

## 有用微生物の探索と機能性食品の開発(第3報)

加島隆洋、小寺美有紀、独活山緑\*、濁活山新吾\*、横山慎一郎

## Search for Useful Microorganisms and Application to Food III

Takahiro KASHIMA, Miyuki KODERA, Midori UDOYAMA\*, Shingo UDOYAMA\*, and Shin-ichiro YOKOYAMA

赤かぶの無塩発酵漬物“酸菜”より分離・選抜した乳酸菌 *Lentilactobacillus buchneri* TS-25株 ( $\gamma$ -アミノ酪酸生産株)と米麴との並行複発酵による甘酒の  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA) 富化を検討した。原料米の精米度、発酵温度、発酵方式等を検討した結果、既存製品の原料及び配合を変更することなく、製造条件を55℃で18時間の糖化处理から35℃で42時間の並行複発酵に変更することでGABAを13倍以上(6 mg/100 g  $\rightarrow$  83 mg/100 g)に増加させた乳酸発酵甘酒を得ることができた。

## 1. はじめに

著者らはこれまでに高山市高根町の伝統食である酸菜(赤かぶ無塩発酵漬物)の品質向上を図る目的で、有用微生物を探索し、発酵スターターとして利用する研究を行ってきた<sup>1,2)</sup>。その過程で選抜した乳酸菌 *Lentilactobacillus buchneri* TS-25株(TS-25)を用いた酸菜では  $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)が醸成され、31 mg/100 gに達することを報告した<sup>1)</sup>。乳酸菌によるGABAの産生は、一部の菌が有するグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD, EC 4.1.1.15)によりグルタミン酸が脱炭酸されることで生産され(図1)、古くは醤油の旨味低減要因として報告されている<sup>3)</sup>。他方、GABAは抑制系の神経伝達物質であり、精神障害症状緩和等のための医薬品として使用されるほか、GABAを蓄積させた脱脂コメ胚芽の経口摂取が抑うつ、不眠、不定愁訴の自律神経障害の改善に高い効果を示すことも報告されている<sup>4)</sup>。故にGABA高生産性乳酸菌の探索と当該乳酸菌を利用したGABA富化食品の開発が精力的に行われてきた<sup>5-14)</sup>。それらの中にはGADの基質となる遊離グルタミン酸を得るために食品用プロテアーゼ製剤<sup>9,10)</sup>や乳酸菌のプロテアーゼ等<sup>6,8,11,14)</sup>を利用した例もあるが、多くはグルタミン酸ナトリウム(MSG)を添加したもの<sup>5,7,12,13)</sup>であり、麴と乳酸菌の並行複発酵を検討した報告は見あたらない。そこで米麴と乳酸菌TS-25株とを併用した並行複発酵により、GABAを富化させた甘酒の開発を試みたので報告する。

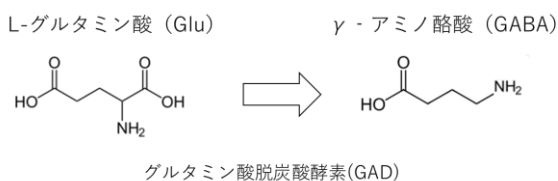


図1 グルタミン酸の脱炭酸反応によるGABAの生成

## 2. 実験方法

## 2.1 供試材料

米はコシヒカリ(高山市産)の精白米を、米麴は市販の種麴にて同精白米を製麴したものを用いた。乳酸菌発酵スターターにはTS-25株を麴汁培地で30℃、48時間培養したものを用いた。

## 2.2 乳酸発酵甘酒の試醸

## 2.2.1 配合

配合は既製品の甘酒に準じた。

## 2.2.2 精米度の検討

甘酒のGABA富化を図るため、原料米(麴米を除く)の精米度に関する検討を行った。すなわち既製品の甘酒に用いる精白米を高精白米とし、遊離グルタミン酸の供給源となるタンパク質を温存するために精米度を落とした普通精白米と低精白米を調製し、比較材料に用いた。これらを洗米後、一晚吸水(5℃)させた後、1時間水切りし、再度必要量の水を加えて加熱糊化(90℃、30分間)した。品温を60℃以下に低下させたところで米麴を添加してよく混合し、品温が40℃以下に低下したことを確認してTS-25株の発酵スターター(濁度0.9)を仕込み重量の1%となるように添加し、30℃で42時間並行複発酵させた。これに対し、既製品の製法に準じて55℃で18時間糖化のみを行ったもの(乳酸菌未接種)を対照とした。

## 2.2.3 発酵温度及び発酵方式の検討

上記精米度の検討結果を踏まえ、発酵温度と発酵方式に関する検討を行った。原料米の精米度は高精白とし、新たに35℃での並行複発酵を追加検討した。発酵方式に関しては、既製品の製法に準じて55℃で18時間糖化させたものに上記と同様にTS-25株を接種し、35℃で乳酸発酵させたものを単行複発酵とした。

## 2.3 成分分析等

上記の試醸品について、発酵開始後18, 24, 42時間経過したものの一部を採取し、以下の分析等に供した。pHはpHメーターで測定した。アミノ酸分析では遊離グルタミン酸(L-Glu)とGABAを定量した。抽出操作、サンプル前

\*株式会社日本自然発酵

処理ならびにHPLC分析は、既報<sup>1)</sup>に準じて行った。また、甘酒を遠心分離(12,070×g, 15min, 5℃)して得られる上清の重量を液化率(%)とした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 精米度の検討

表1に精米度の検討結果を、図2に42時間並行複発酵させた乳酸発酵甘酒の試醸品を示した。55℃で18時間糖化のみを行ったものではL-Gluは69 mg/100 gに達したが、GABAは9 mg/100 gの蓄積に留まった。これに対し、30℃で並行複発酵させたものではL-Gluはいずれも7 mg/100 g以下であった。また、GABAは経時的に増加し、42時間後には74~81 mg/100 gに達した。

麴甘酒のアミノ酸は原料米のタンパク質に由来し<sup>15)</sup>、そのタンパク質は表層部より6%層に最も多く分布するとされている<sup>16)</sup>。本実験ではGABAの富化を目論み、原料米(麴米は除く)の精米度を低下させて検討を行ったが、30℃、42時間以内に於いてはL-GluならびにGABAの醸成に顕著な差は認められなかった。一方、甘酒の外観及び風味等に関しては精米度の低下に伴い黄色を帯びた色調となり、特に低精白米では糠臭が感じられた。他方、普通精白以上の精米度では良好な風味と酸味を呈した。

表1 精米度の検討結果

発酵 スターター	温度 (℃)	精米度	時間 (h)	pH	アミノ酸(mg/100g)	
					L-Glu	GABA
未接種	55	高	18	5.45	69	9
TS-25	30	高	18	4.32	7	42
			24	3.76	5	62
			42	3.75	2	79
		普通	18	4.73	7	45
			24	3.84	5	60
			42	3.79	2	74
		低	18	4.71	4	40
			24	3.85	4	63
			42	3.79	2	81

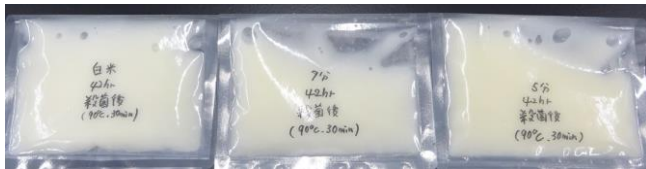


図2 乳酸発酵甘酒

(左:高精白、中:普通精白、右:低精白)

#### 3.2 発酵温度及び発酵方式の検討

表2に発酵温度及び発酵方式の検討結果を、図3に42時間発酵させた各種乳酸発酵甘酒の試醸品を示した。GABA含量は、35℃で42時間並行複発酵させたもので83

mg/100 gに達し、42時間以内に於いて他の試験区よりも多く蓄積された。また、液化率も75%以上に達し、55℃での糖化処理を経た単行複発酵と同等であった。一方、42時間発酵後の甘酒の性状は、30℃並行複発酵が粥状を呈したのに対し、35℃並行複発酵と単行複発酵では共に液状を呈した。

GABAは20 mg/日の摂取で血圧降下作用が期待され<sup>17)</sup>、機能性表示が認められた成分である。本実験結果によれば、35℃で42時間並行複発酵させた甘酒では約25gの摂取で血圧降下作用の表示が可能となり、MSG添加に由来するナトリウムを含まないことも長所となる。さらにGABA100 mg/日の摂取で「睡眠の質改善」など神経抑制系の様々なヘルスクレームが表示可能となるが、これにはGABAの拮抗成分であるグルタミン酸が含まれないことも望まれる要件となる<sup>11)</sup>。先述したように麴甘酒には米のタンパク質に由来するアミノ酸が含まれ、精米歩合60%の麴のみを使用したものでは39.7 mg/100 mL、米と米麴を配合したもの(精米度不明)では57.0 mg/100 mLの遊離グルタミン酸が含まれていたとの報告がある<sup>15)</sup>。本実験でも単行複発酵では39~69 mg/100 gの含有を確認した。これに対し、並行複発酵では42時間後に当該成分が4 mg/100 g以下に低減されたことから、GABAの生理効果を打ち消す作用が低減されていることも期待される。

表2 発酵温度及び発酵方式の検討

発酵 方式	発酵 スターター	温度 (℃)	時間 (h)	pH	アミノ酸(mg/100g)		液化率 (%)
					L-Glu	GABA	
単行 複発酵	未接種	55	18	5.35	62	6	75.9
			24	5.60	69	7	75.2
	TS-25	35	42	5.14	39	39	75.2
			18	4.99	36	14	66.5
並行 複発酵	TS-25	35	24	4.90	6	42	68.9
			42	3.49	4	83	75.7
			18	4.99	10	26	61.7
		30	24	4.60	4	38	62.7
			42	3.60	2	72	65.2
			18	4.99	10	26	61.7

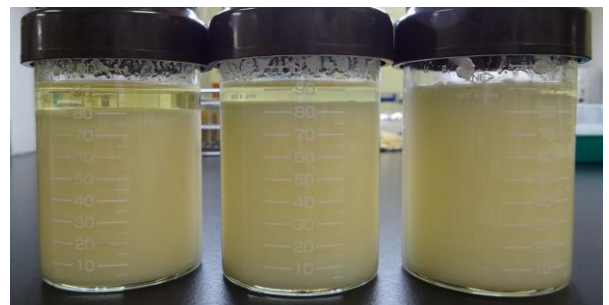


図3 乳酸発酵甘酒

(左:単行複発酵、中:並行複発酵35℃、右:同30℃)

#### 4. まとめ

米麹と乳酸菌TS-25株とを併用した並行複発酵による甘酒のGABA富化を検討した。その結果、既製品の甘酒の原料及び配合を変更することなく、製造条件を55℃で18時間の糖化处理から35℃で42時間の並行複発酵に変更することでGABAを13倍以上(6 mg/100 g→83 mg/100 g)に増加させ、L-Gluを1/15以下(62 mg/100 g→4 mg/100 g)に低減させた乳酸発酵甘酒が得られた。

#### 【謝 辞】

本研究は、令和5年度岐阜県技術シーズ移転・実証事業の採択を受けて実施した。採択テーマ: 乳酸菌高根株を用いた発酵甘酒の実証開発

#### 【参考文献】

- 1) 加島ら, 岐阜県食品科学研究所研究報告 No.3, pp.4-6.
- 2) 加島ら, 岐阜県食品科学研究所研究報告 No.4, pp.11-12.
- 3) 花岡ら, 発酵工学雑誌 No.9, pp.312-319, 1967.
- 4) 岡田ら, 日本食品科学工学会誌 Vol.47, No.8 pp.596-603, 2000.
- 5) 上野ら, 生物工学会誌 Vol.85, No.3 pp.109-114, 2007.
- 6) 水沢, 日本醸造協会誌 Vol.103, No.10 pp.757-762, 2008.
- 7) 古田ら, 日本食品科学工学会誌 Vol.55, No.6 pp.299-303, 2008.
- 8) 渡辺ら, 茶研報 No.107, pp.61-69, 2009.
- 9) 大友ら, 日本食品保蔵科学会誌 Vol.38, No.1 pp.19-23, 2012.
- 10) 候ら, 日本食品科学工学会誌 Vol.60, No.3 pp.125-131, 2013.
- 11) 三枝ら, 日本食品科学工学会誌 Vol.63, No.8 pp.339-346, 2016.
- 12) 広瀬ら, 日本食品保蔵科学会誌 Vol.43, No.6 pp.269-273, 2017.
- 13) 広瀬ら, 日本食品保蔵科学会誌 Vol.44, No.1 pp.17-21, 2018.
- 14) 日渡ら, 日本食品科学工学会誌 Vol.65, No.2 pp.55-62, 2018.
- 15) 倉橋ら, 日本醸造協会誌 Vol.114, No.10, pp.654-662, 2019.
- 16) 布浦ら, 食物学会誌 No.27, pp.42-44, 1972.
- 17) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(農研機構)「農産物の研究レビュー」(GABA), [https://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/sys-review/pdf/NARO\\_NARI\\_review\\_GABA2-1.pdf](https://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/sys-review/pdf/NARO_NARI_review_GABA2-1.pdf)