

発酵微生物の食品への新規利用に関する研究 () * 1

上野 義 栄* 2

早川 潔* 3

河村 眞 也* 4

【要 旨】

食品に血圧降下機能を付与することを目的とし、乳酸菌飲料に使用できるGABA高生産乳酸菌株の検索、酵母を利用した無塩味噌の試作、更に無塩味噌の血圧抑制作用を増強するために、GABA高生産乳酸菌を利用し、無塩味噌中でのGABAの生産について検討した。

1 緒言

乳酸菌は、古来より醸造食品や漬物中に含まれ、その乳酸発酵により食品に風味を付与してきた。特に京都では、酒、味噌、醤油等の醸造食品やすくき等の乳酸発酵による漬物など多くの伝統食品があり、それらに乳酸菌が関与している。この様に古来より伝統的に利用されてきた乳酸菌であるが、麹菌や酵母の様に積極的に微生物制御を行いながら利用されだしたのは近年である。また、乳酸菌が関与する醸造食品中には、様々な生理活性物質が含まれており、乳酸菌が作り出す生理活性物質が最近注目されている。

筆者らは、生理活性物質の一つである - アミノ酪酸(GABA)及びGABA生産微生物に注目し、GABA高生産乳酸菌の検索を行ってきた¹⁾。このGABAは、生物界に広く分布している非たんぱく性アミノ酸で、生体内では抑制性の神経伝達物質

であり、血圧降下作用や利尿作用等がある^{2, 3)}と報告されている。最近、GABAを含む食品の血圧降下作用が注目され、GABAを含有するギャバロン茶⁴⁾や紅麹^{5, 6)}は、その血圧降下作用が報告されている。また、胚芽米を水に浸漬することによって、GABAが増大することも報告されている⁷⁾。

一方、味噌等の大豆発酵食品には、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害ペプチドによる血圧抑制作用が報告されている^{8, 9)}。しかし、味噌等に含まれている高塩分のために、その血圧抑制作用が十分に機能していない可能性が高い。そのため筆者らは、塩分を含まない無塩味噌の製造を目指し、*Zygosaccharomyces rouxii*等の酵母を接種することによる無塩味噌の製造の検討を行ってきた¹⁰⁾。

本研究では、食品に血圧降下機能を付与することを目的とし、乳酸菌飲料に使用できるGABA高生産乳酸菌株の検索、酵母を利用した無塩味噌の試作、更に無塩味噌の血圧抑制作用を増強するために、GABA高生産乳酸菌を利用し、無塩味噌中でのGABAの生産について検討した。

* 1 本研究報告は、「味噌中の生理活性物質の検討」の内容も含まれています。

* 2 応用技術課 技師

* 3 同課 課長

* 4 同課 主任研究員

2 実験方法

2.1 GABA生産乳酸菌の検討

2.1.1 使用菌株

Streptococcus thermophilus IFO 103957

Streptococcus thermophilus IAM 1047

Streptococcus thermophilus IAM 10064

Streptococcus thermophilus 510

Streptococcus thermophilus Y-1

Lactobacillus delbrueckii

bulgaricus JCM 1001

Lactobacillus delbrueckii

bulgaricus IAM 1120

Lactobacillus delbrueckii

bulgaricus IAM 12091

Lactobacillus delbrueckii

bulgaricus IAM 12472

Lactobacillus delbrueckii

bulgaricus B5-b

Lactobacillus delbrueckii Y-2

2.1.2 乳酸菌の培養

GYP 培地 (1 % Glucose, 1 % Yeast extract, 0.5% Polypeptone, 0.2% Na-acetate·3H₂O, 20ppm MgSO₄·7H₂O, 1ppm MnSO₄·4H₂O, 1ppm FeSO₄·7H₂O, 1ppm NaCl, pH 6.8) 及びスキムミルク培地 (10% skim milk) を用い、必要に応じてグルタミン酸ナトリウムを 1 % 添加して、37 °C で静置培養を行った。

2.1.3 グルタミン酸及びGABAの測定

グルタミン酸及びGABAは、TLCで定性分析を行い、HPLCによるアミノ酸分析により定量分析を行った。

TLC は、MERCK 社製シリカゲルプレート (TLC-Plastic sheets silica gel 60 F₂₅₄) 及び展開

溶媒 (n-Butyl alcohol : Acetic acid : H₂O = 3:2:1 v/v) を用いて展開し、ニンヒドリンを発色試薬として用いた。

アミノ酸分析は、HPLC (島津製作所製, LC-9A) にアミノ酸分析用カラム (強酸性陽イオン交換樹脂カラム Shim-pack ISC-07型) を用い、 - フタルアルデヒドを反応試薬として、蛍光波長 (Ex = 348nm, Em = 450nm) による測定を行った。

2.2 酵母による無塩味噌の製造及び乳酸菌による無塩味噌でのGABAの生産

2.2.1 原料

カナダ産白目中粒大豆、米麹 (水分含量約 35% の蒸米に種菌を散布し、常法により 42 時間製麹したもの) を使用した。

2.2.2 使用菌株

Zygosaccharomyces rouxii M-1

Saccharomyces cerevisiae IAM 4274

Lactobacillus brevis IFO 12005

2.2.3 酵母及び乳酸菌の培養

Z. rouxii 及び *S. cerevisiae* は、麦芽エキス培地 (2 % Glucose, 2 % Yeast extract, 0.1% Polypeptone) で 30 °C、24 時間静置培養を行った。
L. brevis は、GYP 培地で 37 °C、24 時間静置培養を行った。

2.2.4 無塩味噌の製造

次の 2 種類の方法で製造した。蒸煮大豆、米麹及び水を麹歩合 15 の割合 (Table) で混合後、*S. cerevisiae* または *L. brevis* を 10⁵ cells/g または 10⁶ cells/g になるように添加し、25 °C で 4 週間醸造した。

また、*Z. rouxii* については、原料混合後、55

で18時間糖化後に、*Z. rouxii*を 10^5 cells/gになるように添加し、25℃で4週間醸造した。

Table 無塩味噌の原料組成

原料	Yeast	<i>L. brevis</i> (A)	<i>L. brevis</i> (B) (weight %)
蒸煮大豆*	65.0	65.0	65.0
米麹	37.5	37.5	37.5
CaCO ₃			0.5

* : カナダ産輸入大豆

2.2.5 味噌中の生菌数測定

味噌中の酵母数は、クロラムフェニコール添加麦芽寒天培地、乳酸菌数は0.5%炭酸カルシウムを添加した抗黴培地「ダイゴ」(日本製薬)を用いて、希釈平板培養法により測定した。

2.2.6 味噌の成分分析

エタノール及びグルコースは、エタノール及びグルコース測定キット(ペーリンガー・マンハイム社製, F-キット)を用いて、またpHは、pH計(新電元工業製, pH BOY-P2)を用いて測定した。

アミノ酸分析は、HPLC(島津製作所製, LC-9A)にアミノ酸分析用カラム(強酸性陽イオン交換樹脂カラム Shim-pack ISC-07型)を用い、 α -フルアルデヒドを反応試薬として、蛍光波長(Ex = 348nm, Em = 450nm)による測定を行った。

3 実験結果

3.1 GABA生産乳酸菌の検討

*S. thermophilus*及び*L. delbrueckii bulgaricus*は、それぞれ単独ではGABAを生産しないが、2株の混合培養によりグルタミン酸からGABAが生産される¹⁾。この2種類の株は、発酵乳や乳酸菌飲

料の製造に使用可能な乳酸菌であり、グルタミン酸からGABAの生産も期待される。

今回は、乳酸菌飲料に利用できるGABA高生産乳酸菌の組み合わせを見いだすために、*S. thermophilus* 5株及び*L. delbrueckii bulgaricus* 6株のそれぞれの組み合わせによるGABAの生産性の比較を行った。1%グルタミン酸添加GYP培地で培養し、生成したGABAをTLCにより定性分析したところ、*S. thermophilus* IAM 10064、510及びY-1と*L. delbrueckii bulgaricus*との組み合わせたものが、GABAを生産していた。

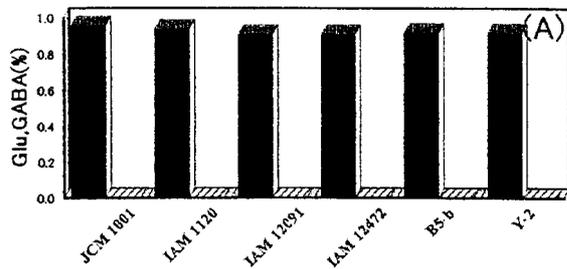
また、1%グルタミン酸添加スキムミルク培地で培養し、生成したGABAをTLCにより定性分析したところ、*S. thermophilus* IFO 103957、510及びY-1と*L. delbrueckii bulgaricus*との組み合わせたものがGABAを生産していた。

TLCによりGABAの生産が確認されたものについて、アミノ酸分析により生成したGABAの定量を行った(Fig.1)。*S. thermophilus* 510及びY-1と*L. delbrueckii bulgaricus*との組み合わせに、高いGABA生成能が見られた。特に1%グルタミン酸添加スキムミルク培地を用い、*S. thermophilus* 510及びY-1と*L. delbrueckii bulgaricus* IAM 1120及び*L. delbrueckii* Y-2との組み合わせが、最も多くのGABAを生産し、0.16%~0.25%のGABAを生産した。

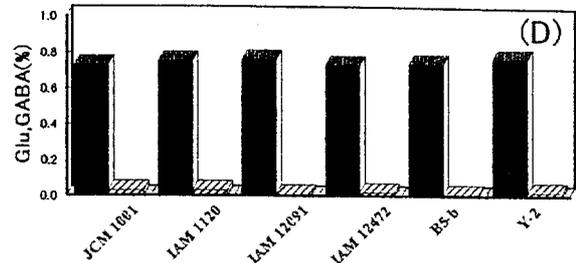
3.2 無塩味噌の製造

3.2.1 *Z. rouxii* 添加による無塩味噌の製造

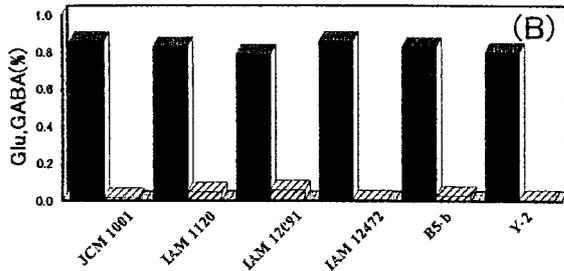
味噌の製造に一般に利用されている耐塩性酵母である*Z. rouxii*を味噌原料に添加することにより、酵母が生産するエタノールの殺菌力を利用した無塩味噌の製造を行った。醸造中の酵母の菌数、エタノール濃度、グルコース濃度及び全アミノ酸濃



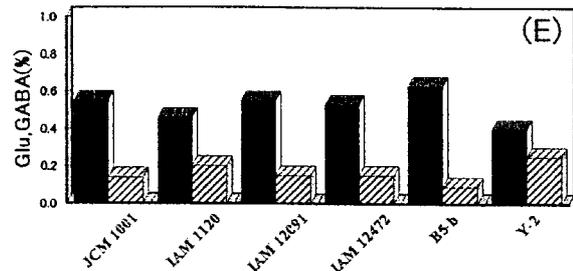
S. thermophilus IAM 10064



S. thermophilus IFO 103957



S. thermophilus 510



S. thermophilus 510



S. thermophilus Y-1



S. thermophilus Y-1

Fig. 1 . *S. thermophilus* and *L. devrueckii* の混合培養によるグルタミン酸からGABAの生産

(A), (B), (C) *S. thermophilus* 及び *L. devrueckii* の混合培養 (GYP培地)

(D), (E), (F) *S. thermophilus* 及び *L. devrueckii* の混合培養 (スキムミルク培地)

■, グルタミン酸; ▨, GABA

度は、Fig.2(A)のとおりである。

糖化(55 , 18 h)を行ったことにより、醸造初期よりグルコース濃度が高いが、*Z. rouxii*の増加と共にグルコースが減少し、エタノールが増加した。全アミノ酸濃度は、醸造5日目までの上昇は早い、その後の増加は穏やかである。

3.2.2 *S. cerevisiae* 添加による無塩味噌の製造

S. cerevisiae を味噌原料に添加することにより、

酵母が生産するエタノールの殺菌力を利用した無塩味噌の製造を行った。*S. cerevisiae* は、非耐塩性酵母のため、原料糖化後に添加すると増殖しない⁸⁾ために、原料混合後糖化を行わなかった。醸造中の酵母の菌数、エタノール濃度、グルコース濃度及び全アミノ酸濃度は、Fig.2(B)のとおりである。

S. cerevisiae の増殖と共にエタノールが増加し、一時的にグルコースが減少している。しかし、その後の *S. cerevisiae* の減少と共にグルコース濃度

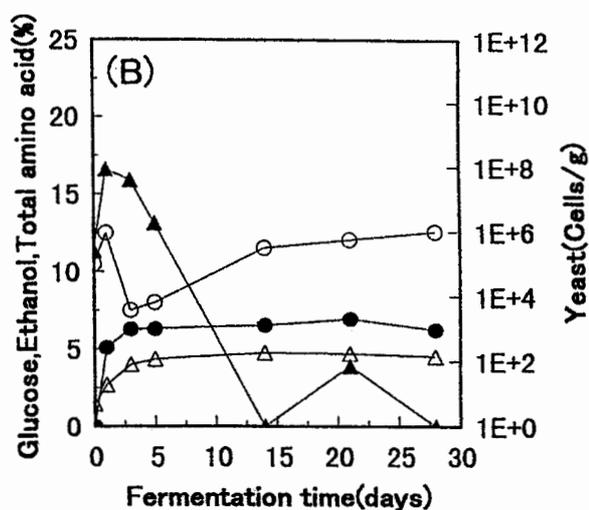
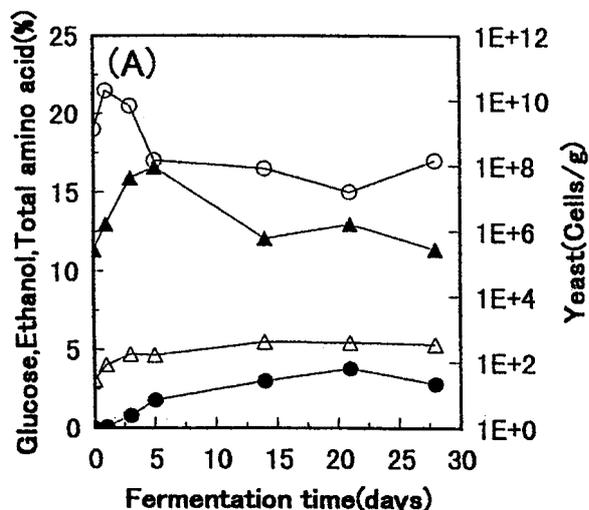


Fig. 2 . 無塩味噌醸造中のグルコース，エタノール，総アミノ酸及び酵母数

(A) *Z. rouxii* M-1, (B) *S. cerevisiae* IAM 4274

- - , グルコース ; - - , エタノール ; - - , 総アミノ酸 ; - - , 酵母数

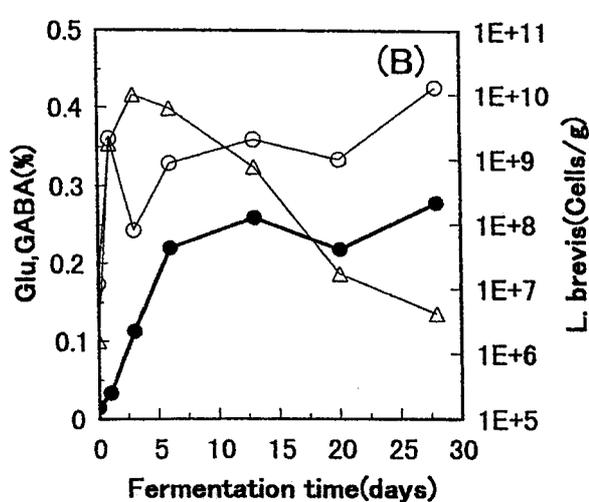
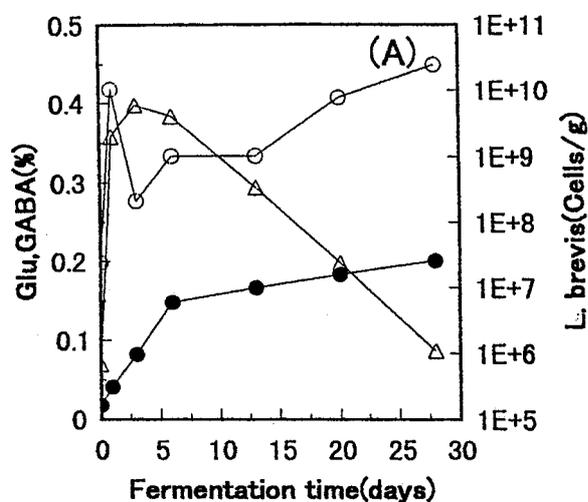


Fig. 3 . 無塩味噌醸造中のグルタミン酸，GABA及び*L. brevis* 菌数

(A) *L. brevis* IFO 12005, (B) *L. brevis* IFO 12005 (CaCO₃ 添加)

- - , グルタミン酸 ; - - , GABA ; - - , *L. brevis* 菌数

は上昇している。これは、*S. cerevisiae* が生産したエタノールのために自らが死滅し、グルコースからエタノールへの変換が行われないうで、米麹由来の α -アミラーゼの働きによりグルコースが再び増加したと思われる。

また、全アミノ酸濃度は、*Z. rouxii* を添加して製造した無塩味噌と同じく、醸造5日目までの上昇は早い、その後の増加は穏やかである。

3.2.3 *L. brevis* の無塩味噌中での培養

GABA高生産株である *L. brevis* IFO 12005の増殖性を、麹歩合15の味噌中において検討したところ、55℃で18時間の糖化後に *L. brevis* を接種すると生育しなかったが、味噌の原料を混合後、非糖化で培養すると *L. brevis* の増殖が認められた。糖化後は、米麹中の α -アミラーゼの加水分解反応により生成した高い糖濃度のために、*L. brevis*

が増殖しなかったものと思われる。

3.2.4 *L. brevis* 添加による無塩味噌の製造

麹歩合15の味噌原料を混合後、*L. brevis* IFO12005を約 10^6 cells/gになるように添加し、25で4週間醸造した。醸造中の*L. brevis*の菌数、グルタミン酸濃度及びGABA濃度の測定結果は、Fig.3(A)のとおりである。

また、*L. brevis*の増殖により乳酸が産生してpHが低下するため、味噌原料に中和剤として0.5%炭酸カルシウムを加えて同様に醸造した結果は、Fig.3(B)のとおりである。

*L. brevis*の増殖と共に、グルタミン酸の減少及びGABAの増加が起こり、ほぼ一週間でGABA濃度は最大値を示した。グルタミン酸濃度はその後も増加し、*L. brevis*の菌数は、減少している。生成したGABAは、炭酸カルシウム未添加無塩味噌が約0.2%に対して、炭酸カルシウム添加無塩味噌は、約0.25%の濃度であった。

また、*L. brevis*の増殖とpHの結果は、Fig.4のとおりである。pHの低下抑制のために炭酸カルシ

ウムを添加したが、炭酸カルシウム添加及び未添加無塩味噌共に、醸造3日目で、pHが約4に低下した。醸造3日目までは、炭酸カルシウムを添加した方が若干pHの低下は遅かったが、3日目以降は、共にpHの変動はなかった。

4 考察

高血圧症は現在我が国人口の約20%にあたる2,000万人以上が罹患していると推定されている。この高血圧症の90%以上は、いわゆる本態性高血圧症と呼ばれ、その原因が特定されていない。この様な中、医薬品としての血圧降下剤としても様々なものがあるが、生活習慣病の一つである高血圧症の予防としては、食品が持つ穏やかな血圧降下作用を利用し、日常的にその食品を摂取することが有効と思われる。

筆者らは、血圧降下物質であるGABAを乳酸菌が生産することに注目し、数種類のGABA高生産乳酸菌を選抜及び分離してきた。乳酸菌は、ヨーグルト等に見られるように、乳酸菌自体が、整腸作用、血中コレステロール低減作用、制癌作用及び免疫賦活作用等の生理活性を有する。今回は乳

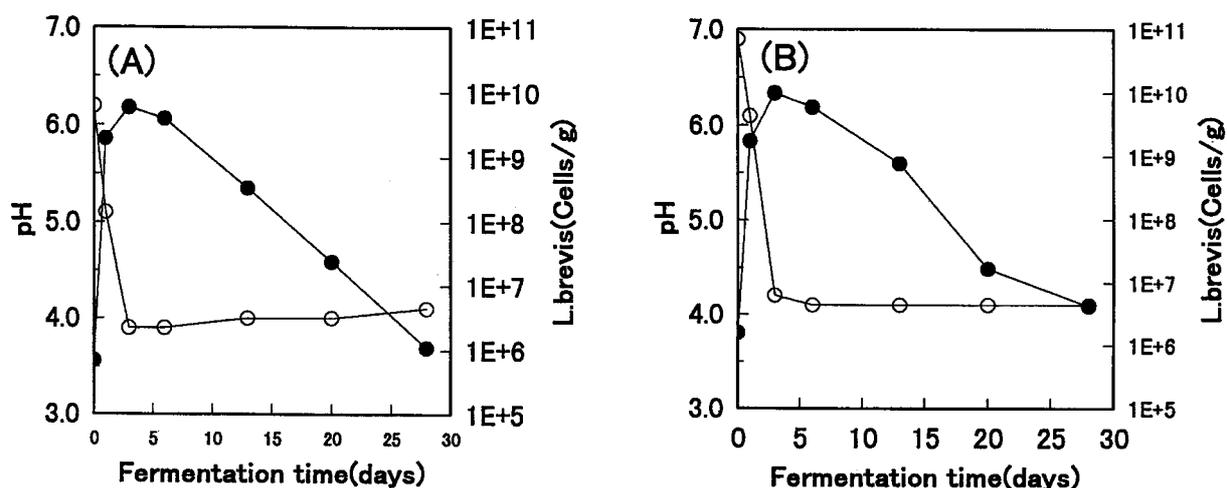


Fig. 4 . 無塩味噌醸造中のpH及び*L. brevis* 菌数

(A) *L. brevis* IFO 12005, (B) *L. brevis* IFO 12005 (CaCO₃ 添加)

- - , pH ; - - , *L. brevis* 菌数

酸菌を用いて、乳酸菌飲料中でGABAを生産することを目的として、発酵乳や乳酸菌飲料に利用が可能な、*S. thermophilus* 及び *L. delbrueckii bulgaricus* との混合培養によるGABAの生産を検討し、1%グルタミン酸添加スキムミルク培地で、0.16%~0.25%のGABAを生産することが出来た。今回の2株の組み合わせにより、今後乳酸菌飲料への利用が期待される。

また、食品に含まれる血圧降下物質としては、最近ACE阻害ペプチドが注目されており、様々な食品より発見されてきている。味噌、醤油等の発酵食品からの分離の報告も多く見られる。しかし、食品としての摂取では、味噌等に含まれる高塩分が、血圧上昇の因子にもなり得ることが懸念されていた。

そのため筆者らは、味噌より塩の弊害を取り除き、味噌本来が持つ血圧降下作用等の様々な機能^{11, 12)}を有効に活用するために、*Z. rouxii* 及び *S. cerevisiae* を用い、酵母が作り出すエタノールの殺菌作用を利用して、無塩味噌の製造を行った。

味噌が持つACE阻害ペプチドにより、無塩味噌は血圧降下作用が期待される場所であるが、更に血圧降下作用を増強するために、血圧降下物質であるGABAを *L. brevis* により、無塩味噌中で生産させることを検討した。

この様にして製造した無塩味噌については、塩分を含まないことが従来の味噌と大きく違うところであり、その用途については、従来の調味料としての用途以外の新しい用途開発が必要と考えられる。

なお、酵母を利用した無塩味噌、特に *S. cerevisiae* を用いた無塩味噌は、エタノール濃度が高く、アルコール臭が強くなった。また、*L. brevis* を利用した無塩味噌は、pHが低く、漬け物臭がし

た。今後、これらの点の改良が必要と考えられ、*L. brevis* を利用した無塩味噌については、味噌様の風味を出すために、酵母との共生培養を検討することが必要と思われる。

(参考文献)

- 1) 早川 潔, 上野 義栄, 河村 真也, 谷口 良三, 小田 耕平: 生物工学, 74, 4, 239-244(1997)
- 2) E. Robert and E. Eidelberd: Int.Rev. Neurobiol., 2, 279-332(1970)
- 3) H. C. Stanton, Arch. Int. Pharmacodyn., 143, 195-204(1963)
- 4) 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)
- 5) Y. Kohama, S. Matsumoto, T. Mimura, N. Tanabe, A. Inada, T. Nakanishi: Chem. Pharm. Bull., 35, 2484-2489(1987)
- 6) 辻 啓介, 市川 富夫, 田辺 伸和, 阿部 士郎, 樽井 庄一, 中川 靖枝: 栄養学, 50, 285-291(1992)
- 7) T. Saikusa, T. Horino, Y. Mori: Biosci. Biotech. Biochem., 58, 2291-2292(1994)
- 8) 岡本 章子, 柳田 藤治: 食品工業, 40, (8) 70-79(1997)
- 9) 河村 幸雄: 食品工業, 40, (12) 73-82(1997)
- 10) 早川 潔, 上野 義栄, 河村 真也, 宮野 要一, 菊島 直, 荘 咲子, 林 力丸: 農化, 69, 1021-1026(1995)
- 11) 岩下 敦子, 高橋 裕司, 河村 幸雄: 日 釀, 89, 869-872(1994)
- 12) 海老根英雄: 味噌の科学と技術, 43, 339-361 (1995)