

乳酸菌の生理活性作用の利用*

上野 義 栄**
宮 島 直 人**
河 村 真 也***
早 川 潔****

【要 旨】

キムチから分離したGABA高生産乳酸菌 *L. hilgardii* K-3と、その類縁種及び同種の乳酸菌について、GABA生産能の比較検討を行った。その結果、*L. brevis*、*L. hilgardii*及び *L. kefir*では、菌種の違いによるGABA生産能の違いが認められた。また、*L. brevis* IFO 12005、IFO 12520及びIFO 13110または *L. hilgardii* JCM1155及びK-3の様に、同一種の中でも菌株によるGABAの生産能の違いが認められた。また、最もGABA生産能が優れていたキムチよりの分離株 *L. hilgardii* K-3を用いて、3%以上のGABAを、グルタミン酸を5%含むGYP培地で生産することが出来た。

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ぐ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⁾。

今回、GABAを含有するキムチから分離、同定されたGABA高生産乳酸菌 *Lactobacillus hilgardii* K-3のGABA生産能を明らかにするために、数種のGABA生産乳酸菌との比較を行い、更に、*L. hilgardii* K-3を用い、液体培養によるGABAの生産条件について検討を行った。

* : 本研究報告は、けいはんなRSP事業可能性試験として実施したものです。

** : 応用技術課技師

*** : 応用技術課主任研究員

**** : 応用技術課課長

2. 実験方法

2.1 GABA生産乳酸菌分離株の同定

2.1.1 使用菌株

Lactobacillus brevis IFO 12005

L. brevis IFO 12520
L. brevis IFO 13110
L. hilgardii JCM1155
L. hilgardii K-3
L. kefir JCM5818

2.1.2 培地及び培養方法

乳酸菌の前培養は、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, 50ppm Tween 80, pH 6.8）を用い、25、30または37 で、24時間、静置培養を行った。

また、乳酸菌の本培養は、GYP培地を用い、必要に応じてグルタミン酸ナトリウムを添加し、25、30または37 で、静置培養を行った。

2.1.3 乳酸菌の増殖度の測定

乳酸菌培養液の660nmの吸光度により、乳酸菌の増殖度とした。

2.1.4 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、 α -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。

3. 実験結果

3.1 GABA生産乳酸菌によるGABA生産能の比較

キムチから分離したGABA高生産乳酸菌*L. hilgardii* K-3 と、その類縁種及び同種の乳酸菌*L. brevis* IFO 12005、*L. brevis* IFO 12520、*L. brevis* IFO 13110、*L. hilgardii* JCM1155及び*L. kefir* JCM5818について、1%グルタミン酸ナトリウム添加GYP培地中でのGABA生産能力の比較を行った。Tableに示すように、キムチから分離した*L. hilgardii* K-3 が、最もGABA生産能が高く、ついで*L. brevis* IFO 12005及び*L. brevis* IFO 12520が高いGABA生産能を示した。また、*L. brevis* IFO 13110、*L. hilgardii* JCM1155及び*L. kefir* JCM5818の3株のGABA生産能は低かったが、少量のGABA生産は確認された。

Table 乳酸菌によるGABAの生産

乳 酸 菌	GABA(g/l)
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO 12005	4.94
<i>L. brevis</i> IFO 12520	4.09
<i>L. brevis</i> IFO 13110	0.40
<i>L. hilgardii</i> JCM 1155	0.04
<i>L. hilgardii</i> K-3	7.67
<i>L. kefir</i> JCM 5818	0.04

1%グルタミン酸ナトリウム添加GYP培地、30℃、7日間培養後にGABAを測定した。

3.2 *L. hilgardii* K-3 及び*L. brevis* IFO 12005によるGABA生産能の比較

GABA生産能の比較を行ったGABA生産乳酸菌の中で、最も高いGABA生産能を示したキムチからの分離菌 *L. hilgardii* K-3と、それに次ぐGABA生産能を示した*L. brevis* IFO 12005とを、培地に添加するグルタミン酸ナトリウムの濃度を変化させて、そのGABA生産量を比較検討した。

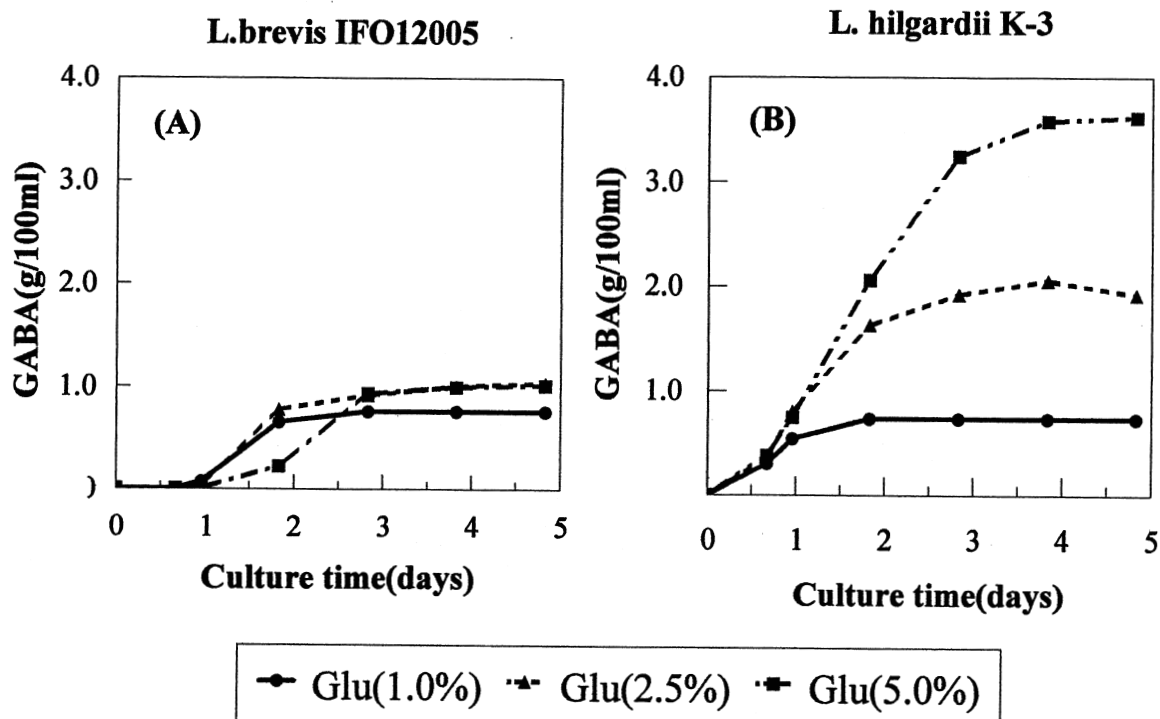


Fig. 1 *L. brevis* IFO 12005及び*L. hilgardii* K-3によるGABAの生産

GYP培地中の初発のグルタミン酸濃度を1.0、2.5及び5.0%に変化させたときの、*L. brevis* IFO 12005の培地中のGABA生産量はFig. 1 (A)、*L. hilgardii* K-3の培地中のGABA生産量はFig. 1 (B)のとおりである。

L. brevis IFO 12005は、初発グルタミン酸濃度を1.0、2.5、5.0%と増加させても、GABAの生産量は約1%であり、グルタミン酸濃度を高くしても、GABAの生産量は、1%以上に増加しなかった。それに対して、*L. hilgardii* K-3では、初発グルタミン酸濃度を1.0、2.5、5.0%と増加させることにより、それに伴ってGABAの生産量も増大した。

また、*L. hilgardii* K-3は、培養16時間後には既にGABAが生成し始めているのに対し、*L. brevis* IFO 12005では、培養24時間経過後でもまだGABAを生産していない。

この様に、GABA生産量及び生成速度ともに、

L. brevis IFO 12005よりも*L. hilgardii* K-3が優れていた。

3.3 *L. hilgardii* K-3 によるGABA生産に対する、グルタミン酸ナトリウム濃度の影響

GABA生産能に優れている*L. hilgardii* K-3を用い、GYP培地中でのGABA生産能について検討するために、GYP培地の初発のグルタミン酸濃度を2.5、5.0、7.5、10.0、12.5及び15.0%と変化させたときの*L. hilgardii* K-3の増殖曲線は、Fig. 2 (A)、培地中のGABA生産量はFig. 2 (B)のとおりである。

L. hilgardii K-3は、初発グルタミン酸濃度を5.0%としたときに最も良く増殖し、それ以上のグルタミン酸濃度になると増殖速度が低下し、特にグルタミン酸濃度12.5及び15.0%では、*L. hilgardii* K-3の増殖を明らかに阻害している。

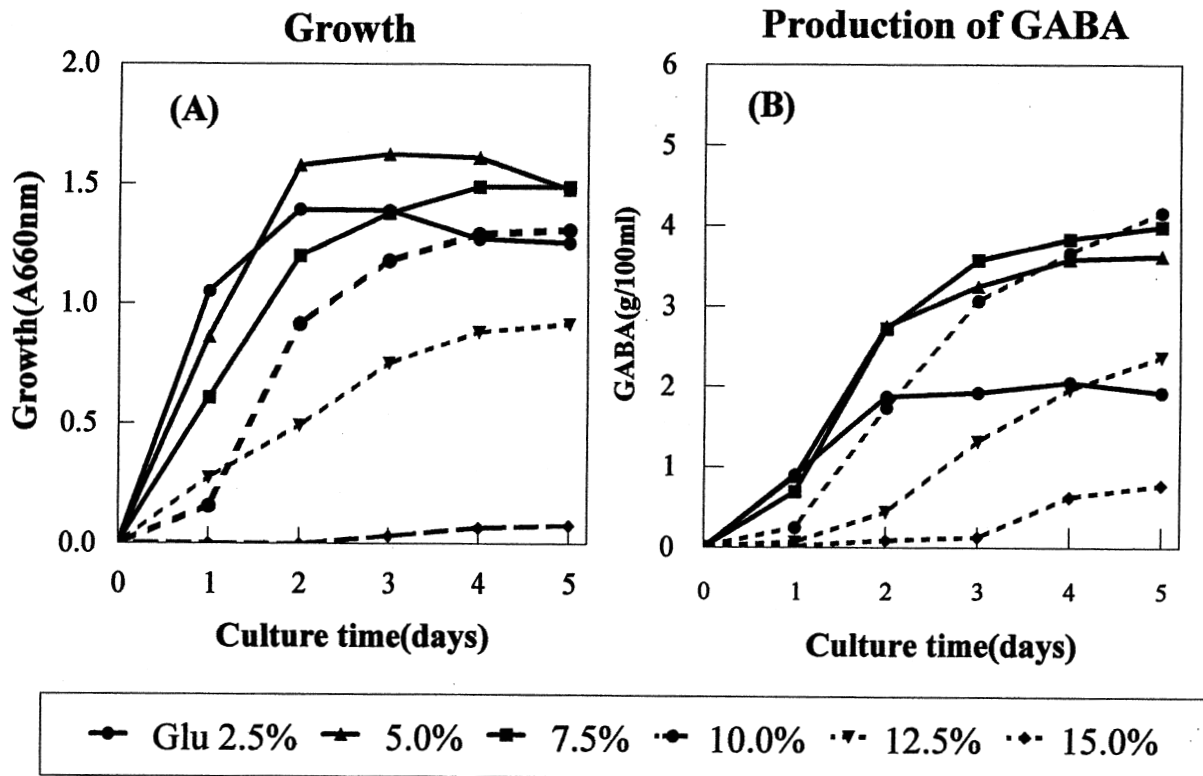


Fig. 2 グルタミン酸濃度の影響

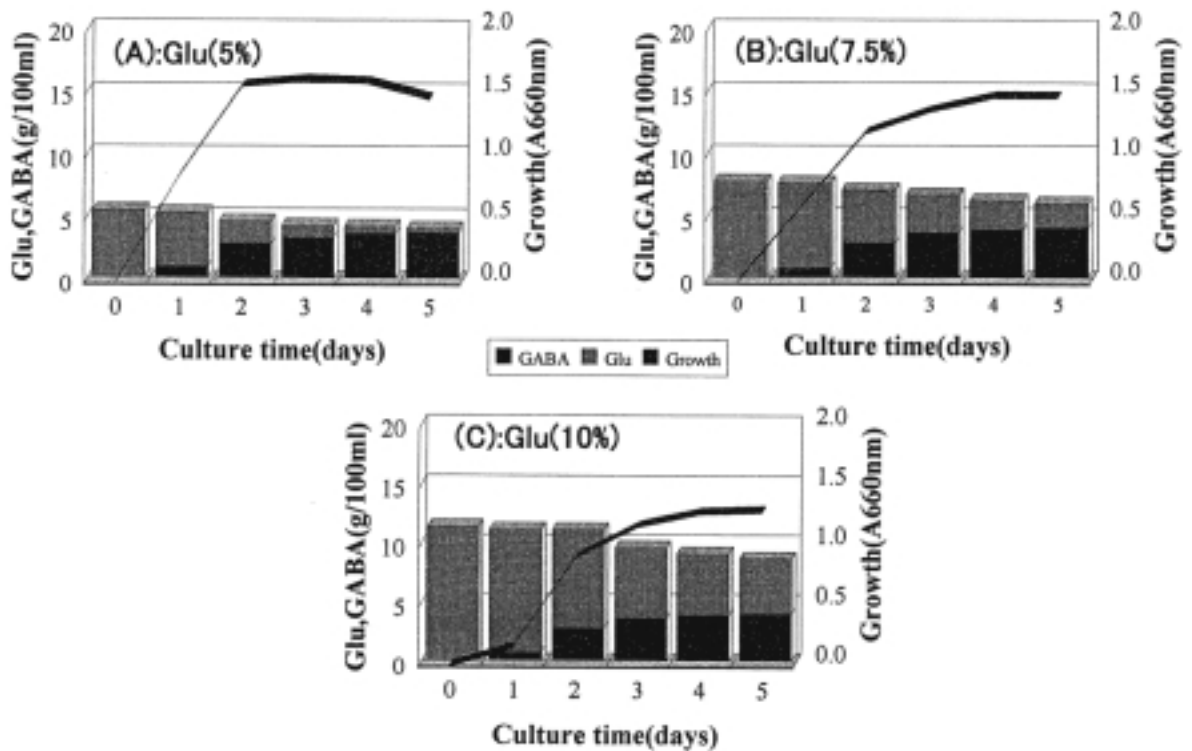


Fig. 3 *L. hilgardii* K-3によるGABAの生産

培地中でのGABA生産は、初発グルタミン酸濃度が2.5%では、培養2日で既に培地中の全てのグルタミン酸をGABAに変換し終えている。また、初発グルタミン酸濃度が5~10%で、最もGABAの生産量が高くなり、3日間の培養でGABAを3%以上生産している。しかし、それ以上にグルタミン酸濃度を増加させるとGABAの生産量は減少し、初発グルタミン酸濃度が12.5%、15.0%と増加するのに伴い、GABAの生産量も減少している。

GABA生産量の最も多い初発グルタミン酸の濃度条件である5~10%での、*L. hilgardii* K-3の増殖とグルタミン酸及びGABAの関係は、Fig. 3のとおりである。

初発グルタミン酸濃度5.0%では、*L. hilgardii* K-3の増殖に伴い、培地中のグルタミン酸がGABAに変換され、培養5日目でほぼ全てのグルタミン酸がGABAに変換し、GABAの濃度は、3.6%の高濃度を示している。それに対して、初発グルタミン酸濃度7.5、10.0%では、初発グルタミン酸濃度5.0%の場合と同様、*L. hilgardii* K-3の増殖に伴い、培地中のグルタミン酸がGABAに変換される。しかし、生成するGABAは、初発グルタミン酸濃度5.0%の場合とほぼ同量しか生産せず、GABAに変換しないグルタミン酸が培地中に多量に残存している。

この様に、初発グルタミン酸濃度5.0%のGYP培地を用いることにより、*L. hilgardii* K-3によるGABA生産を最も効率よく行うことができた。

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。

最近血圧を下げる効果が期待される食品が注目されており、アンジテンシン変換酵素阻害ペプチドやGABA等の血圧降下物質を含む食品が商品化されてきている。

この様な中、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、醸造食品より数種類のGABA高生産乳酸菌を分離してきた。

キムチから分離したGABA高生産乳酸菌*L. hilgardii* K-3と、その類縁種及び同種の乳酸菌について、GABA生産能の比較検討を行った。その結果、*L. brevis*、*L. hilgardii*及び*L. kefirii*では、菌種の違いによるGABA生産能の違いが認められた。また、*L. brevis* IFO 12005、IFO 12520及びIFO 13110または*L. hilgardii* JCM1155及びK-3の様に、同一種の中でも菌株によるGABAの生産能の違いが認められた。この様に、乳酸菌の中には、GABA生産能を有する菌種もあるが、その生産能は、菌種及び菌株により大きく異なると思われる。また、今回比較したGABA生産菌の中では、キムチよりの分離株 *L. hilgardii* K-3が最もGABA生産能が優れていた。

L. hilgardii K-3は、従来では生産できなかった3%以上のGABAを、グルタミン酸を5%含むGYP培地で生産することが出来た。また、この様な高濃度のGABA含有乳酸発酵液は、更に濃縮あるいは乾燥粉末にすることにより、食品原料として、様々な食品への利用が期待できる。但し、今回使用したグルタミン酸含有GYP培地によるGABA含有乳酸発酵液は、そのまま食品原料と

して使用するためには、培地成分の改良が必要であり、今後食品に利用可能なGABA含有乳酸発酵液を開発するためにGYP培地の成分を改良する予定である。

また、*L. hilgardii* K-3は、グルタミン酸からGABAへの変換速度が速く、わずかな菌数でも、GABAへの変換が可能である。この *L. hilgardii* K-3をキムチや味噌等の発酵食品に接種することにより、発酵食品中でGABAを生産させることが可能である。今後更に、検討する予定である。

(参考文献)

- 1) 早川 潔、上野 義栄、河村 眞也、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)