの生成を調べた。*L. brevis*の8種中4種が多量に蓄積し、*L. plantarum*、*L. lactis*、*E. casseliflavus*、*S. thermophilus*もGABAを蓄積することが判明した。乳酸菌全体から見ればGABA生産菌は少数であるが、その分布は*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Enterococcus*、*Streptococcus*など数種類の属に広がりを持つことが判った。これらの乳酸菌をスターターとして使用する醸造食品（ヨーグルト、チーズ、漬物等）には原料に遊離グルタミン酸が存在すればGABAを蓄積する可能性が高いと考えられる。

L. brevis IFO 2005とキムチから分離したK-3について菌の増殖時期とGABAの生成の関連を検討した。K-3は対数増殖期の菌体中にGAD活性を持ちGABAを培地中に蓄積し始めるのに対し、*L. brevis* IFO 2005は対数増殖期の菌体中にはGAD活性はなく、定常期に達した後初めてGAD活性が現れGABAの蓄積が始まった。このように各菌体中でのGAD活性の出現時期が異なることは非常に興味深く、今後、菌種間での酵素の諸性質や酵素タンパクとしての差異などについて検討したい。

文 献

- 1) 塚田裕三：日本医師会雑誌, Vol.42, P571-579 (1959).
- 2) 三村悟郎, 大塚健次郎, 河崎照雄, 原口義邦, 山道 徹, 大城新蔵, 陣内富男：老年病, Vol.6, P238-243(1959).
- 3) Stanton, H.C.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, Vol.143, P195-204(1963).
- 4) 岡田安弘, 浅野富子, 西崎知之, 荒川俊雄：神経精神薬理, Vol.10, P117-138(1988).
- 5) 松田 誠：神経精神薬理, Vol.10, P201-210 (1988).

- 6) Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A.: *Chem. Pharm. Bull.*, Vol.56, P2484-2489(1987).
- 7) 辻 啓介, 市川富夫, 田辺伸和, 阿部士朗, 樽井庄一, 中川靖枝: *栄養学雑誌*, Vol.50, P285-291(1992).
- 8) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 岡本順子: *農化*, Vol.61, P817-822(1987).
- 9) 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*, Vol.61, P1449-1451(1987).
- 10) Omori, M., Kato, M., Yano, T., Tushida, T., Murai, T., Fukata, S., Iwasa, K.: *Proceedings of the International Symposium on tea Science*, P230-234, Shizuoka Japan(1991).
- 11) 三枝貴代: *化学と生物*, Vol.33, P211-212(1995).
- 12) Najjar, V.A., Fisher, J.: *J.B.C.*, Vol. 206, P215-219 (1954).
- 13) Prabhakaran, K., Harris, E.B., Kirchheimer, W.F.: *Arch Microbiol.*, Vol.134, P320-323 (1983).
- 14) Mountfort, D.O., Pybus, V.: *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.58, P237-242 (1992).
- 15) 桐淵壽子: *家政学会誌*, Vol.43, P165-168(1992).
- 16) 花岡嘉夫: *醗工*, Vol.45, P312-319(1967).
- 17) 浦 哲二, 稲森和夫, 古屋 武, 内田一生: *醬研*, Vol.14, P187-192(1988).
- 18) 浦 哲二, 稲森和夫, 古屋 武, 内田一生: *醬研*, Vol.15, P44-49(1989).
- 19) 浦 哲二, 佐々木正治, 稲森和夫, 内田一生: *醬研*, Vol.15, P93-100(1989).
- 20) 浦 哲二, 小泉一昌, 佐々木正治, 稲森和夫, 内田一生: *醬研*, Vol.16, P237-244(1990).
- 21) Yagasaki, M., Ozaki, A., Hashimoto, Y.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, Vol.57, P1499-1502(1993).
- (なお、本報告は生物工学会誌、Vol. 75、P239-244(1997)に掲載した)