

## γ-アミノ酪酸高生産菌の長期保存法の開発及び利用方法について

細井永次\*

### Drying of γ-Aminobutyric Acid-producing Bacteria for Food Starter

HOSOI Eiji\*

抄録

生醤油から分離したγ-アミノ酪酸高生産乳酸菌に、グルタミン酸と二糖類を添加し乾燥させ保存試験を行ったところ、40℃、60日間の保存条件で最大10%の残存率を示した。これは、常温でも長期間の保存が可能であることを示すものであった。また、この保存試験後に乾燥乳酸菌を用いて漬物用調味液を試作したところ、高いγ-アミノ酪酸生成能を確認することができた。

キーワード：乳酸菌，γ-アミノ酪酸，グルタミン酸，二糖類，保存，調味液

#### 1 はじめに

乳酸菌は、古くからヨーグルト、漬物などの発酵食品に広く利用されており、今では、それらの食品が持つ様々な生理活性機能が注目されている。筆者は、血圧降下作用や利尿作用、ストレス低減作用などが報告<sup>1)</sup>されている生理活性物質の一つであるγ-アミノ酪酸（以下、GABA）をグルタミン酸から生成する乳酸菌を、県内醤油製造業者の生醤油より分離（16SrRNA 配列解析から *Lactobacillus brevis* と同定）し、発酵食品への応用について検討してきた<sup>2)</sup>。

そこで、本研究では、この乳酸菌を広く利用してもらうため、温度管理等が不十分な環境であっても長期間保存できる、乾燥粉末保存法について検討した。そのため、微生物の保存性を高めるアミノ酸であるグルタミン酸<sup>3)・4)</sup>を保存用担体として大量に用い、発酵過程でそのグルタミン酸がGABAへ資化されることを利用し、GABAを豊富に含んだ食材を製造する方法を検討した。

#### 2 試験方法

試験には前年度、発酵食品から分離した GABA 高生産菌の中で最も生成能が高かった *L. brevis* K14a 株を用いた<sup>2)</sup>。

保存試験の迅速化を図るため、温度を室温より上げて保存する加速試験の条件を検討した後、本試験を実施した。またグルタミン酸ナトリウム以外に、二糖類<sup>3)</sup>やビタミン類を追加し保存効果に与える影響を検討した。

##### 2.1 加速試験条件の検討

まず、市販の小麦粉と酵母（日清スーパーカメラリア）及び *L. brevis* K14a を 28℃で 72 時間静置培養し、液状のパン種を作製した。このパン種 10g に対し、グルタミン酸ナトリウム（以降、図や表中では Glu と省略）5g とスクロース、マルトース、ラクトース及びトレハロース 5g を添加し、40℃で常温真空乾燥させ、乾燥剤と脱酸素剤と共に密封し、それぞれ 5℃、25℃及び 40℃で保存し、定期的に残菌数を計数した。

##### 2.2 保存試験条件の検討

*L. brevis* K14a の培養は GYP 液体培地<sup>5)</sup>を使用し、30℃で 48 時間静置培養を行い試験に供した。

\*北部研究所 生物工学部

### 2.2.1 乳酸菌の集菌方法

培養後、培養液を遠沈管に取り 5°C、5000rpm で10分間遠心分離し集菌した。

### 2.2.2 保存剤の割合の検討

集菌した *L. brevis* K14a は、事前に、微粉末に粉碎し滅菌したグルタミン酸ナトリウム、二糖類またはスキムミルクと任意の割合で調合し、保存試験の試料とした。

### 2.2.3 試料の乾燥方法の検討

2.2.2 で保存剤に分散させた試料は、以下の方法により無菌的に乾燥させた。

- (1)常温真空乾燥：真空乾燥オーブンにより、40°C、24時間乾燥
- (2)凍結真空乾燥：-60°Cの冷凍庫で一晩凍結した後、凍結乾燥
- (3)噴霧乾燥機：試料を蒸留水で希釈し、東京理化器機社製 SD-1000 型を使用し、入口温度150°Cに設定し乾燥
- (4)スキムミルク混合乾燥：試料と乾燥させたスキムミルクをミキサーでよく混合し、デシケーター内で24時間乾燥

### 2.2.4 抗酸化ビタミンの添加試験

抗酸化剤としてアスコルビン酸ナトリウム、 $\beta$ -カロチン及びピリドキサル-5-ホスフェートを添加し保存試験を行った。

## 2.3 漬物用調味液への応用

食材への応用として、市販の濃口醤油または白醤油とアミノ酸液を4倍に希釈し、グルコース1%、マルトース1%になるように添加後、121°Cで15分間高圧蒸気滅菌した。冷却後、保存試験後の乾燥試料をグルタミン酸として目的の濃度になるように添加し、30°Cで5日間の静置培養（1日2回以上攪拌）を行った。

また、調味液の風味及びGABA生成能の向上<sup>2)</sup>を目的として酵母（イーストまたは酒造用酵母：埼玉B酵母）を添加して発酵させた。

生成したGABA等は2.5.2により定量した。

## 2.4 菌数の測定

乳酸菌は日水製薬製BCP加プレートカウントアガール（30°C、48時間嫌気培養）により生育したコロ

ニーを計数した。

## 2.5 GABAの分析

保存試験後の乳酸菌にGABA生成能が保持されるか測定するため、保存試験後、菌数を計数したコロニーを1%グルタミン酸ナトリウムを含むGYP液体培地に添加し、30°C、48時間静置培養し、GABAの分析を行った。

### 2.5.1 TLCによる定性分析

GABAの定性分析には、TLCとしてワットマン社製 Partisil K6F Silica Gel60Å を使用し、展開溶媒として（1-ブタノール：酢酸：水 = 3:2:1 (v/v/v)）に、アミノ酸発色試薬としてニンヒドリンを0.05% (w/v)添加して使用した。

### 2.5.2 HPLCによる定量分析

GABAの定量分析は、フェニルイソチオシオナートによるプレカラム誘導体化法により実施した。分離には Wakosil-PTC(4.0mm×250mm)を用い、溶離液Aを30分間で3%から48% (A:0.01M 酢酸ナトリウム、B:アセトニトリル)の濃度勾配で行った。紫外波長254nmで誘導体化アミノ酸を測定した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 保存試験条件の検討

#### 3.1.1 加速試験条件の検討結果

図1-1～3のGluとはパン種10gとグルタミン酸ナトリウム10g、添加なしとはパン種のみを常温真空乾燥させたものである。Glu+二糖類は2.1のとおりである。その結果、全ての温度でグルタミン酸ナトリウムと二糖類の組み合わせが、最も残存性が高かった。特に25°C（図1-2）及び40°C（図1-3）では、二糖類の有無が大きな差を生じた。二糖類同士の差はあまりなかったが、40°C（図1-3）の保存条件ではマルトースが最も残存性が高く、40°C、60日間で約10%、180日間で約1%残存した。

また、図2は保存3温度による残存性をGlu+二糖類の平均残存数で比較したもので、60日後において温度による有意の差を確認した。また、40°Cで60日間保存することで、25°Cで180日間以上保存する試験に匹敵することが示された。

以上のことから、加速試験の条件は、40℃、60日間とし、保存剤として、グルタミン酸ナトリウムとマルトースを用いて保存試験を行った。

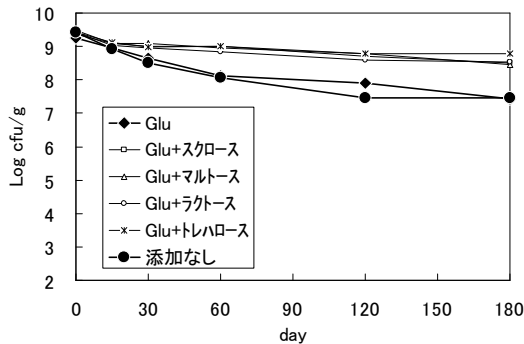


図1-1 保存試験 (4℃)

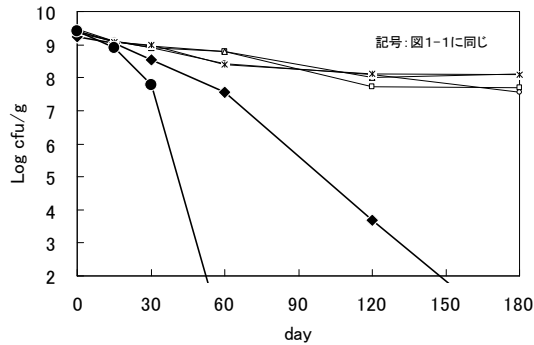


図1-2 保存試験 (25℃)

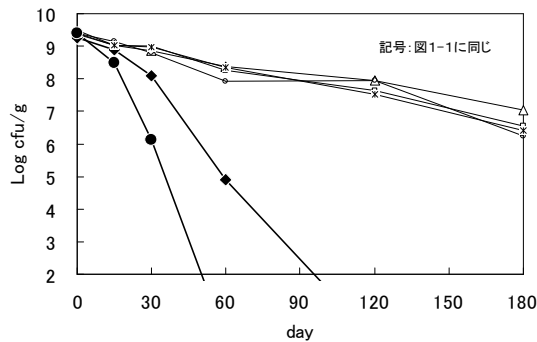


図1-3 保存試験 (40℃)

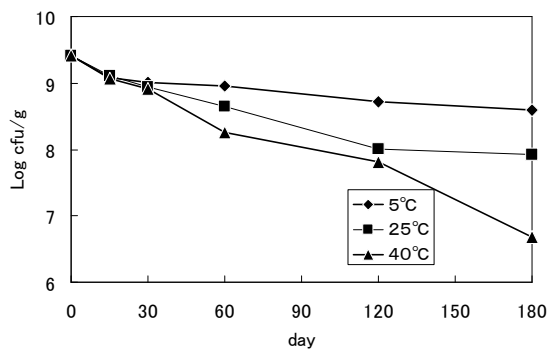


図2 各保存温度の残存数 (Glu+二糖類の平均)  
また、図3は、40℃で180日間保存後、さらに

5℃、180日間で保存した結果を示す。開封後も、長期間冷蔵保存できることが示された。

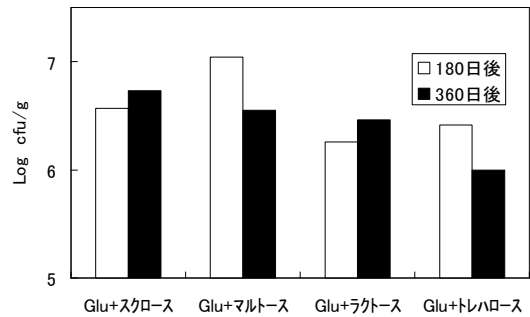
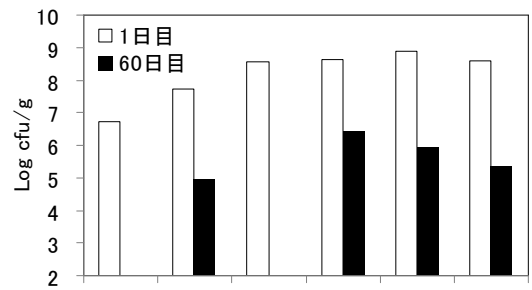


図3 40℃保存後に5℃保存した残存数

### 3.1.2 保存剤の割合の検討結果

次にグルタミン酸ナトリウムとマルトースの添加割合を検討した。その結果、図4のとおり菌体：グルタミン酸：マルトース (2:1:1) のとき最も高い残存性を示した。逆に菌体のみや菌体：マルトース (1:1) の組み合わせでは、菌体はほぼ死滅した。菌体：グルタミン酸 (1:1) では10の5乗 cfu/g ほど残存したが、マルトースを加えた場合の1/10程度であった。



1. 菌体のみ、2. 菌体：グルタミン酸 (1:1)、3. 菌体：マルトース (1:1)、4. 菌体：グルタミン酸：マルトース (2:1:1)、5. 菌体：グルタミン酸：マルトース (4:3:1)、6. 菌体：グルタミン酸：マルトース (4:1:3)

図4 添加割合による残存数の変化

### 3.1.3 試料の乾燥方法の検討結果

2.2.1の方法で集菌し、菌体：グルタミン酸：マルトース(2:1:1)の割合で添加し、2.2.3の方法で乾燥した後、40℃、60日間の保存試験を行った結果を図5に示す。

その結果、加熱を抑えた常温真空乾燥や加熱しないスキムミルク混合乾燥が最も高い残存率 (それぞれ約30%) を示した。一瞬であるが高温が加わる噴霧乾燥では残存率 (4.3%) と低くかつ

た。しかしながら、保存試験後では、逆に噴霧乾燥が最も残存率 (7.2%) が高く、スキムミルク混合乾燥の残存率 (0.3%) が最も低かった。凍結真空乾燥は乾燥後の残存率も保存試験後の残存率も中間的な結果であった。

したがって、この4方法の中では常温真空乾燥または凍結真空乾燥が優れていたが、常温真空乾燥は試料の大量乾燥に適さず、凍結真空乾燥が最適と考えた。

なお、予備試験のパン種にグルタミン酸ナトリウムとマルトースを添加した場合 (図2参照)、保存試験後の残存率は10.5%と最も高かった。

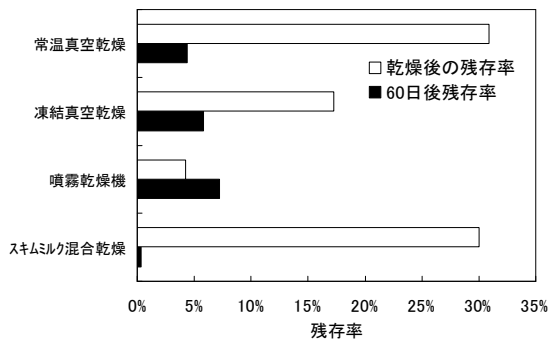


図5 乾燥方法による残存数の変化

### 3.1.4 保存試験後の GABA 生成能

60 日間の保存試験後の残存数 (コロニー数) を計数した後、2.5 の方法に従いコロニーを培養し、TLC で GABA 生成能を試験した。その結果、表 1 のとおり、90% 以上のコロニーに GABA 生成能を確認した。

表 1 コロニーの GABA 生成能

	①	②	③	④
試験コロニー数	150	100	50	50
GABA 生成数	144	95	47	45
割合 (%)	96	95	94	90

①常温真空乾燥機、②凍結真空乾燥機、③噴霧乾燥機、④スキムミルク混合乾燥

### 2.1.5 抗酸化ビタミンの添加試験

2.2.4 のビタミンを全量の 0.1%、1% になるよう添加し、凍結真空乾燥後、40℃で 60 日間の保存試験を行ったが、無添加の場合と比較して有意の差は見られなかった。

## 3.2 漬物用調味液への応用

### 3.2.1 濃口醤油による試作

漬物用調味液は 2.3 の条件で調製した。乾燥試料には菌体:グルタミン酸:マルトース(2:1:1)の割合のものを、凍結真空乾燥し 40℃で 60 日間の保存試験後のものを用い、グルタミン酸ナトリウムとして 1% になるように培地に添加した。

しかしながら、表 2 のとおり、乳酸菌だけでは GABA 生成能が低かった。そこで、酵母 (イースト) を添加し培養すると GABA 生成能が大きく上昇した。これは前報告<sup>2)</sup>と一致するものであるが、GABA の生成が困難な栄養条件の場合、酵母との共生培養が有効であることが示された。また、液体培養し活性化させた *L. brevis* K14a と比較しても遜色のない GABA 生成能を示した。

GABA が生成すると pH の上昇が見られ GABA の生成の有無を推定できることから、生産管理に利用できる可能性を示した。

表 2 醤油培地における GABA 生成能

	①	②	③	④
pH	3.9	6.7	3.9	6.4
Glu (mg/100mL)	921	29	744	55
GABA (mg/100mL)	36	575	116	425

①液体培養したk14a+1%Glu、②液体培養したk14a+酵母 (イースト) +1%Glu、③乾燥試料、④乾燥試料+酵母 (イースト)

### 3.2.2 白醤油とアミノ酸液による試作

漬物用調味液は 2.3 の条件で調製した。乾燥試料は 3.2.1 と同じ条件のものを、グルタミン酸ナトリウムとして 2% になるように培地に添加した。白醤油を使用したのは、醤油では調味液として色が濃すぎ、アミノ酸液を使用したのは、白醤油だけでは培地としては窒素分が少ないことやコストを意識してのことである。また、酵母を、当研究所保有の酒造用酵母に変更し、イースト特有の香りの改善を試みた。

その結果、表 3 のとおり白醤油 100% 及び、白醤油が 70% 含まれる培地に高濃度の GABA を確認した。逆にアミノ酸液が多いと GABA は生成されなかった。特にアミノ酸液 100% では、菌の生育自体が抑制された。また、香りについては、

イースト独特の香りから甘い芳香になり大幅に改善された。

表3 白醤油等におけるGABA生成能

	①	②	③	④
pH	6.4	5.1	4.7	4.8
Gl u (mg/100mL)	239	330	1982	2562
GABA (mg/100mL)	844	926	0	0

①白醤油、②白醤油：アミノ酸液（70:30）、③ 白醤油：アミノ酸液（30:70）、④ アミノ酸液

#### 4 まとめ

この結果、以上のことがわかった。

##### (1)保存用担体の選択

グルタミン酸ナトリウムに二糖類を加えると残存率が大きく上昇した。

##### (2)保存用担体の配合割合

菌体：グルタミン酸ナトリウム：マルトース（2:1:1）のとき、最も残存率が高かった。

##### (3)乾燥方法

乾燥後の残存率、保存試験後の残存率及び大量乾燥を前提とした場合、凍結真空乾燥がもっとも優れた乾燥方法であった。

##### (4)最適条件

40℃、60日の保存試験後、最も残存率が高かったのは、常温真空乾燥した場合（残存率5.8%）であった。予備試験で行ったパン種：グルタミン酸ナトリウム：マルトース（2:1:1）を、常温真空乾燥した場合（残存率10.5%）であった。

##### (5)漬物用調味液の調製

(a)酵母との共生培養が必要

(b)白醤油とアミノ酸液を培地とする場合、白醤油主体の培地とすることが必要

(c)酒造用酵母を使用し、香りを改善

漬物用調味液では、乳酸菌と酵母の共生培養の必要があること、また菌体そのものよりパン種を乾燥保存した方が菌の残存率が高かったことから、乳酸菌と酵母が共生した乾燥試料についても、その用途等について検討したい。

謝辞

本研究を行うにあたり、原材料を提供して下さった企業の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Stanton, H.C.: *Arch Int. Pharmacod.*, 143, (1963) 195
- 2) 細井永次：新規のγ-アミノ酪酸高生産菌の検索及び食品加工残渣への応用，埼玉県産業技術総合センター研究報告，6，(2008)
- 3) 西山幸司：平成15年度日本植物病理学会関東部会講演要旨集，14，(2003)
- 4) 井上智実，勝山陽子，中村静夫：微生物の新規固定化技術の開発，石川県工業試験所研究報告，54，(2004)
- 5) 小崎道雄，内村 泰，岡田早苗：乳酸菌実験マニュアル，朝倉書店，(1992)